

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES (ED 222)

Laboratoire d'Innovation Thérapeutique

UMR 7200 CNRS/Unistra

THÈSE présentée par :

Elora AUBERT

soutenue le 20 juin 2023

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Pharmacognosie

**Identification de nouvelles associations
antibactériennes issues de la
Pharmacopée Médiévale Arabe**

THÈSE dirigée par :

M^{me} VONTHRON-SENECHEAU Catherine
M. FECHTER Pierre

Professeure, Université de Strasbourg
Chargé de recherche (HDR) , Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M^{me} RIVIERE Céline
M. CHAMPY Pierre

Professeure, Université de Lille
Professeur, Université Paris Saclay

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M^{me} PITCHON Véronique
M. HADDAD Mohamed

Directeur de recherche, Université de Strasbourg
Chargé de recherche (HDR), Université de Toulouse

Table des matières

Table des matières	iii
Remerciements.....	ix
Publications, chapitre d'ouvrage et communications orales.....	xi
Liste des abréviations	xiii
Introduction.....	3
1. Contexte et objectifs généraux de la thèse	3
2. Objectifs spécifiques de la thèse	5
Chapitre 1 – Contexte général de l'étude.....	9
1. La lutte contre les bactéries pathogènes : un enjeu mondial.....	9
1.1. Les bactéries pathogènes.....	9
1.2. La résistance des bactéries aux antibiotiques.....	9
2. Les pharmacopées médiévales arabes (Ph. Méd. Ar.).....	14
3. Les abcès cutanés infectieux, des infections aux multiples facettes	17
3.1. Les abcès cutanés infectieux, généralités	17
3.2. Les abcès cutanés infectieux dus à <i>Staphylococcus aureus</i>	19
4. La présence des plantes dans la médecine traditionnelle et moderne pour un usage antibactérien.....	23
4.1. Les molécules antibactériennes issues des végétaux.....	23
4.2. L'exemple des cônes femelles de houblon.....	25
5. La présence des métaux dans la médecine traditionnelle et moderne pour un usage antibactérien.....	27
5.1. Utilisation antibactérienne des métaux	28
5.2. Utilisation antibactérienne du cuivre.....	30
5.3. La synthèse verte de nanoparticules métalliques : une association plantes-métaux actuellement étudiée	30
6. Conclusion sur le contexte général de l'étude.....	32
Chapitre 2 – Identification des ingrédients des remèdes et étude phytochimique des drogues végétales	35
1. Identification et présentation des ingrédients.....	36

1.1.	L'aloès : qui du gel ou du latex ?	37
1.2.	La myrrhe : l'oléorésine d'un genre botanique entier	42
1.3.	La gomme sarcocolle : une drogue peu étudiée.....	46
1.4.	La gomme ammoniacque : perse ou africaine ?.....	51
1.5.	Le vert-de-gris : un mélange complexe et variable de sels de cuivre	57
2.	Approvisionnement(s) des différentes drogues.....	60
3.	Extraits végétaux obtenus	62
4.	Contrôles de l'identité botanique des différentes drogues végétales et caractérisation des extraits.....	64
4.1.	Contrôle de l'identité et caractérisation chimique du suc d' <i>A. ferox</i> ALOF	64
4.2.	Contrôle de l'identité et caractérisation chimique de la myrrhe commerciale COMA1	67
4.3.	Contrôle de l'identité et caractérisation chimique de la myrrhe traditionnelle MYRR1.....	72
4.4.	Contrôle de l'identité et caractérisation chimique de la gomme sarcocolle traditionnelle SARC .	79
4.5.	Contrôle de l'identité et caractérisation chimique de la gomme ammoniacque traditionnelle AMM01.....	82
5.	Conclusion sur l'identification des ingrédients des remèdes et l'étude phytochimique des drogues végétales	89
Chapitre 3 – Etude des activités biologiques des différents ingrédients.....		93
1.	Evaluation de la cytotoxicité	95
2.	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	97
2.1.	Criblage par diffusion sur gel d'agar	98
2.2.	Mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices CMI par microdilution en bouillon	101
2.3.	Indices de sélectivité IS.....	105
3.	Evaluation de l'activité sur la réponse inflammatoire	107
3.1.	Effet pro-inflammatoire	107
3.2.	Effet anti-inflammatoire.....	110
4.	Criblage de l'activité cicatrisante (<i>scratch test</i>)	113
4.1.	Migration spontanée des fibroblastes	114
4.2.	Migration des fibroblastes sans LPS.....	114
4.3.	Migration des fibroblastes avec LPS	115
5.	Conclusion sur les activités biologiques des différents ingrédients.....	117

Chapitre 4 – Fractionnement bioguidé par l'activité antibactérienne de la gomme ammoniacque traditionnelle 121

1. Fractionnement bioguidé sur les extraits AMMO1 122
 - 1.1. Fractionnement par partition liquide/liquide 122
 - 1.2. Fractionnement par LC-Flash : fractions F1 et F2 123
2. Détermination structurale des composés isolés et identification 131
 - 2.1. Le composé F1-C : le féruléol ? 131
 - 2.2. Le composé F2-A : l' ω -hydroxyféruléol ? 140
 - 2.3. Le composé F2-E : une nouvelle coumarine sesquiterpénique, le coumaryl 12-féruléol ? 143
3. Conclusion sur le fractionnement bioguidé d'AMMO1 et ses composés antibactériens 151

Chapitre 5 - Approche synergique entre les différents ingrédients des remèdes étudiés, en particulier l'association drogues végétales/métal 157

1. Activité antibactérienne des formulations traditionnelles par diffusion sur gélose 159
 - 1.1. Limites du test 159
 - 1.2. Activité antibactérienne des remèdes étudiés sous leur formulation traditionnelle 160
 - 1.3. Importance des différents ingrédients dans les formulations traditionnelles des remèdes 162
2. Etude de la potentielle synergie antibactérienne entre les extraits des drogues végétales . 166
 - 2.1. Comparaison de l'activité antibactérienne des extraits AMMO1 et RDV 166
 - 2.2. Association des extraits hydroalcooliques des drogues végétales et indices FIC (méthode de l'échiquier) 168
3. Etude de la potentielle synergie antibactérienne entre les extraits des drogues végétales et l'acétate de cuivre 170
 - 3.1. Association de l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH avec l'acétate de cuivre et indices FIC (méthode de l'échiquier) 170
 - 3.2. Association des extraits hydroalcooliques des drogues végétales avec l'acétate de cuivre et indices FIC (méthode de l'échiquier) 172
4. Synthèse de particules à partir des ingrédients des remèdes (extraits végétaux et sel de cuivre) 174
 - 4.1. Formation d'un précipité après mélange des solutions de RDV-EH et de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 176
 - 4.2. Activité antibactérienne des particules formées 177
 - 4.3. Caractérisation des particules (étude préliminaire) 185

5. Conclusion sur l'activité antibactérienne de l'association des différents ingrédients au sein des remèdes.....	190
Conclusion générale et perspectives.....	195
Partie expérimentale.....	201
1. Procédures générales	201
1.1. Solvants	201
1.2. Chromatographies sur Couche Mince (CCM)	201
1.3. Conditionnement	201
1.4. Techniques analytiques : instruments, paramètres et préparations des échantillons	202
1.5. Techniques séparatives : instruments/matériel, paramètres et préparations des échantillons	203
2. Approvisionnement des ingrédients des remèdes étudiés, extraction et contrôles des drogues végétales.....	204
2.1. Approvisionnement en matière première	204
2.2. Extractions des différentes drogues végétales	204
2.3. Contrôle de l'identité botanique et caractérisation des drogues végétales	205
3. Tests sur cellules eucaryotes	211
3.1. Culture cellulaire	211
3.2. Tests de cytotoxicité (test MTS)	212
3.3. Test de Griess : mesure de la production d'oxyde nitrique NO	212
3.4. Test ELISA : mesure des cytokines TNF- α	213
3.5. Test de cicatrisation (<i>scratch test</i>) sur fibroblastes murins	214
4. Tests sur bactéries.....	215
4.1. Souches bactériennes	215
4.2. Milieux de culture	216
4.3. Précultures	216
4.4. Détermination du facteur de corrélation entre la DO et la densité bactérienne	216
4.5. Méthode de diffusion sur gel d'agar	218
4.6. Méthode de microdilution en bouillon et détermination des CMI	219
4.7. Détermination des indices de sélectivité IS	221
5. Fractionnement des extraits végétaux : méthodes séparatives	221
5.1. Partition liquide/liquide.....	221

5.2.	Chromatographies en phase liquide, généralités	222
5.3.	Chromatographie en phase liquide sur colonne ouverte	223
5.4.	Chromatographie en phase liquide sur Flash (LC-Flash)	223
5.5.	Chromatographie en phase liquide à haute performance semi-préparative (HPLC semi-préparative)	224
6.	Données spectrales des composés isolés de la gomme ammoniac AMMO1	226
6.1.	Férulénol 36 (F1-C)	226
6.2.	ω -hydroxyl-ferulenol 43 (F2-A)	227
6.3.	Coumaryl 12-férulénol (F2-E, nouvelle 4-hydroxycoumarine sesqui-terpénique)	228
7.	Activité antibactérienne des formulations traditionnelles par diffusion sur gélose	229
8.	Etude de la potentielle synergie entre les différentes drogues	230
8.1.	Méthode de l'échiquier et calcul des indices FIC	230
8.2.	Lecture de la densité optique pour l'interprétation des échiquiers	232
9.	Synthèse verte de particules entre l'acétate de cuivre et les extraits RDV	234
9.1.	Synthèse des particules par agitation en milieu liquide	234
9.2.	Criblage antibactérien et antibiofilm des particules	234
9.3.	Caractérisation des particules	237
Bibliographie		241
Annexes		258
Annexe 1.	Monographie de la Ph. Eur. 11.0 ¹¹¹ pour les extraits d'aloès	259
Annexe 2.	Monographie de la Ph. Eur. 11.0 ¹¹¹ pour le suc d' <i>A. ferox</i>	261
Annexe 3.	Monographie de la Ph. Eur. 11.0 ¹¹¹ pour la myrrhe, la gomme résine de <i>Commiphora</i> sp.	263
Table des figures		265
Table des tableaux		273
Index des codes utilisés pour les différentes drogues et préparations		278

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ces travaux de thèse. Je remercie la Dr Céline Rivière et le Pr Pierre Champy d'avoir évalué ce manuscrit en tant que rapporteurs, ainsi que le Dr Mohamed Haddad et la Dr Véronique Pitchon de s'être joint à eux en tant que membres du jury. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour la disponibilité et la patience dont vous avez fait preuve à mon égard, malgré une rédaction houleuse.

Je remercie mes directeurs de thèse la Pr Catherine Vonthron-Senecheau et le Dr Pierre Fechter pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse sous leur direction, malgré mon inexpérience en chimie comme en microbiologie.

Je souhaite remercier chaleureusement le Dr Maël Gainche pour son encadrement qui fut certes court, seulement une année en partie confinée, mais salvateur pour ma thèse comme pour ma vocation. Grâce à toi j'ai pu retrouver peu à peu la confiance qui avait été détruite en moi et tu m'as appris que certaines personnes ne valaient pas la peine d'être écoutée. Merci pour tout ce que tu m'as appris, c'est à toi que je dois les plus grandes avancées dans mon travail et j'espère pouvoir un jour aider quelqu'un comme tu m'as aidé. Merci pour les grandes discussions, scientifiques ou non, les randonnées botaniques et les fous rires. Je remercie également le Dr Sergio Ortiz Aguirre pour sa patience, sa pédagogie et sa disponibilité durant cette dernière année de thèse. Ton arrivée a été un véritable bénéfice pour l'équipe de recherche comme pédagogique, et je sais que sous ton aile la thèse de Capucine ne peut que bien se passer.

Je remercie les personnes avec qui j'ai pu échanger au court de ces années au sein de l'équipe *Chimie – Biologie Intégrative et Pharmacognosie* de l'UMR7200. Merci au Dr Didier Rognan, Dr Dominique Bonnet et Pr Marcel Hibert pour leur disponibilité et leur soutien durant l'absence de Catherine. Merci à Stéphanie pour sa grande aide sur les divers instruments d'analyse et le fonctionnement du laboratoire en général. Une pensée toute particulière pour mes collègues thésards de la même année, Timothé et Arthur. Merci Timothé pour ton aide en chimie, ton humour acerbe mais toujours juste et encore félicitation pour ton post-doc. Merci Arthur et Lucille pour ces discussions au détour d'une paillasse, vous avez été d'agréables voisins de labo. Enfin, merci à toi Capucine, pour le temps que tu as consacré à l'isolement des composés de la gomme ammoniacale mais aussi pour ta compagnie et ton soutien durant ces derniers mois. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Je remercie aussi les membres de l'équipe *Biotechnologie et signalisation cellulaire* de l'UMR7242 avec qui j'ai eu l'occasion de travailler. Merci au Dr Isabelle Schalk et au Dr Gaëtan Mislin de m'avoir permis de m'initier à la microbiologie dans les locaux de leur équipe. Merci à Anne et Gwenaëlle pour leur aide à mes débuts. Un grand merci à Régine qui a effectué bon nombre des expérimentations, dont la totalité de la synthèse des particules et de leur tests biologiques.

Je tiens également à remercier à toutes les personnes d'autres laboratoires avec qui j'ai eu la chance de collaborer : la Pr Sylvie Fournel et Cendrine Seguin de l'équipe *3BIO* (UMR7199) ainsi que Camila et Geoffrey pour les tests sur la réponse inflammatoire, la Dr Véronique Pitchon (UMR7044) pour l'aspect historique, le Dr Laurent Hardion et Armando de l'équipe *Hydrosystèmes* (UMR7362) pour l'extraction de l'ADN, la Dr Gisèle Hann-Archipoff (Herbier de l'Université de Strasbourg) pour la botanique et la Dr Leslie Boudesocque-Delaye (EA7502) pour les échantillons de référence des différentes gomme-résines. Merci d'avoir pris de votre temps à de nombreuses reprises pour répondre à mes questions. Un merci tout spécial à Delphine Garnier (PACSI), mon ancienne maîtresse de stage devenue mon amie : merci pour tout ce que tu m'as enseigné en RMN, pour les cafés, pour ton humour et pour la tasse qui a accompagné mes nuits de rédaction. Je compte bien rattraper toutes les fois où je t'ai dit que je passerai dire coucou sans jamais y arriver.

Je remercie aussi les stagiaires qui ont participé à ces travaux et que j'ai eu le plaisir d'encadrer : merci à Loya, Fatlind et Megi pour leur implication et leur énergie. Je vous souhaite de vous épanouir dans la suite de vos études et dans votre avenir professionnel.

Enfin je souhaite remercier mon entourage pour leur présence ainsi que leur soutien, parfois maladroit mais infaillible. Merci Agathe, Marianne et Cloé, je vous ai donné peu de nouvelles en 3 ans mais pourtant vous êtes toujours là, promis on va rattraper le temps perdu. Merci à mes anciens colocataires, Fanny, PA et Aliou pour ces moments chaleureux et nos discussions à 10 000 kilomètres du labo. Merci à mes nouveaux colocataires Bastien et Lucile, vous avez bien voulu accueillir la pièce rapportée que j'étais et vous êtes maintenant des amis, un nouveau foyer. Un énorme merci à Gwen, à qui mon destin universitaire semble lié depuis le master. Tu as été bien des choses : ma camarade de classe, ma partenaire VégéLab et ma voisine, puis ma camarade de thèse et ma colocataire de fortune durant le confinement. Mais aujourd'hui tu es avant tout une amie qui m'est chère et un être humain exceptionnel, comme on en rencontre peu. Merci d'avoir été là dans les moments difficiles, professionnels comme personnels, comme dans les moments de joies et de rires.

Merci à ma famille, à mes parents de m'avoir offert l'opportunité de faire les études que je souhaitais. Merci à vous de m'épauler de loin et de vous soucier de mon bonheur plutôt que de ma réussite. Gaby, tu es un modèle qui me tire vers le haut et me donne le courage de penser par moi-même. Merci à toi et Cino de m'avoir accueilli de nombreuses fois chez vous et merci à Ariane d'être une poumpette qui efface les soucis triviaux de la vie en un sourire (édenté).

Merci à toi Thomas, d'être descendu du labo d'au-dessus pour entrer dans ma vie et y rester. En guise de cadeau de bienvenue, tu m'as offert un nouveau foyer et un quotidien joyeux. C'est grâce à toi que j'ai pu tenir dans les moments les plus difficiles car avec toi, chaque jour valait la peine d'être vécu. Merci de m'avoir supporté dans tous les sens du terme et d'être là, tout simplement. C'est grâce à toi que cette thèse s'est finie et que ma vie ne s'est pas arrêtée.

Publications, chapitre d'ouvrage et communications orales

Publications :

Abdallah, B., Seguin, C., Aubert, E., BenHassou, H. A., Sbabou, L., Choulier, L., Vonthron, C., Schalsk, J.I., Mislin, L.A.G., Fournel, S., Pitchon, V., Fechter, P. (2022). Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 71, p.126926.

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126926>

Chapitre d'ouvrage :

Pitchon, V., Aubert, E., Vonthron, C., Fechter, P. How history can help present research of new antimicrobial strategies: the case of cutaneous infections' remedies containing metals from the Middle Age Arabic pharmacopeia. In *Medicinal plants as anti-Infectives, current knowledge and new perspectives* (ed. Chassagne, F.) 459-475 (Academic Press, Elsevier, 2022).

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90999-0.00016-1>

Communications orales :

Aubert, E., Gainche, M., Abdallah, B., Espinoza-Prieto, A., Hardion, L., Janel, R., Pitchon, V., Fechter, P., Vonthron, C. Reproduction and antibacterial activity of a traditional remedy from Arab Medieval Pharmacopeiae, combining plants and metals (Flash poster). Journées virtuelles AFERP (Association Francophone pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie), en ligne, **16/07/21**.

Aubert, E., Gainche, M., Ortiz-Aguirre, S., Abdallah, B., Espinosa-Prieto, A., Hardion, L., Janel, R., Pitchon, V., Fechter, P., Vonthron, C. Reproduction et activité antibactérienne d'un remède issu d'une pharmacopée arabe médiévale, combinant plantes et métaux. RECOB18 (Rencontre de Chimie Organique Biologique 18), Aussois, **20-24/03/22**.

Liste des abréviations

3DV : mélange de ALOF, COMA1 et SARC dans les proportions 1/1/1 (m/m/m)

A : extrait à l'acétate d'éthyle

ACN : acétonitrile

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AF : acide formique

ALOOF : Aloe ferox

AMMO : gomme ammoniacale traditionnelle d'espèce inconnue

ARN : Acide RiboNucléique

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

COMA : Commiphora abyssinica

CTAB : bromure de cetyltriméthylammonium

Cu(OAc)₂ : acétate de cuivre

CuNP : Copper NanoParticles (nanoparticules de Cuivre)

D : extrait dans le dichlorométhane

DCM : dichlorométhane

DFO : DéFérOxamine

DO : Densité Optique

DMSO : DiMéthylSulfoxyde

EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid (acide éthylènediaminetétraacétique)

EH : extrait dans l'éthanol à 70%

EtOAc : acétate d'éthyle

EtOH : éthanol

ESI : ElectroSpray Ionization (ionisation par électronébuliseur)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance)

HPLC-DAD : HPLC équipée d'un détecteur à barrette de diode

HPLC-HRMS : HPLC équipée d'un spectromètre de masse comme détecteur haute résolution

HRMS : spectromètre de masse haute résolution

IS : Indice de Sélectivité

ITS : Internal Transcribed Spacer (espaceur interne transcrit)

KOH : Hydroxyde de potassium

LPS : LipoPolySaccharide

LC : Liquid Chromatography (chromatographie liquide)

LC-Flash : chromatographie liquide Flash

MH-II : milieu Muller Hinton II ajusté en cations
MRSA : Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (souche S. aureus méticilline-résistante)
MYRR : myrrhe traditionnelle d'espèce inconnue
NaCl : chlorure de sodium
NaOAc : acétate de sodium
NO : monoxyde d'azote
PCR : Polymerase Chain Reaction (amplification en chaîne par polymérase)
Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne
Ph. Méd. Ar. : Pharmacopée Médiévale Arabe
PTFE : PolyTétraFluoroÉthylène
R1 : remède 1
R2 : remède 2
RDV : mélange des 4 drogues végétales des remèdes dans les proportions 1/1/1/1 m/m/m/m
Rf : Rapport frontal
rpm : rotations par minutes
ROS : Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
SARC : gomme sarcocolle traditionnelle d'espèce inconnue
TFA : TriFluoroacetic Acid (acide trifluoroacétique)
ToF : Time-Of-Flight (temps de vol)
UFC : Unités Formant des Colonies



Introduction

p 1 à p 6



Introduction

1. Contexte et objectifs généraux de la thèse

La résistance des bactéries aux antibiotiques - *a fortiori* à plusieurs d'entre eux - représente un problème mondial et urgent¹⁻³. En effet, le nombre de décès dus à ces bactéries multirésistantes est estimé à plus de 700 000 par an dans le monde, d'après une étude commandée par le gouvernement britannique en 2014². Une seconde étude, plus récente, a fait un état des lieux encore plus alarmant avec une estimation de 1,27 millions de morts dus à des bactéries multirésistantes en 2019³. Trouver de nouveaux antibactériens est donc plus que jamais un axe de recherche majeur.

La présente thèse s'intègre dans le programme de recherche interdisciplinaire MANSÀ (MANuscrits Scientifiques Anciens), dont un des axes de recherche est l'exploration de pharmacopées anciennes de tradition écrite pour une application en thérapeutique anti-infectieuse. Ce programme a été initié en 2017 par le Dr. Pierre FECHTER, microbiologiste au sein de l'UMR 7242 (équipe *Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications*), en collaboration avec la Pr. Catherine VONTHRON-SENECHEAU, pharmacographe (UMR 7200, équipe *Chimie-Biologie Intégrative et Pharmacognosie*), la Dr. Véronique PITCHON, historienne (UMR 7044, équipe *Territoires et empires d'Orient*), et la Dr. Laurence CHOULIER, biochimiste spécialisée dans la vectorisation (UMR 7021, équipe *Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques*). Le projet comprend aujourd'hui plusieurs axes de recherches et implique une quinzaine d'acteurs de la recherche en sciences humaines comme en sciences expérimentales, dont la Pr. Sylvie FOURNEL, immunologiste au sein de l'UMR 7199 (équipe *3BIO Biovectorisation, Bioconjugaison et Biomatériaux*), dont la collaboration a été précieuse lors de cette étude.

Le but de cette thèse a donc été d'identifier de nouvelles associations antibactériennes dans des pharmacopées manuscrites datant des Califats islamiques, textes que nous regrouperons ici sous le terme général de Pharmacopée Médiévale Arabe (Ph. Méd. Ar.).

Cette approche s'inscrit dans une stratégie ethnopharmacologique et cherche à comprendre comment agissent deux remèdes issus de la Ph. Méd. Ar., une ressource particulièrement intéressante comportant de nombreuses sources manuscrites mais ayant été encore peu étudiée selon une approche ethnopharmacologique. Par ailleurs, cette pharmacopée comporte des remèdes associant drogues végétales et métaux. Les métaux étant aujourd'hui une alternative aux antibiotiques de plus en plus étudiée en cas de résistance^{4,5}, le projet s'est concentré sur ces associations dans le but de comprendre et de valoriser l'utilisation des métaux contre des bactéries pathogènes dans cette pharmacopée traditionnelle, notamment par association avec des plantes.

L'étude présentée dans ce manuscrit a été menée sur 2 remèdes associant des drogues végétales à un métal, ces préparations ayant été estimées comme potentiellement antibactériennes sur la base de leur prescription. Ils ont été sélectionnés parmi plusieurs remèdes issus d'*aqrābādhināt* (pharmacopées en arabe) de différents auteurs, selon les critères suivants :

- Les remèdes devaient répondre à des symptômes pouvant avoir une origine bactérienne (ex : toux, maux de ventre, infections cutanées, infections urinaires ...)
- Ils devaient comporter au moins un métal en plus de drogues végétales
- Les métaux devaient être considérés comme relativement peu toxiques (ont été exclus les remèdes contenant des métaux tel que du plomb, de l'arsenic ou encore du mercure et n'ont été gardés que ceux avec des métaux tels que le cuivre, l'argent ou l'or)
- Les drogues végétales utilisées devaient être les plus récurrentes possibles dans les pharmacopées étudiées.

Ce processus de sélection a permis de relever que, dans les pharmacopées étudiées, les métaux étaient uniquement employés pour un usage topique⁶.

Les deux remèdes retenus pour cette thèse proviennent de l'*aqrābādhīn* d'Al-Kindī et sont prescrits contre des infections cutanées de type abcès ou furoncle. Ils sont tous deux composés des 4 mêmes drogues végétales et des mêmes sels de cuivre, dont le détail est donné dans le **Tableau 1**. Il est à noter que les deux remèdes partagent les mêmes ingrédients et ne diffèrent que par leur teneur respective en sels de cuivre.

Tableau 1 – Composition des deux remèdes retenus pour l'étude, issus de l'*aqrābādhīn* d'Al-Kindī⁷

Ingrédients	Remède 1 (R1)	Remède 2 (R2)
Aloès	1 part *	2 ūqiyya **
Myrrhe	1 part	2 ūqiyya
Gomme sarcocolle	1 part	2 ūqiyya
Gomme ammoniacque	1 part	2 ūqiyya
Vert-de-gris (sels de cuivre)	1 part	1 mithqāl
Proportions relatives des ingrédients :	1 / 1 / 1 / 1 / 1 (m/m/m/m/m)	1 / 1 / 1 / 1 / 0,07 (m/m/m/m/m)

Teneurs : aloès / myrrhe / gomme sarcocolle / gomme ammoniacque / vert-de-gris

Unités de mesure du 9ème siècle à Bagdad : 1 « ūqiyya » = 33,85 g et 1 « mithqāl » = 4,46 g

*jus ; ** partie non précisée

Le remède 1 (R1) s'intitule « *Médicament pour les abcès pour lequel le bistouri n'est pas préconisé* » et la formulation des ingrédients est décrite comme suit : « *Tout est broyé, mélangé et saupoudré sur la plaie. On met un linge dessus, si Dieu veut.* ».

Le remède 2 (R2) s'intitule « *Médicament de Abū Mihjan contre les abcès et les mauvais furoncles* » et la formulation des ingrédients est décrite comme suit : « *Chaque ingrédient est broyé et tamisé. On humidifie l'abcès avec. On humidifie un tissu fin en lin avec de l'eau et on saupoudre le médicament dessus et on applique sur la blessure. Cet emplâtre ne s'enlèvera pas (tout seul) tant que (l'abcès ou le furoncle) ce n'est pas guéri, avec l'aide de Dieu.* ».

Afin de faciliter la lecture, la composition et la formulation des deux remèdes est indiquée dans l'**index** (en fin de document p278 dans la version imprimée). Durant cette étude, les deux remèdes ont été traités comme des variantes l'un de l'autre étant donné qu'ils ne différaient l'un de l'autre que par la teneur finale en sels de cuivre (**Tableau 1**, dernière ligne).

2. Objectifs spécifiques de la thèse

Le but de cette thèse est de comprendre l'intérêt des associations d'ingrédients décrites dans ces remèdes pour la résolution d'une infection de la peau de type abcès cutané, avec une attention particulière portée aux sels de métal s'y trouvant.

Un abcès cutané est le résultat de l'agression des cellules de l'hôte par une bactérie pathogène ayant passé la barrière de la peau. Il est à noter que cette bactérie peut être un pathogène obligatoire ou bien un pathogène opportuniste dont l'environnement a favorisé un comportement pathogène⁸. Un abcès cutané va ainsi impliquer une infection bactérienne, une réponse inflammatoire, une sensation de douleur et une cicatrisation. Il est réaliste de penser qu'un seul ingrédient ne peut satisfaire à tous ces aspects : l'utilisation de plusieurs ingrédients dans les remèdes pourrait donc être le résultat d'une approche holistique, où chaque ingrédient serait employé pour une activité biologique principale. Une autre hypothèse serait que les différents ingrédients sont plus efficaces ensemble qu'isolés, et seraient alors associés dans un but synergique. Les différents objectifs de l'étude ont donc été définis ainsi :

- identifier scientifiquement les ingrédients des remèdes sélectionnés afin de se les procurer (eux ou une alternative), en contrôlant l'identité botanique et la qualité des drogues végétales ;
- évaluer l'effet de ces ingrédients sur différents processus physiologiques impliqués dans un abcès cutané : l'infection bactérienne, l'inflammation et la cicatrisation ;
- isoler et identifier le ou les composés responsables des activités les plus remarquables ;
- étudier la potentielle synergie antibactérienne entre les ingrédients, dans les remèdes reconstitués mais aussi plus spécifiquement entre les sels de cuivre et les drogues végétales.

Le **premier chapitre** permettra de définir le contexte de cette étude. Tout d'abord le contexte global du projet dans lequel elle s'inscrit, avec la problématique de l'antibiorésistance des bactéries et l'intérêt de la Ph. Méd. Ar en tant que ressource ethnopharmacologique. Puis, dans un second temps, le contexte plus précis de cette thèse avec la description de ce qu'est un abcès cutané infectieux et avec un état de l'art sur les usages connus des plantes et des métaux contre les bactéries impliquées dans ces abcès.

Le **deuxième chapitre** décrira l'identification et la caractérisation des ingrédients des remèdes étudiés. Pour cela, le choix des drogues végétales et des sels de cuivre qui a été fait pour cette étude sera explicité. Une partie du chapitre sera ensuite consacrée aux drogues végétales : le contrôle de leur identité botanique et de leur qualité y sera décrit, suivi de la réalisation des différents extraits et de la caractérisation de ces derniers par HPLC-DAD et HPLC-HRMS/MS.

Le **troisième chapitre** portera sur la possible approche holistique des remèdes, en évaluant pour chaque ingrédient isolé l'activité antibactérienne, la réponse inflammatoire ainsi que l'activité pro-cicatrisante à l'aide de différentes méthodes de criblage *in vitro*. Un accent particulier sera mis sur l'activité antibactérienne.

À la suite de cette étude holistique, le **quatrième chapitre** sera consacré au fractionnement bioguidé de la drogue végétale ayant montré l'activité la plus prometteuse, à savoir la gomme ammoniacale et son activité antibactérienne sur les bactéries Gram+ testées. La détermination structurale des composés majoritaires composant les fractions actives y sera détaillée.

Enfin, le **cinquième chapitre** consistera en une étude de la potentielle synergie antibactérienne des ingrédients au sein des remèdes reconstitués, mais également entre le sel de cuivre choisi et des extraits des drogues végétales. L'accent sera mis sur l'évaluation de l'activité antibactérienne et antibiofilm de particules obtenues en associant l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ à des extraits des drogues végétales.

Afin de faciliter la lecture du manuscrit, un **index** résumant les différents sigles utilisés pour les remèdes, drogues et extraits est disponible en fin de document p278 (version imprimée). De plus, **les conclusions et éléments les plus importants seront indiqués en orange** tandis que **les conclusions intermédiaires et certaines notions clefs seront indiquées en bleu**.

1. La lutte contre les bactéries pathogènes : un enjeu mondial

2. Les pharmacopées médiévales arabes (Ph. Med. Ār.)

3. Les abcès cutanés infectieux, des infections aux multiples facettes

4. Les plantes avec un usage antibactérien

5. Les métaux avec un usage antibactérien

Chapitre 1

Contexte de l'étude

p 7 à p 32



Chapitre 1 – Contexte général de l'étude

1. La lutte contre les bactéries pathogènes : un enjeu mondial

1.1. Les bactéries pathogènes

Les bactéries sont des procaryotes microscopiques omniprésents sur Terre, y compris dans les écosystèmes considérés comme les plus hostiles^{9,10}. En effet, leur grande plasticité leur a permis de s'adapter à tous les environnements, y compris l'organisme d'autres êtres vivants^{9,10}. C'est notamment le cas des métazoaires, dont l'être humain, mais aussi des végétaux¹⁰. Les interactions entre les bactéries et leur hôte peuvent être de différente nature : il peut s'agir de commensalisme (bénéfique pour la bactérie et neutre pour l'hôte, même si des bactéries dites commensales se sont révélées être très importantes dans le système immunitaire¹¹), de mutualisme (bénéfique pour la bactérie et pour l'hôte) ou, et c'est cet aspect qui nous intéresse ici, la bactérie peut devenir pathogène pour l'hôte⁹. La bactérie va adopter une stratégie pathogène en réponse à son environnement, en fonction de nombreux facteurs comme la présence de nutriments, d'oxygène, de fer et la détection du quorum (ou *quorum sensing* en anglais)⁸. Ces bactéries pathogènes font alors face à différentes stratégies de défense de l'hôte^{9,12}. Chez l'être humain, ces stratégies de défense sont notamment le système immunitaire^{12,13} tandis que chez les plantes, ces défenses vont être, entre autres, la synthèse constitutive ou induite de composés antibactériens¹⁴. Cette synthèse fait du règne végétal une source potentielle d'antibactériens¹⁵, dont un certain nombre d'espèces ont déjà un usage thérapeutique traditionnel antimicrobien comme nous le verrons par la suite¹⁶.

Les bactéries pathogènes pour l'être humain peuvent être obligatoires (provoquent obligatoirement une maladie) mais également opportunistes : naturellement présentes dans les flores bactériennes vivant à la surface de notre corps, elles deviennent pathogènes dans un environnement favorisant cette stratégie⁸. C'est notamment le cas des nombreux staphylocoques de la flore cutanée pouvant causer différentes infections cutanées dont des abcès et des furoncles, en particulier *Staphylococcus aureus*^{17,18}.

1.2. La résistance des bactéries aux antibiotiques

Lorsque qu'un patient est victime d'une infection bactérienne et que cette infection le nécessite, on le traite à l'aide d'antibiotiques. Néanmoins, la grande plasticité des bactéries leur a permis de développer des mécanismes de résistance très tôt après la découverte des premiers

antibiotiques dans les années 1920 par A. Fleming⁴. Des cas de résistance ont ainsi été observés dès les années 1930, principalement dans les hôpitaux où ils étaient les plus utilisés⁴.

En première ligne de défense, la paroi bactérienne va jouer un rôle important dans la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. En effet les bactéries, pathogènes ou non, peuvent être distinguées en deux groupes selon la constitution de cette paroi : Gram+ et Gram-. Les bactéries dites Gram+ (colorées en violet avec la coloration de Gram) ont une paroi principalement constituée de peptidoglycanes, tandis que les bactéries dites Gram- (colorées en rouge avec la coloration de Gram) ont une paroi constituée d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe contenant notamment des lipopolysaccharides LPS (**Figure 1**)⁹. Les bactéries Gram- sont naturellement plus résistantes aux divers antibiotiques, leur membrane externe entravant la pénétration des composés⁹.

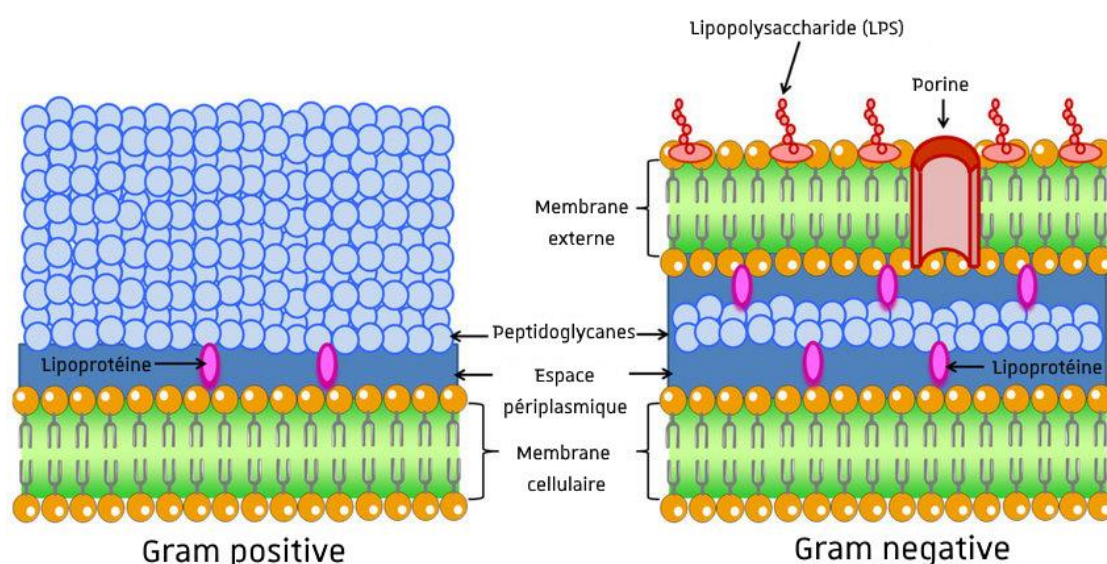


Figure 1 – Différences entre les parois des bactéries Gram+ et Gram- (tiré de Jiménez-Jiménez et al, 2022¹⁹)

Par la suite, les bactéries ont développé et acquièrent encore des stratégies de résistance supplémentaires face aux antibiotiques, de par leur grande fréquence de mutation et la pression de sélection exercée par ces composés¹. Certaines souches particulièrement exposées aux antibiotiques, notamment dans les hôpitaux, ont acquis plusieurs de ces stratégies de résistance, par mutation ou grâce à la dispersion non-spécifique des gènes de résistance dans l'environnement¹. Ces stratégies peuvent consister à **dégrader ou désactiver l'antibiotique** à l'aide d'enzymes comme les β -lactamases, à **l'expulser** hors de la cellule à l'aide de pompes à efflux ou encore à **modifier la cible de l'antibiotique** afin qu'elle ne soit plus reconnue (**Figure 2**).

- Exemple d'antibiotiques détruits : les antibiotiques β -lactamines comme les pénicillines ou les céphalosporines sont les cibles des β -lactamases.
- Exemple d'antibiotiques modifiés : le chloramphénicol et les aminosides tels que la streptomycine et la gentamicine sont inactivés par différentes enzymes.
- Exemple d'antibiotiques éjectés : Les tétracyclines, le chloramphénicol et les fluoroquinolones peuvent être éjectés hors de la cellule par flux actif
- Autre mécanisme non-représenté : Modification de la cible intracellulaire de l'antibiotique, le rendant incapable d'inhiber une fonction vitale dans la cellule microbienne (ex : ribosome, protéines impliquées dans la réplication de l'ADN ou la synthèse de la paroi cellulaire).

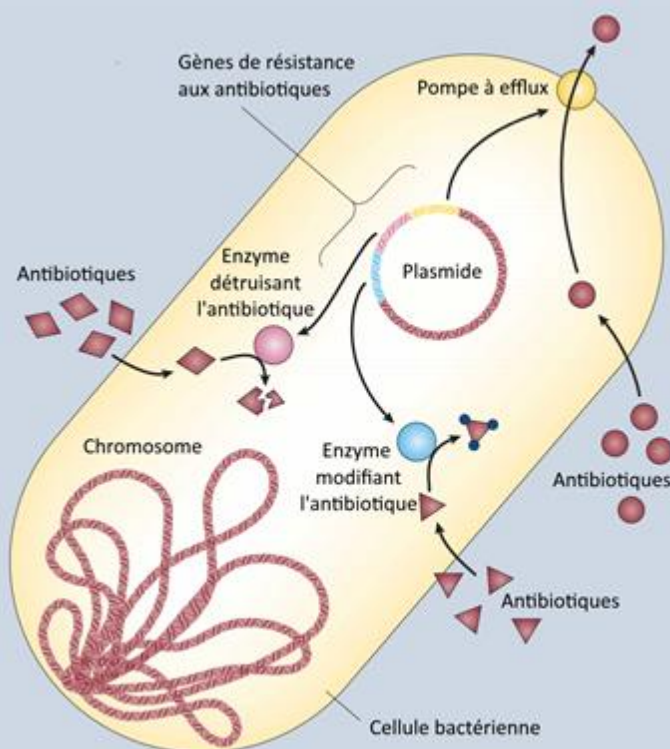


Figure 2 – Différents mécanismes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries (à partir de Levy and Marshal, 2004¹)

Une autre forme de résistance aux antibiotiques, commune à de nombreuses souches, est la formation d'un biofilm. Les biofilms sont un *consortium* de bactéries s'organisant sur une surface, au sein d'une matrice extracellulaire qu'elles ont générée et qui est principalement constituée de polysaccharides²⁰. Les biofilms présentent une plus grande résistance aux antibiotiques, aux détergents mais aussi à la phagocytose et à d'autres éléments de la réponse immunitaire de l'hôte²⁰. Cette résistance dépend de plusieurs mécanismes, comme la barrière physique que constitue la matrice ou encore la présence d'enzymes détruisant les antibiotiques comme les β -lactamases (hydrolysent le cycle β -lactame des antibiotiques de type β -lactamine). D'autres mécanismes sont également impliqués, comme le présente la Figure 3²¹ : 1) un gradient de nutriments dont l'oxygène, pauvre au centre et riche sur la périphérie du biofilm, qui permet la différenciation des bactéries ; 2) la synthèse d'exopolysaccharides qu'on suppose séquestrer un certain nombre d'antibiotiques par interactions électrostatiques ; 3) la présence d'ADN extracellulaire ADNe dont les nombreux rôles restent encore à éclaircir mais qui permettent notamment le partage de gènes de résistance au sein du biofilm ou encore la liaison aux antibiotiques ciblant l'ADN avant qu'ils n'atteignent une bactérie ; 4) la limitation de la production de ROS provoquée par les antibiotiques, grâce à une adaptation de l'expression de certains gènes ; 5) la régulation de nombreux gènes liés à la formation du biofilm et à l'antibiorésistance via des régulateurs de la transcription ; 6) la présence de nombreuses pompes à

efflux qui permettent de rejeter les antibiotiques hors de la bactérie ; 7) la communication importante entre les bactéries via le **quorum sensing** et le **transfert de gènes** ; 8) les **cellules persistantes** (des cellules en dormance au centre du biofilm pauvre en oxygène) qui sont moins sensibles aux antibiotiques et qui forment un cœur particulièrement persistant (entre autre car la production de ROS provoquée par les antibiotiques est limitée et que certains antibiotiques n'impactent que les cellules en croissance).

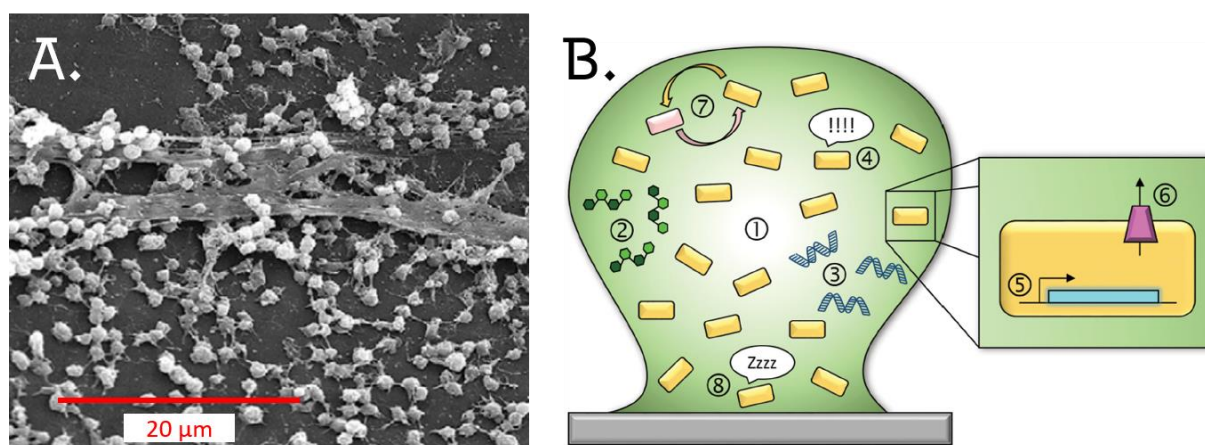


Figure 3 – Biofilms : A. Photographie au microscope à balayage d'un biofilm de *S. aureus* à la surface d'un dispositif médical (tirée de Donlan, 2002²²) ; **B.** Schéma des différents mécanismes de résistances aux antibiotiques au sein d'un biofilm bactérien (tiré de Hall and Mah, 2017²¹)

1) gradient de nutriment ; 2) exopolysaccharides ; 3) ADN extracellulaire ; 4) adaptation au stress oxydatif (ROS) ; 5) régulation de la transcription de certains gènes ; 6) pompe à efflux ; 7) communications intercellulaire (*quorum sensing*, transfert de gènes) ; 8) cellules persistantes (voir paragraphe précédent)

Si on observe des biofilms sur notre peau avec les bactéries commensales de notre flore cutanée, qui constituent alors une défense contre d'autres bactéries potentiellement pathogènes, on les retrouve aussi sur les surfaces utilisées dans les soins dans les hôpitaux (cathéters, instruments chirurgicaux, endoscopes ...) où ils peuvent être à l'origine de **maladies nosocomiales**, mais également dans certaines **blessures chroniques** impliquant *Staphylococcus aureus* (Gram+) ou encore *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-)²³.

La résistance aux antibiotiques pose actuellement un problème sanitaire majeur car la découverte de nouveaux antibiotiques, de surcroît avec des mécanismes d'actions contournant ces résistances, a ralenti ces dernières années². Ainsi, il a été estimé en 2014 que le nombre de décès dus à des infections par des souches résistantes était de 50 000 par an en Europe et de 700 000 par an dans le monde². L'étude a également estimé que ce nombre pourrait atteindre 10 millions de décès par an d'ici 2050 si la résistance aux antibiotiques continuait de se répandre². Une étude de 2019 est arrivée à une conclusion encore plus alarmante, avec une estimation de 1,27 millions de

décès en 2019 dus à des bactéries multirésistantes³. En effet, l'usage parfois encore immodéré des antibiotiques, combiné à la dispersion non-spécifique des gènes de résistance entre les bactéries, tend à propager cette résistance notamment à des souches n'étant normalement pas exposées à ces antibiotiques¹. Les bactéries posant le plus de problèmes actuellement par leur multirésistance sont les bactéries dites « **ESKAPE** » : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et diverses souches d'*Enterobacter* spp²⁴. Elles sont donc naturellement au centre des études axées sur l'activité antibactérienne.

Plusieurs stratégies de lutte sont aujourd'hui étudiées contre ces bactéries multi-résistantes.

Parmi elles, on retrouve l'association de plusieurs antibiotiques, permettant une activité synergique et un plus large spectre d'activité²⁴. Les molécules actives peuvent aussi être associées à des adjuvants peu ou pas actifs mais permettant de contourner la résistance et ainsi restaurer l'activité de l'antibiotique²⁴. On retrouve aussi l'utilisation de nanoparticules de métal, en particulier les nanoparticules d'argent notamment en revêtement sur des catethers^{24,25}.

Cette thèse s'inscrit donc dans la recherche d'associations antibactériennes nouvelles, ici entre des molécules d'origine végétale et un métal sur la base de manuscrits médicaux de l'époque médiévale. Ces écrits décrivent la pharmacopée utilisée par Al-Kindī, un médecin (mais aussi philosophe, mathématicien, astronome, physicien, musicien) ayant exercé au sein des Califats Islamiques durant le 9^{ème} siècle.

2. Les pharmacopées médiévales arabes (Ph. Méd. Ar.)

Cette étude se base sur un savoir traditionnel, son approche scientifique relève donc de l'**ethnopharmacologie**. L'ethnopharmacologie se définit comme « l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, mises en œuvre par les cultures traditionnelles pour modifier l'état des organismes vivants, à des fins thérapeutiques, curatives, préventives ou diagnostiques »²⁶. En sélectionnant ainsi des ingrédients d'origine naturelle sur la base de leurs usages traditionnels, cette approche permet notamment d'isoler des composés biologiquement actifs, alors appelés « composés d'origine naturelle », dont des antibactériens²⁷. Il existe une grande quantité et une grande diversité de drogues et de composés d'origine naturelle, rendant difficile leur criblage systématique sur toutes les activités biologiques sans aucune pré-sélection²⁸ : **s'inspirer des us et coutumes traditionnels permet alors de choisir les drogues à étudier et pour quelle activité biologique les tester, en plus d'enrichir notre compréhension de ces médecines traditionnelles**²⁹⁻³².

Les sources de ces connaissances traditionnelles peuvent être orales ou écrites en fonction de la méthode de transmission employée. Toutefois, dans le cas de pratiques anciennes tombées en désuétude, seules celles ayant employé une transmission écrite pourront être étudiées, si tant est que des exemplaires aient réussi à atteindre notre époque. Ces écrits regroupant des drogues et des remèdes sont appelés des **pharmacopées**, ce terme désignant également l'ensemble des remèdes et des drogues d'une médecine traditionnelle. L'étude de ces pharmacopées écrites anciennes fait alors appel à la fois à l'histoire, à la biologie et à la chimie (mais aussi d'autres disciplines en fonction des sujets) afin de reproduire le remède, dans le but de tester et comprendre son efficacité²⁹⁻³². **Parmi ces pharmacopées écrites passées, on retrouve celle datant de l'apogée des sciences dans les Califats Islamiques, soit entre le 8^{ème} et le 13^{ème} siècles.** De nombreux écrits médicaux ont été rédigés et certains ont traversé les âges jusqu'à notre époque, notamment des pharmacopées manuscrites appelées *aqrābādhīnāt* (*aqrābādhīn* au singulier) où les praticiens consignaient des listes de remèdes avec leur usage médicinal, leur mode de préparation et posologie ainsi que leur mode d'administration sur le patient.

En plus de ces traces écrites, la Ph. Méd. Ar. est une source particulièrement intéressante du fait qu'elle soit l'héritage des connaissances grecques, perses et indiennes sanskrites³³. La plus grande valeur de cette pharmacopée est qu'il ne s'agit pas d'une vision purement théorique mais d'une version rationalisée de ces connaissances, enrichie par la mise en pratique des médecins arabes^{33,34}. En effet, la médecine arabe a développée à cette époque des *bīmāristāns*, des hôpitaux inspirés des monastères chrétiens offrant refuge et soins aux pauvres³⁵. Il s'agissait de structures

complexes, avec des bâtiments dédiés selon les soins à apporter (ophtalmologie, fractures ... etc.). Certains hôpitaux allaient jusqu'à se spécialiser avec des aménagements pour les officiers de l'armées, les pauvres ou les fous³⁵. Ces lieux regroupaient d'une part les patients admis ou venant consulter, mais également des étudiants venant y suivre un enseignement pratique³⁵. En effet, si les *bīmāristāns* permettaient de suivre les malades durant l'application du traitement et d'ainsi faire des ajustements en fonction des observations, c'était également une plateforme d'échange entre de nombreux médecins³⁵. Cette administration des médecins entre eux a permis d'organiser et codifier la médecine et d'ainsi faire une différence entre le médecin instruit et le charlatan³⁵.

Par ailleurs, en plus de ces manuscrits, on retrouve énormément d'éléments de cette médecine arabe médiévale dans la médecine européenne suite à la traduction en latin de textes philosophiques et scientifiques au 12^{ème} siècle³⁶. L'auteur le plus traduit et étudié est certainement Ibn-Sina, souvent appelé Avicenne : son ouvrage « Le Livre de la Loi concernant la médecine » ou *Qanūn* a fait partie de la médecine enseignée en Europe jusqu'au 16^{ème} siècle³⁶ et était encore une référence médicale au 18^{ème} siècle³⁷. Ce lien étroit à la médecine arabe médiévale a perduré en Europe jusqu'aux 19^{ème} et 20^{ème} siècles dans des ouvrages sur les sciences naturelles ou la pharmacie, me permettant ainsi, dans le cadre de cette étude, de [faire le lien entre les noms vernaculaires de certaines drogues végétales et les dénominations scientifiques actuelles](#).

Les deux remèdes sélectionnés pour cette étude proviennent de la traduction et facsimilé d'une partie du manuscrit MS.3603, conservé à la Bibliothèque Mahmut I de la mosquée Sainte-Sophie (Aya Sofia) à Istanbul (Turquie). Ce manuscrit est le seul exemplaire existant de la pharmacopée d'Al-Kindī (ʿAbū Yūsuf Yaʿqūb ibn Ishāq al-Kindī), à notre connaissance. [Ce philosophe, mathématicien et médecin a exercé durant la période abbasside des Califats Islamiques \(Figure 4\), durant le 9^{ème} siècle \(~800 – 870\) à Bagdad dans l'actuelle Irak³⁸.](#)

La présente étude s'est appuyée sur la traduction existante³⁹ mais également sur l'expertise de l'historienne Véronique PITCHON, travaillant également avec la version numérique du manuscrit en langue arabe ainsi que sur d'autres textes de cette Ph. Méd. Ar.

Les trois éléments caractéristiques de ces remèdes sont :

- 1) leur usage sur des [infections cutanées](#) de type abcès ;
- 2) la présence de [drogues végétales](#) sous la forme d'exsudats (latex, résine, gomme ...) ;
- 3) la présence de [métal](#), à savoir le cuivre sous la forme de vert-de-gris.

Nous allons apporter plus de précisions sur ces 3 aspects dans les paragraphes suivants.

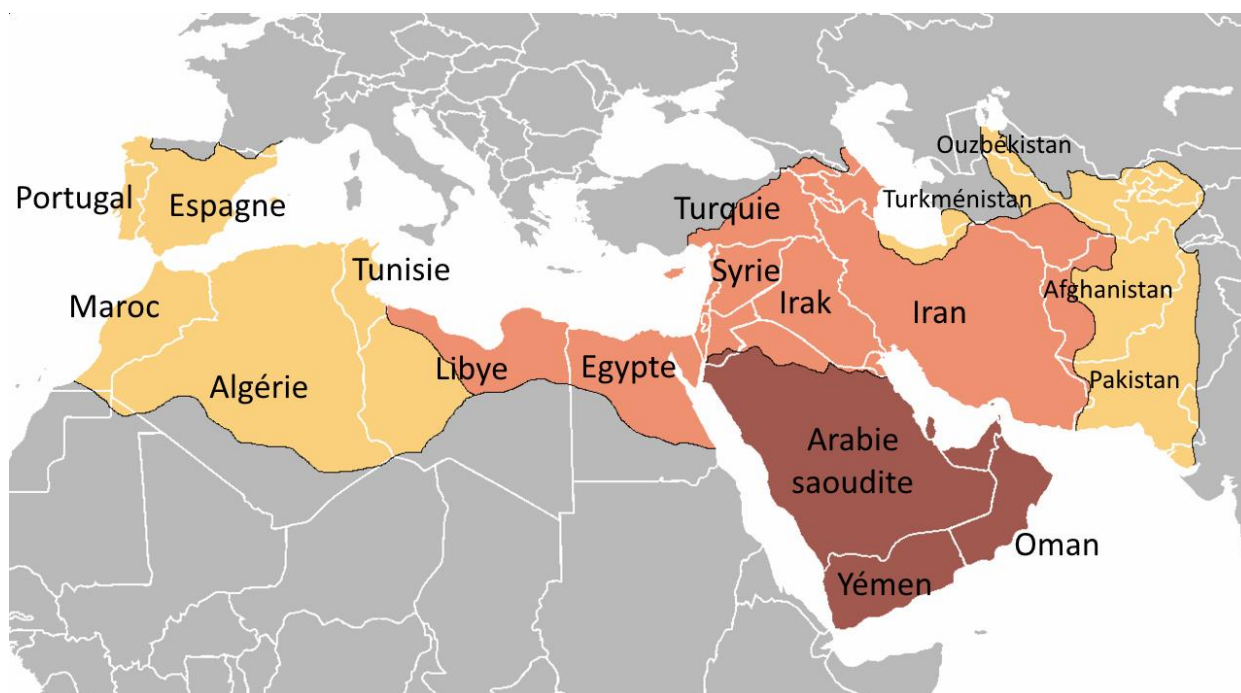


Figure 4 - Carte simplifiée de l'expansion des Califats Islamiques : 622-632 expansion sous Mahomet ; 632-661 expansion pendant le Califat des patriarches ; 661-750 expansion pendant le Califat des Omeyyades (à partir d'une carte cédée au domaine publique⁴⁰)

3. Les abcès cutanés infectieux, des infections aux multiples facettes

3.1. Les abcès cutanés infectieux, généralités

Les infections cutanées, et plus précisément les abcès infectieux, sont généralement dues à la pénétration accidentelle dans notre organisme de bactéries commensales vivant sur notre peau. En effet notre peau est recouverte d'environ 10^{10} bactéries, réparties dans des microenvironnements en fonction du pH, de l'humidité ou de la quantité de sébum présente, avec différentes espèces de bactéries dominantes selon les paramètres de ces microenvironnements¹³. On va les trouver sur les cellules superficielles, dans les cellules mortes mais aussi dans les glandes sébacées et sudoripares de la peau¹³. La peau, qui est leur habitat, constitue une barrière les empêchant de devenir pathogènes : cet épithélium stratifié et kératinisé desquame continuellement, éliminant ainsi les microorganismes ayant commencé à pénétrer la strate supérieure¹³. La flore cutanée est ainsi maintenue à la surface et participe à la défense contre d'autres microorganismes¹³. Mais certaines bactéries de cette flore peuvent devenir pathogènes si leurs conditions environnementales changent : c'est le cas de *S. aureus* et de plusieurs autres staphylocoques comme *S. epidermidis*^{13,17}. Cela peut notamment arriver suite à une rupture de la barrière de la peau¹⁸ (**Figure 5**) : l'infection bactérienne pourra alors donner lieu à une accumulation de pus à cet endroit qu'on appellera abcès, et si cette infection a lieu au niveau d'un follicule pileux on parlera de furoncle¹⁷.

Lors de l'entrée des bactéries dans les tissus, une réaction inflammatoire aiguë va se mettre en place. Dans un premier temps, les cellules immunitaires résidentes vont s'activer et produire divers médiateurs pour informer et recruter d'autres cellules immunitaires. Une vasodilatation et une perméabilisation locale des vaisseaux va se mettre en place afin de laisser passer les cellules immunitaires du sang, notamment les phagocytes. C'est cette vasodilatation qui va causer la rougeur typique d'une inflammation aiguë, tandis que la perméabilité va permettre à divers fluides de passer et ainsi causer un gonflement mais également une augmentation de la température^{12,13}. La pression due à cet œdème va participer à la douleur ressentie, de même que les toxines sécrétées par les bactéries ou l'endommagement de nerfs¹².

En parallèle, des phagocytes vont être attirés par divers médiateurs sur le lieu de l'infection¹² (**Figure 5**). Ces médiateurs peuvent être des substances relarguées par les cellules endommagées comme l'histamine ou les prostaglandines, mais également provenir des cellules de Langerhans¹². Ces cellules dendritiques du système immunitaire sont présentes dans la peau au niveau des

kératinocytes et sont activées par des signaux endogènes (stress, lésion, mort cellulaire anormale) ou exogènes (pathogènes) : elles produisent alors des cytokines et sont capables (après phagocytose et métabolisation) de présenter des antigènes aux lymphocytes^{12,41}. Les phagocytes recrutés par ces médiateurs vont principalement être des neutrophiles (*PolyMorphonuclear Cells* ou PMN en anglais) puis, plus tard dans la réponse inflammatoire, des monocytes qui vont se différencier en **macrophages**¹². Ces différents phagocytes sont également capables de phagocytose mais aussi de détruire les bactéries en libérant des ROS, dont le **monoxyde d'azote**⁴². Ces cellules phagocytaires mourront une fois qu'elles auront phagocyté un certain nombre de bactéries et/ou de débris cellulaires¹².

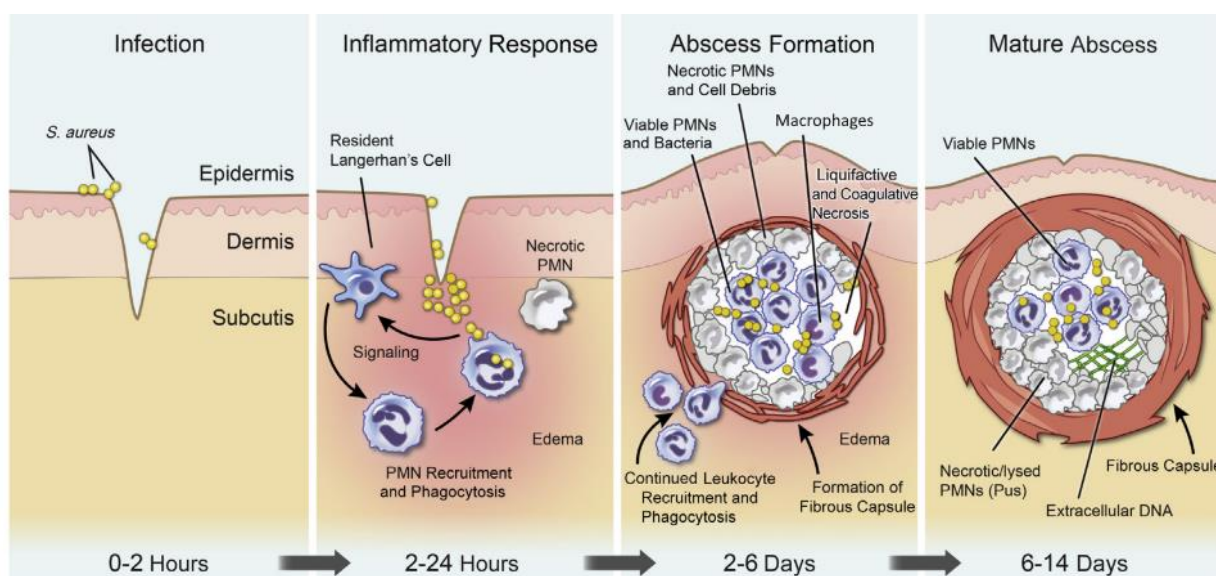


Figure 5 – Schéma de la formation d'un abcès cutané induit par *S. aureus* (tiré de Kobayashi et al, 2015¹⁸)

En cas de persistance des bactéries pathogènes, une capsule de fibrine va se former autour du site d'infection afin de la circonscire et d'ainsi limiter la propagation des bactéries^{12,13} (**Figure 5**) : c'est l'abcès. À l'intérieur on va retrouver des bactéries, des cellules mortes suite à l'infection (nécrose) mais également de la fibrine, des neutrophiles et des macrophages¹². Ces diverses cellules mortes vont s'accumuler et former le pus¹². Cette accumulation peut parfois amener le pus à sortir du corps ou au contraire à former une cavité (le pus est alors graduellement dégradé et réabsorbé par le corps)¹².

La dernière étape de l'inflammation est la réparation des tissus : elle commence dès la maturation de l'abcès (**Figure 5**)¹². Il s'agit d'une phase de prolifération : de nouvelles cellules vont proliférer et se différencier afin de reformer du tissu au niveau du vide laissé par l'abcès¹². Ce premier tissu est temporaire et fragile mais il va devenir de plus en plus résistant durant la phase de remodelage¹². Cette phase de prolifération se caractérise notamment par la **migration des**

fibroblastes (cellules du derme), la formation d'une matrice extracellulaire et du tissu de granulation⁴³.

Un abcès cutané va donc impliquer une infection bactérienne mais également une réaction inflammatoire, de la douleur et potentiellement une cicatrisation, ces éléments étant tous étroitement liés. Dans cette étude, nous nous sommes donc particulièrement intéressés à l'activité antibactérienne sur *S. aureus* mais aussi à l'aspect inflammatoire de l'abcès. Pour cela, plusieurs mesures ont été réalisées sur le TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire libérée par des cellules endommagées permettant notamment de recruter et activer les macrophages⁴⁴, et le monoxyde d'azote, un régulateur de la réponse inflammatoire à de nombreux niveaux et une défense chimique contre les pathogènes⁴⁵. Pour la phase de réparation des tissus, nous avons étudié la migration des fibroblastes impliquée dans le phénomène de cicatrisation⁴³.

3.2. Les abcès cutanés infectieux dus à *Staphylococcus aureus*

Les abcès cutanés infectieux sont décrits comme majoritairement dus à *S. aureus*¹⁷, cette bactérie étant présente dans la flore cutanée normale de 50 à 60% des individus¹⁸. Mais des streptocoques comme *Streptococcus pyogenes*, des entérocoques ou des bactéries Gram- comme *P. aeruginosa* ou *Escherichia coli* peuvent également être impliqués⁴⁶. Actuellement, on soigne toujours un abcès en l'incisant et en le drainant⁴⁷, l'usage d'anti-inflammatoires étant considéré comme potentiellement risqué en pleine infection bactérienne⁴⁸. L'usage d'antibiotiques n'est réservé qu'aux abcès sévères (par exemple avec plusieurs sites d'infections) ou ayant une progression rapide montrant notamment des signes d'infection systémique⁴⁷. On peut les utiliser également lorsque l'abcès se trouve dans une zone difficile à drainer (par exemple le visage, les mains ou les parties génitales)⁴⁷. Ces antibiotiques peuvent être administrés de manière topique pour les infections mineures de la peau ou l'infection de lésions, et par prise orale ou en intraveineuse pour les infections les plus problématiques⁴⁷.

Initialement les antibiotiques de la famille des β -lactamines (**Figure 6**) étaient utilisées pour les différentes infections cutanées, mais la propagation de souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline **1** SARM (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* ou MRSA en anglais) ainsi qu'à d'autres antibiotiques a amené à l'utilisation d'autres classes d'antibiotiques. Par exemple, les souches de *S. aureus* responsables d'infections nosocomiales dans les hôpitaux allemands montrent une résistance à l'oxytétracycline **2**, l'érythromycine **3** et la gentamicine **4** (**Figure 6**)⁴⁹. Les antibiotiques actuellement utilisés en cas d'infection légères et locales (n'incluant pas les abcès) avec une souche SARM sont la mupirocine **5** (**Figure 7**) sous forme de pommade⁴⁷, et pour les infections problématiques les antibiotiques conseillés sont la vancomycine **6**, la télavancine **7**, le linézolide **8**, la clindamycine **9**, et la daptomycine **10**⁴⁷ (**Figure 8**).

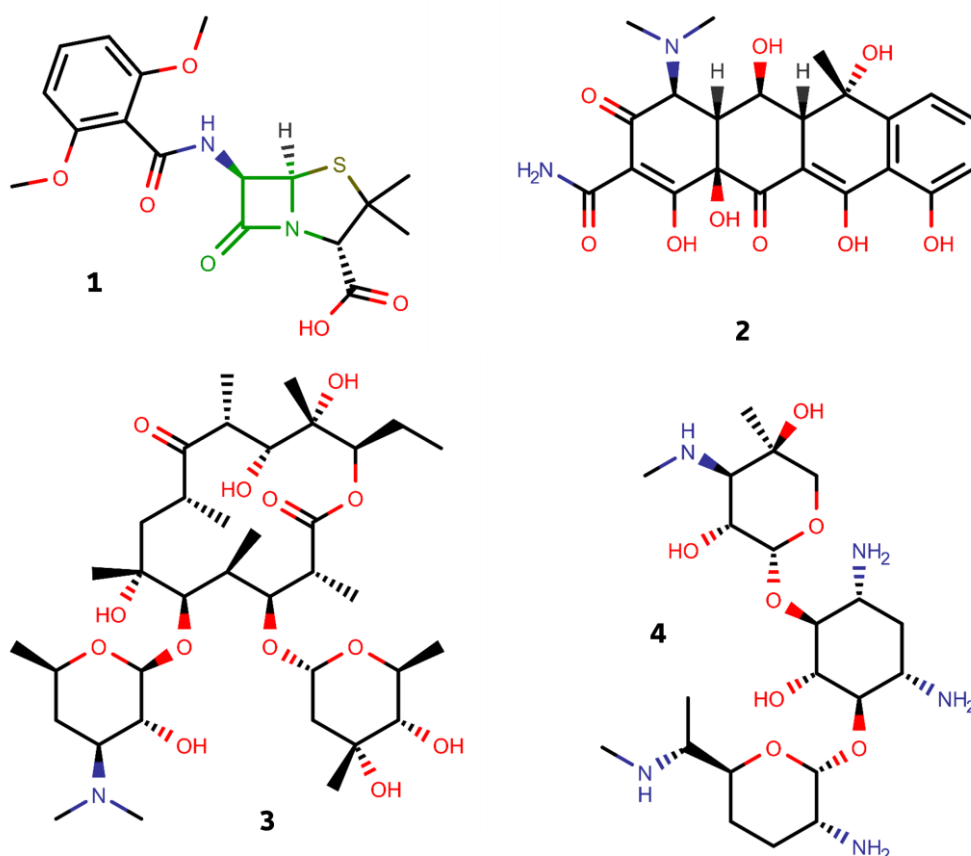


Figure 6 – Structures d'antibiotiques auxquels de nombreuses souches *S. aureus* sont devenues résistantes : la méticilline **1** (noyau β -lactame, famille des β -lactamines, inhibe la synthèse de l'enveloppe), l'oxytétracycline **2** (famille des cyclines, inhibe la synthèse des protéines), l'érythromycine **3** (famille des macrolides, inhibe la synthèse des protéines) et la gentamicine **4** (famille des aminosides, inhibe la synthèse des protéines)

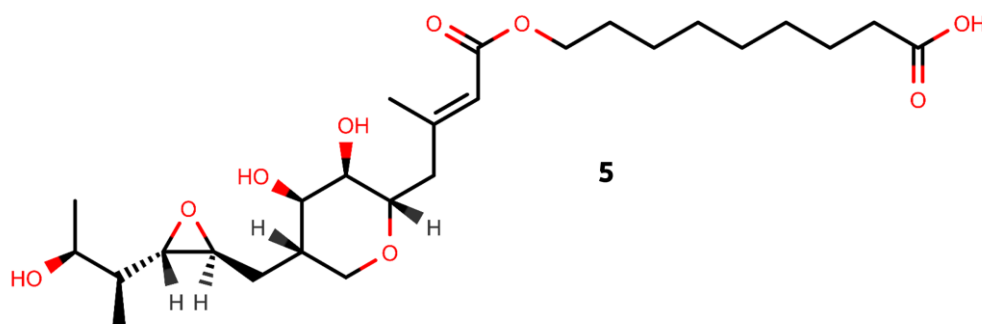


Figure 7 – Structure de la mupirocine **5**, un antibiotique d'application topique et locale contre des infections cutanées par des staphylocoques (antibiotique produit par fermentation de *Pseudomonas fluorescens*, inhibe la synthèse des protéines)

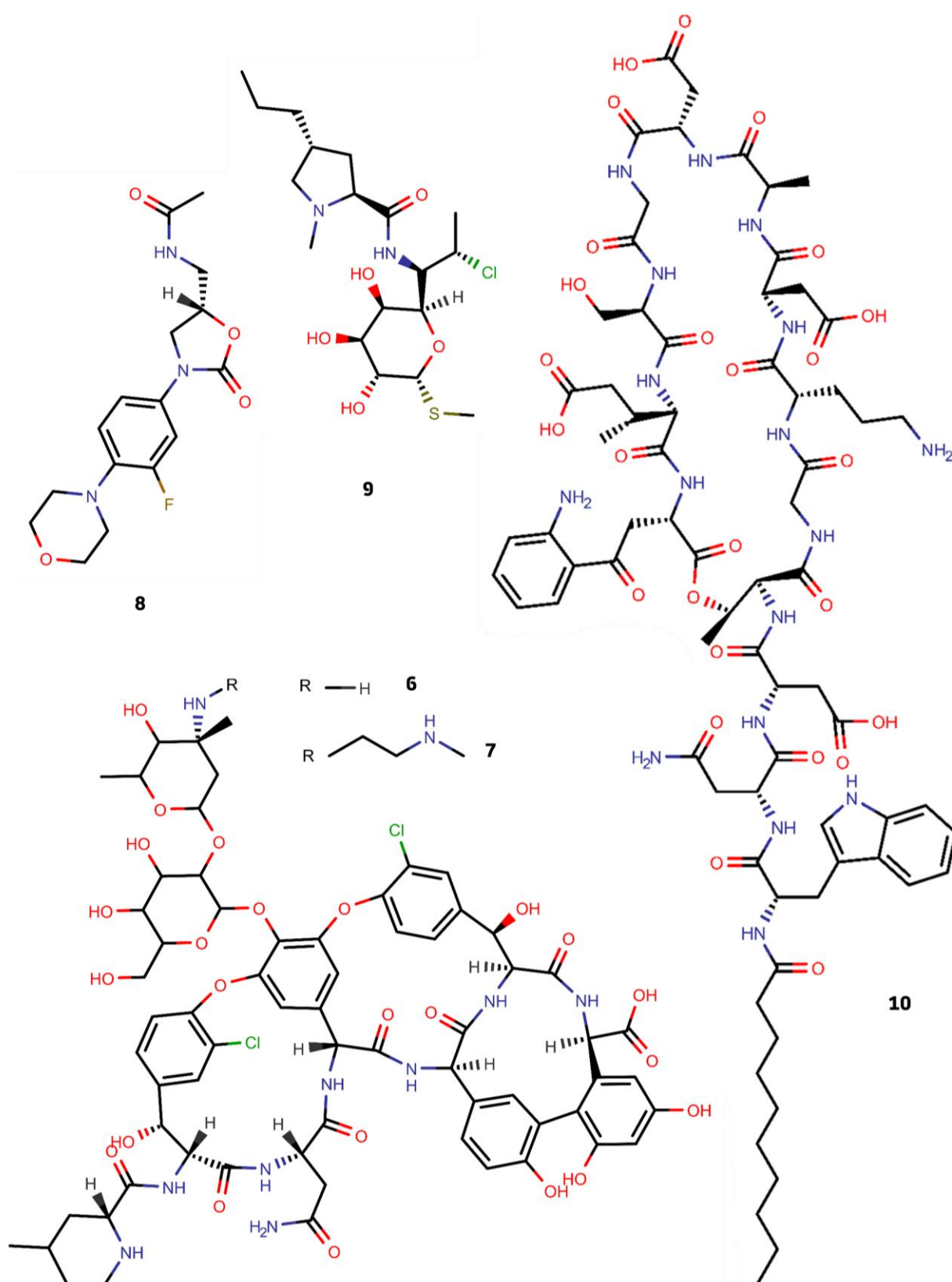


Figure 8 – Structures d'antibiotiques actuellement utilisés contre des infections causées par *S. aureus* (voies orale ou intraveineuse) : la vancomycine **6** (famille des glycopeptides, inhibe la synthèse de l'enveloppe), la télavancine **7** (famille des glycopeptides, inhibe la synthèse de l'enveloppe), le linézolide **8** (famille des oxazolidinones, inhibe la synthèse des protéines), la clindamycine **9** (famille des lincosamides, inhibe la synthèse des protéines) et la daptomycine **10** (famille des lipopeptides, inhibe la synthèse de l'enveloppe)

Cette situation sanitaire pousse donc la recherche vers de nouveaux moyens de lutte capable de contourner les mécanismes de résistance de ces pathogènes. Parmi les réponses proposées, on retrouve l'utilisation de métaux, délaissés depuis le développement d'antibiotiques car également toxiques sur l'être humain, ainsi que le criblage de composés d'origine végétale, les plantes étant capables de synthétiser une grande diversité de structures originales.

4. La présence des plantes dans la médecine traditionnelle et moderne pour un usage antibactérien

Les végétaux sont une source importante et diversifiée de nouveaux composés actifs, biosynthétisés soit par la plante seule, soit en synergie avec des champignons endophytes^{50,51}. De tout temps, les humains mais également d'autres mammifères se sont soignés à l'aide des plantes trouvées dans leur biotope⁵². L'usage de ces plantes est commun à toutes les médecines traditionnelles, qu'elles soient orales ou écrites, passées ou encore actuelles : les végétaux composent ainsi une grande parties des pharmacopées traditionnelles⁵².

La pharmacognosie est l'étude scientifique des drogues d'origine naturelle et concerne aujourd'hui majoritairement des drogues végétales. Elle tend à définir pour chacune des drogues l'identité botanique, la partie de la plante utilisée, le mode de préparation et d'administration mais également les activités biologiques, les espèces chimiques en présence et la relation structure-activité, aujourd'hui principalement dans le but de développer une application clinique^{28,29,52,53}. De nombreuses études de pharmacognosie démontrent l'activité d'extraits de plantes médicinales *in vitro* ou sur modèles animaux, permettant ainsi en partie d'expliquer leurs usages traditionnels dans divers remèdes^{54,55}. De nombreuses études phytochimiques caractérisent quant à elles les composés présents dans différents extraits de plantes d'intérêt⁵⁶⁻⁵⁸. Enfin, certaines études combinent ces deux aspects, en caractérisant à la fois l'activité biologique et les composés pouvant être responsables de cette activité^{53,59}, parfois sans se baser sur un usage traditionnel particulier¹⁶. Les études sur des remèdes entiers sont quant à elles plus rares car plus longues et complexes à mettre en place : elles demandent de prendre en compte plusieurs ingrédient ainsi que le mode de préparation qui peut se révéler essentiel³⁰⁻³².

4.1. Les molécules antibactériennes issues des végétaux

Les plantes possèdent une activité antibactérienne via différentes familles de composés et pour différentes souches, mêmes antibiorésistantes^{60,61}. Des extraits associés avec des antibiotiques ont même permis de contourner certaines résistances, notamment par inhibition des pompes à efflux^{62,63}. L'activité antibiofilm d'extraits de plantes et de composés d'origine végétale a également été observée, comme l'extrait éthanolique de feuilles de *Piper betle* L. (*Piperaceae*, 1753) ou la phlorétine⁶⁴.

Parmi les familles phytochimiques comportant des composés antibactériens, on retrouve les terpènes (**Figure 9-A.**), une famille phytochimique très diversifiée⁶⁵. L'activité des terpènes est imputée à leur lipophilie, qui leur permettrait de perturber la membrane bactérienne. C'est le cas en

particulier pour les monoterpènes comme le thymol **11** avec une CMB de 6,5 µg/mL sur *S. aureus*, ainsi que pour certains sesquiterpènes comme le nérolidol **12** avec une Concentration Minimale Bactéricide CMB de 40 µg/mL sur *S. aureus* ou le farnésol **13** avec une CMB de 20 µg/mL sur *S. aureus*⁶⁵. Certains dérivés de terpènes sont également actifs, la partie terpénique participant à l'activité en facilitant la pénétration dans les bactéries, y compris chez les mycobactéries dont la paroi est cireuse et particulièrement imperméable⁶⁵. Les terpènes sont aussi décrits comme altérant la respiration cellulaire chez la bactérie⁶⁶.

On retrouve également les coumarines⁶⁵ (**Figure 9-B.**). Si le mécanisme antibactérien exact de chaque coumarine n'est pas connu, plusieurs études montrent qu'elles peuvent inhiber l'ADN gyrase (comme l'aegelinol **14**, avec une CMB de 16 µg/mL sur *S. aureus*) et les pompes à efflux⁶⁵. D'autres études suggèrent qu'elles pourraient aussi perturber la formation de biofilm en supprimant la détection du *quorum* (ou *quorum sensing* en anglais)⁶⁵. Leur activité serait également due à leur propriété lipophile et leur structure plane qui pourraient alors faciliter la pénétration dans la bactérie, en particulier chez les souches Gram+⁶⁵. Les coumarines ont par ailleurs d'autres effets biologiques, notamment une activité anticoagulante⁶⁷.

D'autres familles phytochimiques comportent également des composés antibactériens, comme les alcaloïdes, les composés organosulfurés, les composés phénoliques, les lectines et les polypeptides^{60,65}.

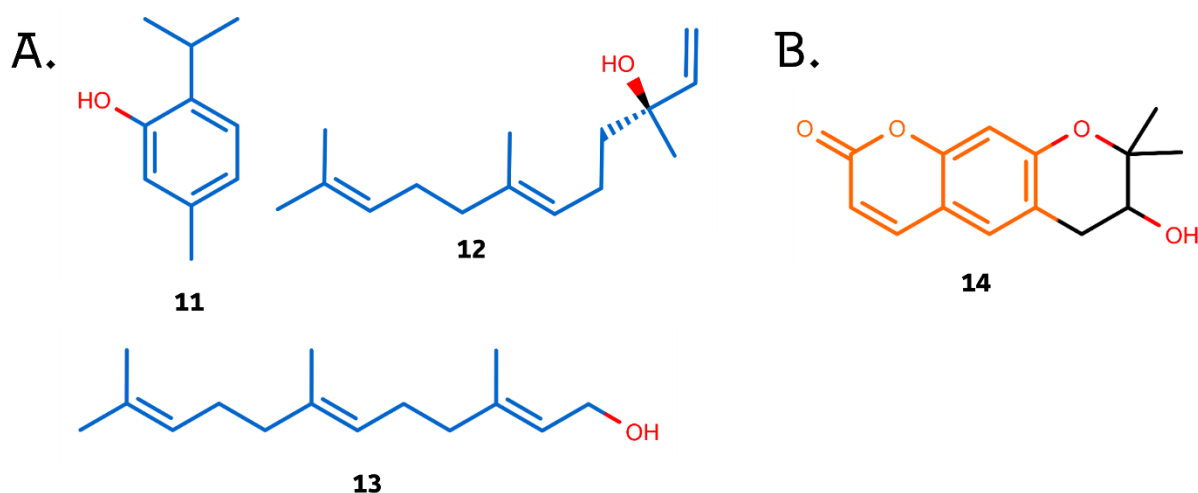


Figure 9 – Deux familles phytochimiques comportant des composés antibactériens : **A.** Les terpènes dont le thymol **11** (monoterpène C10), le nérolidol **12** et le farnésol **13** (sesquiterpènes C15) ; **B.** Les coumarines dont l'aegelinol **14** (noyau coumarine)

4.2. L'exemple des cônes femelles de houblon

Nous avons choisi d'utiliser, comme témoin positif dans nos tests antibactériens et comme extrait de référence, un extrait d'une drogue végétale connue pour son activité antibactérienne : les cônes femelles de houblon *Humulus lupulus* L. (1978, *Cannabaceae*), ici sous la forme d'un extrait méthanolique. En effet cette drogue est décrite pour son fort potentiel antibactérien sur les souches Gram+, en particulier les extraits riches en composés phénoliques prénylés, comme les acylphloroglucinols prénylés dont font partie les dérivés d'humulone **15** et de lupulone **16** (Figure 10-A.) ou les chalcones prénylées dont fait partie le xanthohumol **17** (Figure 10-B.)⁶⁸. Dans la littérature, différents extraits de houblon ont déjà montré des CMI indiquant une activité significative sur *S. aureus*⁶⁸. Un extrait à l'EtOH 96% (60 °C, 24h) a notamment donné des CMI entre 1,3 et 2,9 µg/mL sur *S. aureus* ATCC25923⁶⁹, tandis qu'un extrait à l'EtOH 70% (60°C, 1h) a présenté une CMI de 31 µg/mL sur deux isolats cliniques, contre 125 µg/mL sur la souche de laboratoire *S. aureus* ATCC29213⁷⁰.

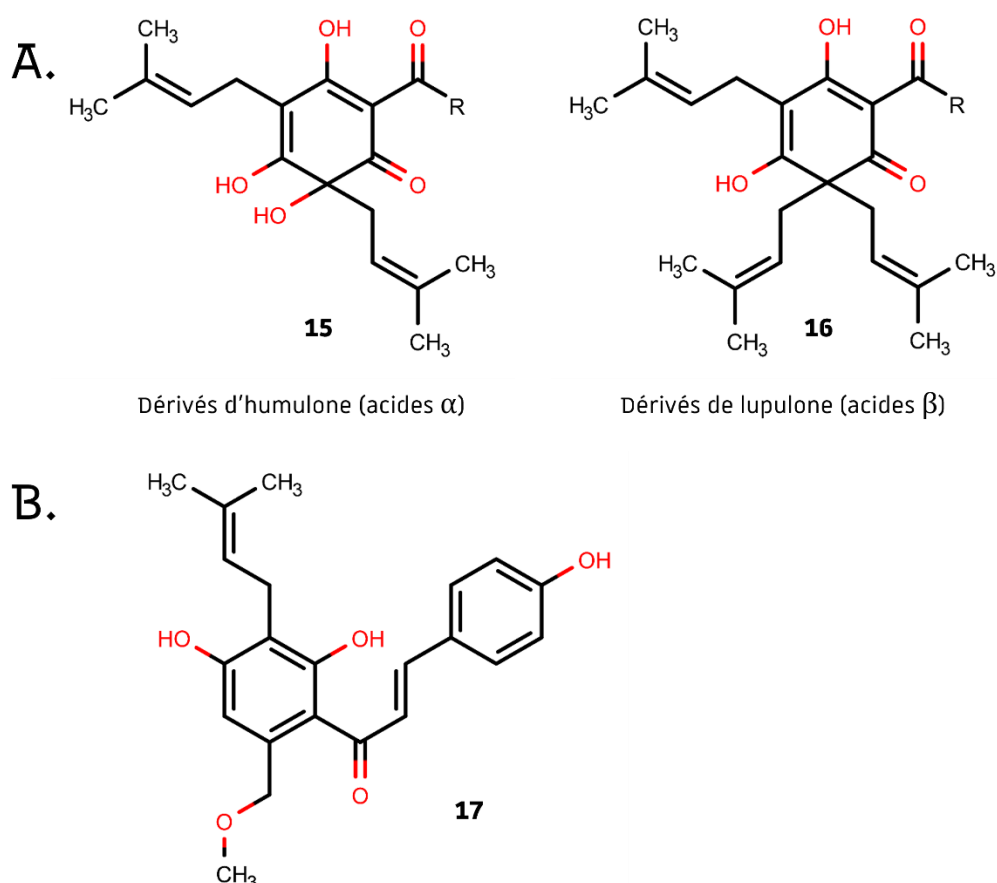


Figure 10 – Composés phénoliques prénylés actifs des cônes femelles d'*H. lupulus*⁶⁸ : **A.** acylphloroglucinols prénylés (dérivés d'humulone **15** et dérivés de lupulone **16**) ; **B.** chalcones prénylées (xanthohumol **17**)

Les plantes sont donc une source attestée de composés biologiquement actifs, dont des composés antibactériens. Leur faible présence sur le marché par rapport aux antibiotiques d'origine microbienne ou de synthèse s'explique par des contraintes d'approvisionnement en matière première (écologiques, législatives, variabilité chémotypique), de synthèse totale ou d'hémisynthèse (structures complexes à entièrement synthétiser ou modifier, avec de nombreux centres chiraux) et de compréhension du mécanisme d'action²⁸. Par ailleurs les composés d'origine végétale ont généralement une activité antibactérienne plus basse et touchent peu ou pas les bactéries Gram ⁻⁷¹.

5. La présence des métaux dans la médecine traditionnelle et moderne pour un usage antibactérien

Les propriétés antibactériennes des métaux, et notamment du cuivre, sont utilisées depuis des siècles. Par exemple, de la vaisselle en cuivre et en argent était utilisée pour désinfecter l'eau et pour préserver la nourriture dans l'Empire Perse, en Grèce Antique, dans l'Empire Romain et en Egypte Antique⁴. De même, des baignoires et des canalisations en cuivre étaient utilisées dans l'Empire Romain ainsi que dans les différentes civilisations du Moyen-Orient pour l'hygiène publique, ce genre de canalisations étant encore utilisées de nos jours⁷². On retrouve également les métaux dans diverses pharmacopées, que ce soit dans le papyrus d'Edwin Smith datant de 1500 ans av. J.-C.⁴ ou dans la pharmacopée ayurvédique⁷³. L'usage de métaux en cas d'infections était par ailleurs encore répandu (notamment contre la lèpre, la tuberculose, la gonorrhée et la syphilis, en application topique ou en injection) avant la découverte des antibiotiques par A. Fleming dans les années 1920⁴.

En plus du développement des antibiotiques, la toxicité des métaux dans certaines affaires sanitaires de grande ampleur a fortement contribué à leur délaissement. On peut citer le Stalinoon, une gélule contenant de l'étain sous forme de diiododoéthylétain destinée à soigner les furonculoses, qui a causé une centaine de morts et de nombreuses invalidités entre 1953 et 1954, obligeant l'Etat Français à modifier la réglementation au sujet des spécialités pharmaceutiques⁷⁴. Le saturnisme, un empoisonnement au plomb, a fait de nombreuses victimes au début du 20^{ème} siècle chez des travailleurs en contact régulier avec ce métal. Il a également touché des enfants via la peinture au plomb utilisée pour les murs d'anciennes habitations et certains jouets, ou encore le colorant alimentaire jaune de plomb : ces incidents ont abouti là aussi à la modification de la réglementation dans de nombreux pays⁷⁵. Toujours au début du 20^{ème} siècle, les traitements de la syphilis par injection de préparations contenant du mercure, de l'arsenic et du bismuth ont causé des nécroses locales, des empoisonnements des reins et parfois la mort des patients⁷⁶. De régulières intoxications dues à la présence de métaux lourds dans des plantes bio-accumulatrices ayant poussé sur des sols contaminés, notamment des plantes utilisées dans des préparations traditionnelles, continuent d'alimenter la méfiance générale⁷⁷. Il est à noter que les remèdes étudiés ont une application topique : ce type d'application limite la toxicité du composé ou de la préparation administrée, en permettant d'atteindre localement une haute concentration de principes actifs pour une absorption systémique minimale⁷⁸.

5.1. Utilisation antibactérienne des métaux

Mais si l'intoxication aux métaux lourds est une réelle problématique, il s'agit, comme pour tous composés actifs, d'une question de dose, de maîtrise de cette dose et de libération sur le site d'action souhaité. De fait, les métaux sont actuellement encore utilisés en médecine, que ce soit sous forme de surfaces ou de revêtements antibactériens mais aussi sous la forme de complexes organométalliques (dont des chélates) ou de nanomatériaux⁴. Ainsi, il a été mis en évidence que certains métaux sous certaines formes étaient capables de détruire des biofilms de souches résistantes, d'agir en synergie avec d'autres antibiotiques, d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques et de tuer des bactéries multirésistantes⁴. Actuellement, des sels de gallium, des nanoparticules et des complexes d'argent sont particulièrement étudiés, parfois déjà utilisés^{24,78-80}.

Les mécanismes d'actions des métaux sont multiples et variables selon les espèces chimiques. Les métaux sont capables de perturber le métabolisme du fer Fe chez la bactérie : en effet ce métal est essentiel pour de nombreuses enzymes intervenant dans des mécanismes cellulaires essentiels comme la synthèse de l'ADN, le transport d'électrons ou encore la défense contre le stress oxydant⁴. Ils sont également capables de générer des ROS endommageant l'ADN bactérien et certains métaux vont endommager la membrane bactérienne tandis que d'autres vont perturber l'assimilation de nutriments par la bactérie⁴.

Les bactéries ont développé différentes adaptations à une forte concentration en métaux (**Figure 11**) : elles peuvent réguler l'expression de protéines important ces métaux dans le cytoplasme, les expulser via des pompes à efflux, les séquestrer à l'extérieur de la cellule (sidérophores, polymères extracellulaires) ou à l'intérieur de la cellule (cytoplasme, espace périplasmique) en les faisant précipiter, modifier les protéines impliquées pour qu'elles ne se lient plus à ces métaux ou avoir recours à une voie métabolique alternative n'utilisant pas de métal, ou bien réparer les composés dégradés⁴.

La **Figure 12** illustre les stratégies antibactériennes les plus courantes impliquant des métaux :

1) la chélation du fer, un métal essentiel à la bactérie, perturbant ainsi le métabolisme dépendant de ce métal^{81,82} ;

2) l'utilisation de métal dans un cheval de Troie : la bactérie produit des sidérophores, des chélateurs de fer, afin de ramener le métal essentiel à son métabolisme. Une stratégie consiste à associer un sidérophore (ici le déféroxamine DFO) non pas à du fer mais à un autre métal comme le gallium (de taille proche de celle du fer mais n'ayant pas les mêmes propriétés physicochimiques), afin de le faire entrer dans la bactérie, perturbant son métabolisme du fer et causant des dommages cellulaires^{4,81} ;

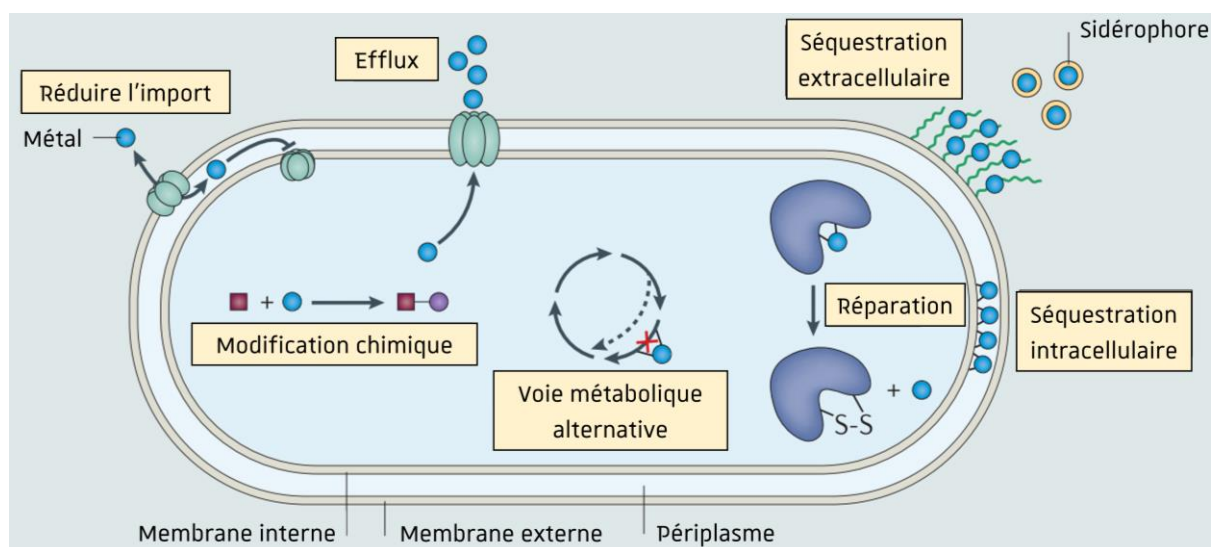


Figure 11 – Différents mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries (à partir de Lemire, Harrison et Turner, 2013⁴)

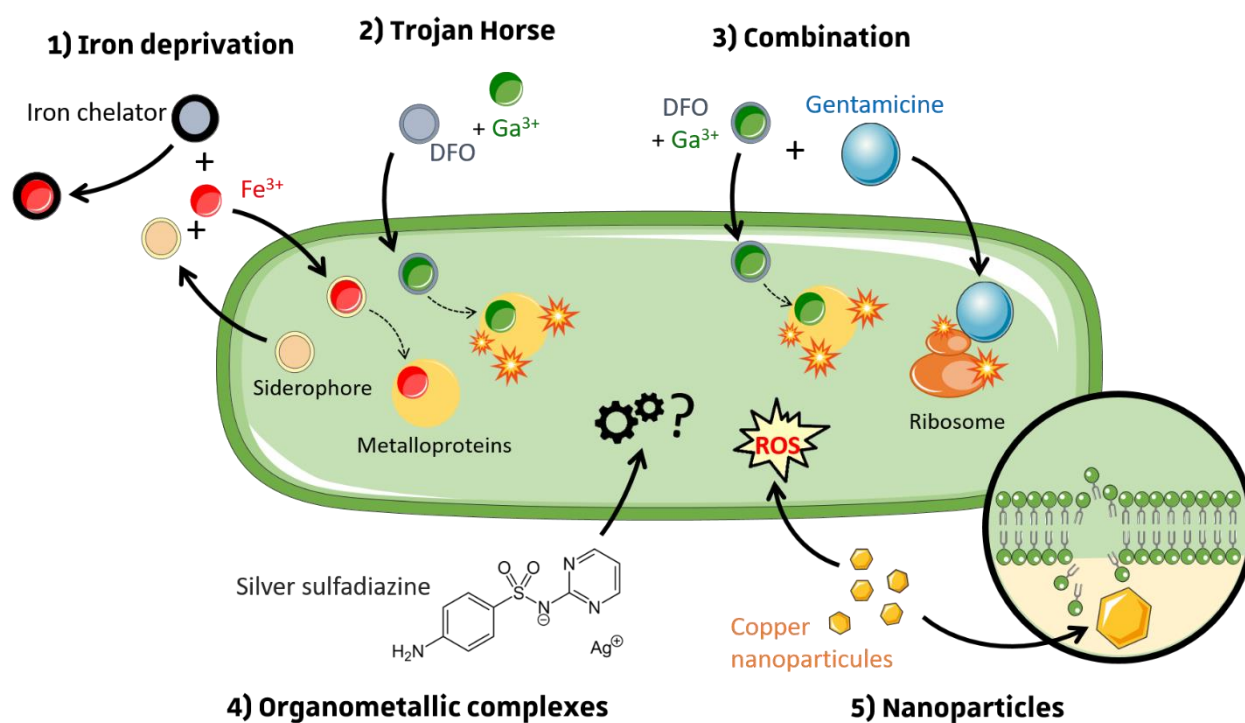


Figure 12 – Stratégies antibactériennes actuellement utilisées impliquant des métaux (modifiée à partir de Pitchon et al, 2022⁸¹)

1) privation de fer, un métal essentiel au métabolisme des bactéries ; 2) cheval de Troie, consistant à détourner les voies d'importation du fer que sont les sidérophores (ex : la déféroxamine DFO) pour faire rentrer un autre métal (ex : Gallium Ga) ; 3) association de métaux avec des antibiotiques afin d'améliorer ou restaurer leur activité ; 4) complexes organométalliques, avec divers mécanismes d'action n'étant pas encore totalement compris ; 5) nanoparticules, avec là aussi divers mécanismes d'action dont la génération de ROS et la rupture de la membrane (développé dans paragraphe précédent)

3) l'utilisation de métal comme adjuvant : certains métaux associés à des antibiotiques permettent d'améliorer leur activité, par exemple le gallium associé au sidérophore DFO va également améliorer l'activité de la gentamicine^{4,81} ;

4) les complexes organométalliques : différents complexes organométalliques comme le sulfadiazine argentique ont montré une activité antibactérienne, bien que leurs mécanismes d'actions ne soient pas encore bien compris⁸¹ ;

5) les nanoparticules métalliques : les nanoparticules métalliques ont de nombreux effets sur les bactéries, variables selon leur forme, taille et charge de surface⁴. Il a néanmoins été mis en évidence que la toxicité de nombreuses nanoparticules métalliques est liée à la production de ROS ainsi qu'à la déstabilisation et la rupture de la membrane^{4,81}.

Lors de cette thèse seules les deux dernières stratégies seront évoquées, principalement dans le **Chapitre 5** - Approche synergique entre les différents ingrédients des remèdes étudiés, en particulier l'association drogues végétales/métal.

5.2. Utilisation antibactérienne du cuivre

Dans les remèdes étudiées, le métal employé est le cuivre Cu. L'effet antibactérien du cuivre est actuellement mis à profit dans des surfaces antibactériennes⁸³ et dans des nanoparticules d'oxyde de cuivre CuO (les nanoparticules de cuivre Cu s'oxydant rapidement à l'air libre)⁸⁴. Dans les deux cas, la perturbation et la rupture des membranes de la bactérie (Gram+ comme Gram-) jouent un rôle important dans l'activité antibactérienne, ainsi que libération prolongée d'ions de cuivre amenant à la génération de ROS, à l'inhibition d'enzymes essentielles et à la dégradation de l'ADN^{83,84}. De plus, le cuivre présente une faible toxicité sur les cellules de mammifères⁸⁵. L'utilisation du cuivre sous la forme de nanoparticules d'oxyde de cuivre est donc prometteur, notamment contre les souches antibiorésistantes et les biofilms de souches Gram+ comme Gram-^{85,86}.

5.3. La synthèse verte de nanoparticules métalliques : une association plantes-métaux actuellement étudiée

Les nanoparticules métalliques sont reconnues pour leur propriétés antibactériennes et antibiofilms. Elles ont la particularité d'avoir un ratio surface/masse bien plus grand que les ions métalliques, leur conférant une plus grande surface de contact^{87,88}. Elles présentent aussi l'avantage d'être moins toxiques sur les cellules mammifères que la forme ionique correspondante (7 à 50 fois moins toxique) en relarguant progressivement le métal sur un temps plus long⁸⁸. De plus, elles sont

capables de pénétrer les biofilms et peuvent ainsi exercer leur propriétés antibactériennes au-delà de la matrice extracellulaire protectrice^{86,89}.

Ces dernières années, la synthèse verte de nanoparticules métalliques a été étudiée, notamment à partir d'extraits végétaux et de sels de métaux. En effet la synthèse des nanoparticules métalliques peut faire appel à des réactifs toxiques pour l'homme, en plus de se révéler polluante⁹⁰. Plusieurs méthodes biologiques ont alors été étudiées, comme la synthèse par des microorganismes, par des enzymes ou par le métabolisme de plantes vivantes⁹⁰. Il a également été démontré que l'on pouvait les synthétiser à l'aide d'extraits végétaux grâce aux composés réducteurs en présence, bien que la reproductibilité et l'homogénéité soient actuellement faibles^{91,92}. De cette manière, des nanoparticules de cuivre ont déjà été obtenues entre différents sels et différents extraits^{93,94}, notamment avec de l'acétate de cuivre et des extraits d'aloès⁹⁵⁻⁹⁷. Des nanoparticules d'autres métaux ont aussi été synthétisées à partir d'extraits d'espèces des genres *Commiphora*⁹⁸ et *Ferula*⁹⁹, auxquels appartiennent certains des ingrédients végétaux des remèdes étudiés ici. Nous avons donc souhaité explorer la possible synthèse de nanoparticules de cuivre à partir des ingrédients utilisés dans les remèdes étudiés.

Les métaux sont donc une alternative prometteuse aux antibiotiques contre les différentes formes de résistance actuelles des bactéries, bien que leur toxicité sur l'homme impose un contrôle de la dose administrée. L'utilisation de nanoparticules métalliques, moins toxiques que l'utilisation directe d'ions métalliques, est une des solutions employées pour utiliser thérapeutiquement les métaux. Le cuivre représente un choix intéressant car peu toxique, étant également essentiel chez l'humain. Par ailleurs l'obtention de nanoparticules métalliques et notamment de cuivre est possible à l'aide d'extraits végétaux, mettant en lumière une des associations possibles des plantes et des métaux dans un but antibactérien.

6. Conclusion sur le contexte général de l'étude

L'antibiorésistance est un problème sanitaire actuel et majeur. Il existe plusieurs mécanismes de résistance chez les bactéries mais un des plus préoccupants actuellement est la formation de biofilms, une organisation particulièrement résistante des bactéries sur les surfaces. La mise au point de nouveaux moyens de lutte contre ces souches résistantes et ces biofilms est donc primordiale. Parmi les stratégies explorées, on retrouve l'ethnopharmacologie et la pharmacognosie, se complétant pour identifier les composés responsables de l'activité dans des drogues naturelles et/ou des remèdes employés dans les médecines traditionnelles. Parmi les pharmacopées traditionnelles, la Ph. Méd. Ar. tient une place de choix car elle s'inspire de plusieurs pharmacopées et les complète par une organisation rationnelle ainsi qu'une approche pratique. De plus, les traces écrites à disposition n'ont pas encore toutes été étudiées d'un point de vue ethnopharmacologique. Enfin, si elle est principalement composée de drogues végétales, elle contient également des métaux, permettant d'étudier ce genre d'association encore peu exploitées.

Parmi les stratégies étudiées contre l'antibiorésistance, l'utilisation des métaux est de plus en plus mise en avant, en particulier les nanoparticules métalliques sur les biofilms. Les composés d'origine végétale peuvent avoir quant à eux divers effets biologiques sur une infection bactérienne, notamment sur les bactéries elles-mêmes. C'est le cas de certains terpènes et coumarines, deux familles phytochimiques que nous serons amenés à rencontrer dans cette étude. De nombreux extraits végétaux sont également capables de réduire des sels métalliques en nanoparticules métalliques et sont actuellement étudiés dans une optique de synthèse verte.

C'est dans ce contexte que nous avons sélectionné deux remèdes, pour leur composition associant des drogues végétales à un sel de cuivre et pour leur prescription contre des abcès potentiellement dus à une infection bactérienne cutanée. Les infections cutanées sont généralement dues à *S. aureus*, une bactérie Gram+ présente dans notre flore cutanée mais également souvent impliquée dans des biofilms multirésistants. La réponse immunitaire chez l'humain parvient dans la majorité des cas à inhiber ces infections. Néanmoins, si la réponse immunitaire est insuffisante, l'infection se propage et devient systémique : elle est alors beaucoup plus dangereuse pour l'hôte et difficile à traiter. En plus d'un intérêt historique, l'utilisation de *S. aureus* a donc également un intérêt sanitaire.

Dans le but d'en apprendre plus sur l'effet thérapeutique des remèdes sélectionnés, les chapitres suivants décriront leur reconstitution suivi d'une première évaluation *in vitro* des activités biologiques liées à la résolution d'un abcès causé par *S. aureus*, et ce pour les ingrédients végétaux comme pour le sel de métal. Afin d'explorer davantage les associations plantes-métaux antibactériennes, les premiers résultats de la synthèse verte de particules de cuivre initiée à partir de ces mêmes ingrédients seront présentés dans le dernier chapitre.

1. Identification des ingrédients

2. Approvisionnement(s) des différentes drogues

3. Extraits végétaux obtenus

4. Contrôles de l'identité botanique des différentes drogues et caractérisation des extraits

Chapitre 2

Identification des ingrédients
des remèdes et étude
phytochimique des drogues
végétales

p 33 à p 98

Chapitre 2 – Identification des ingrédients des remèdes et étude phytochimique des drogues végétales

Les deux remèdes sélectionnés pour cette étude proviennent de l'ouvrage intitulé « *The medical formulary, or Aqrābādhīn of Al-Kindī, translated with a study of its materia medica by Martin Levey* », une traduction ainsi qu'une reproduction partielle de la pharmacopée d'Al-Kindī, réalisées par Martin Levey (1913-1970)⁷. Chimiste ayant notamment étudié la pharmacie du Moyen Âge islamique, il a non seulement traduit ces textes mais il y a également ajouté une étude du « *materia medica* », soit des drogues utilisées. Il a notamment identifié la ou les espèces botaniques susceptibles de correspondre aux noms vernaculaires employés. Ce sont ces traductions et correspondances qui nous ont servi de point de départ à l'identification des ingrédients. Ainsi les ingrédients des remèdes étudiés sont rapportés comme étant l'aloès, spécifiée sous la forme de « jus d'aloès » dans le remède 1, la myrrhe, la gomme sarcocolle, la gomme ammoniacque et le vert-de-gris (Tableau 2).

Tout d'abord un travail bibliographique a été réalisé afin de déterminer les espèces botaniques rattachées à ces noms vernaculaires, ainsi que celles les plus probablement utilisées par Al-Kindī dans sa médecine. Ces recherches ont également permis de préciser la partie de la plante utilisée.

L'approvisionnement des drogues identifiées (ou d'un substitut) a ensuite été réalisé pour chaque ingrédient, dans les limites des disponibilités sur le marché et du temps imparti pour le réaliser. Différentes extractions ont ensuite été réalisées sur les drogues végétales.

Enfin, l'identité des drogues végétales a été vérifiée à l'aide de différents contrôles issus de la Pharmacopée Européenne Ph. Eur. ainsi que par comparaison avec des échantillons de référence via un profilage chimique par HPLC-DAD et HPLC-HRMS. L'identification putative par HPLC-HRMS/MS des composés présents dans les extraits a permis d'appuyer certaines de ces identifications.

Tableau 2 – Rappel des ingrédients et de leur teneur respective (exprimée en parts) dans les deux remèdes d'Al-Kindī sélectionnés, R1 et R2

Ingrédients	Remède 1 (R1)	Remède 2 (R2)
Aloès	1*	1**
Myrrhe	1	1
Gomme sarcocolle	1	1
Gomme ammoniacque	1	1
Vert-de-gris (sels de cuivre)	1	0,07

* jus ; ** partie non précisée

1. Identification et présentation des ingrédients

Sur la base de cette étude du *materia medica* d'Al-Kindī par M. Levey, les dénominations latines des espèces botaniques ont été vérifiées et réactualisées via le serveur de référence de classification botanique The World Flora Online¹⁰⁰. Afin de confirmer mais aussi compléter l'identification de ces drogues végétales (espèces et parties de la plante utilisées), une étude bibliographique a été menée pour, dans un premier temps, établir si ces espèces étaient et/ou sont encore utilisées traditionnellement contre des infections cutanées puis, dans un second temps, déterminer s'il existe des études récentes sur des activités biologiques liées à la résorption d'abcès cutanés (activité antibactérienne, antiinflammatoire ou cicatrisante). La distribution géographique des espèces a également été prise en compte afin de s'assurer qu'Al-Kindī, ayant exercé la médecine à Bagdad dans l'actuelle Irak³⁸, pouvait effectivement avoir eu ces drogues à disposition (la carte des Califats Islamiques en 750 est rappelée en **Figure 13**).

Ces recherches bibliographiques ont été réalisées dans les bases de données de Sciencedirect¹⁰¹ et PubMed¹⁰², ainsi qu'à l'aide d'ouvrages de références et d'archives accessibles soit sur JSTOR¹⁰³, soit sur Google Livres¹⁰⁴.

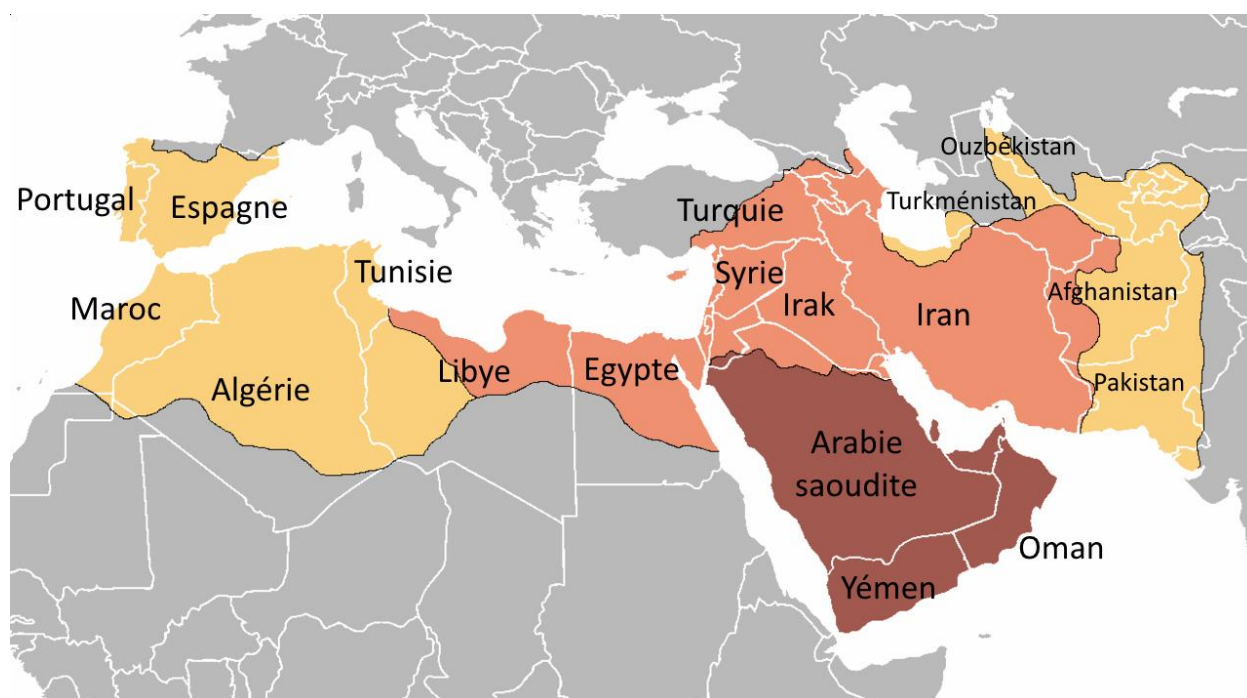


Figure 13 – Carte simplifiée de l'expansion des Califats Islamiques : 622-632 expansion sous Mahomet ; 632-661 expansion pendant le Califats des patriarches ; 661-750 expansion pendant le Califat des Omeyyades (à partir d'une carte cédée au domaine publique⁴⁰)

1.1. L'aloès : qui du gel ou du latex ?

1.1.1. Identification de l'espèce botanique et usages traditionnels

Pour l'aloès, précisé « jus d'aloès » dans le remède 1, M. Levey a identifié 2 espèces botaniques possibles : *Aloe vera* L. ou *Aloe perryi* Bak., correspondant aux espèces actuelles *Aloe vera* (L.) Burm.f. (1768, *Asphodelaceae*, syn. *A. barbadensis*) et *Aloe perryi* Bak (1880, *Asphodelaceae*)⁷. L'*A. perryi* étant considérée aujourd'hui comme endémique du Yémen¹⁰⁵, cette hypothèse a été rapidement écartée et l'*A. vera* a été considéré comme plus probable, cette espèce ayant une distribution bien plus large, comprenant des régions ayant appartenu au Califat Islamique à l'époque d'Al-Kindi (**Figure 14**).

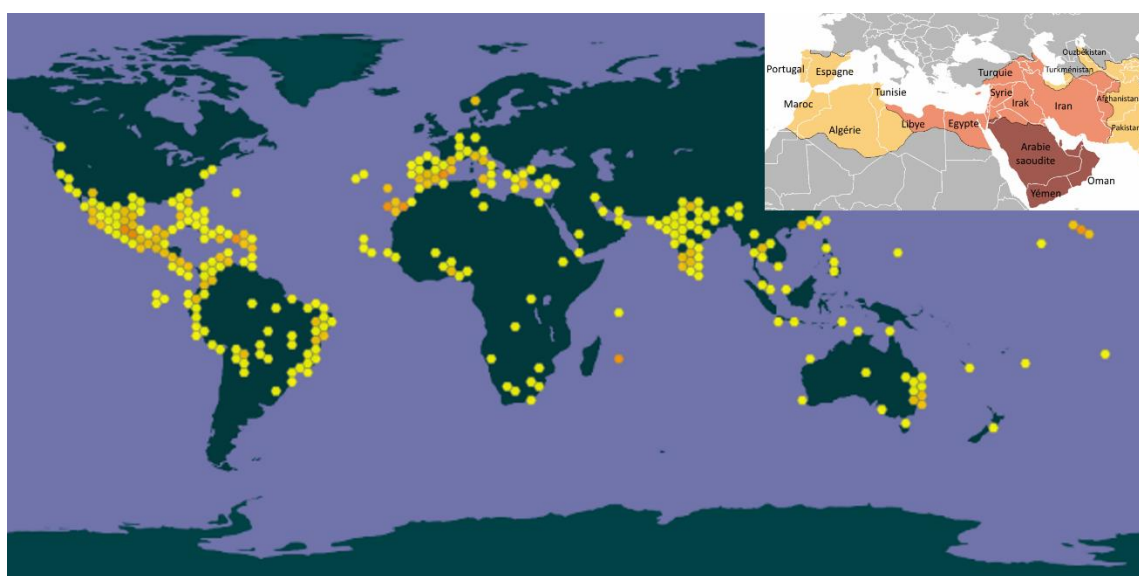


Figure 14 – Présence mondiale de l'*A. vera* (carte GBIF sur la base des observations recensées, consultée le 10.11.2022¹⁰⁶)

L'*A. vera* est une plante médicinale commune à de nombreuses pharmacopées anciennes et actuelles : une de ses premières mentions associées à un usage médicinal est dans le papyrus d'Ebers (1552 av. J.-C.) en tant que laxatif¹⁰⁷. Ses propriétés thérapeutiques étaient également reconnues par les Grecs anciens, les Romains, l'Empire Islamique¹⁰⁷ et elle est encore utilisée dans la médecine ayurvédique¹⁰⁸, la médecine traditionnelle chinoise¹⁰⁹, une partie des médecines traditionnelles africaines¹¹⁰ ainsi que, plus récemment, en Europe¹¹¹ et aux États-Unis¹¹². Elle fait par ailleurs partie des plantes médicinales utilisées en Irak¹¹³.

Ces premiers éléments viennent donc soutenir la proposition de M. Levey : l'*A. vera* a vraisemblablement fait partie du *materia medica* d'Al-Kindi. Par ailleurs, cette espèce d'aloès est considérée comme la plus largement utilisée à travers le monde¹¹² et il n'a pas été trouvé mention d'autres espèces d'*Aloe* dans les sources bibliographiques consultées sur la flore iraquienne¹¹³⁻¹¹⁵.

1.1.2. Présentation botanique d'*A. vera*

L'*A. vera* est une plante pérenne de la famille des *Asphodelaceae*, se présentant sous la forme d'une rosette de feuilles triangulaires et épaisses, accueillant en son centre une grappe érigée de petites fleurs tubulaires (jaunes ou rouges selon la variété) entre Octobre et Janvier^{107,112} (**Figure 15**). Comme toutes les aloès, elle est adaptée aux milieux arides où elle se développe. Pour cela, elle possède un métabolisme acide crassulacéen (MAC ou *Crassulacean acid Metabolism* CAM) lui permettant de limiter les pertes d'eau, ainsi que des feuilles succulentes avec un épiderme épais et recouvert d'une épaisse cuticule afin de stocker le maximum d'eau possible^{116,117}. Ce sont ces feuilles qui vont fournir les 2 principales drogues utilisées : le gel et le latex (**Figure 15**).

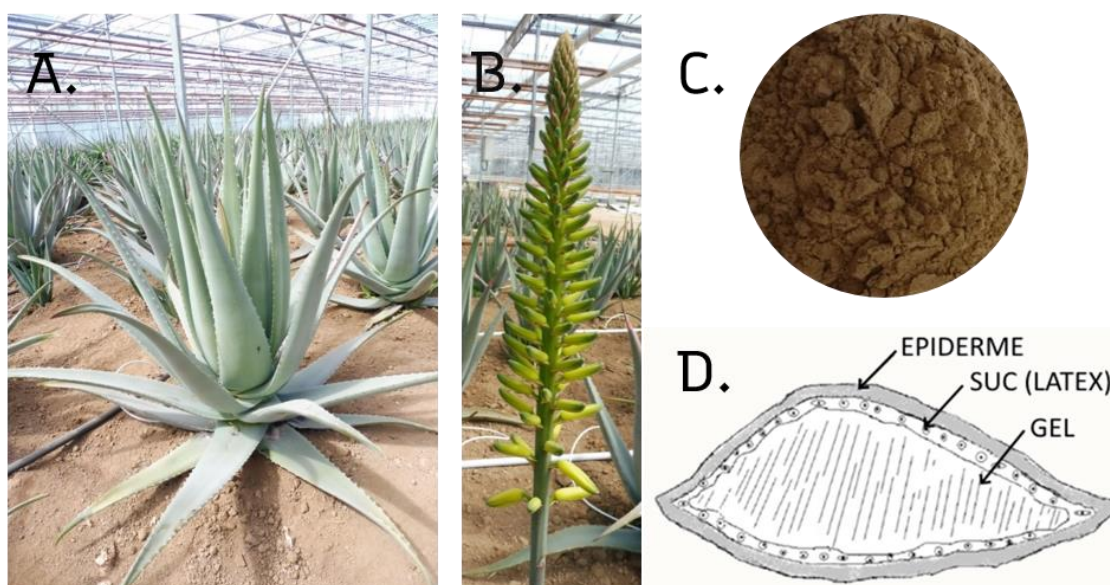


Figure 15 – **A.** Plant d'Aloe vera ; **B.** Inflorescence d'Aloe vera ; **C.** Suc séché et pulvérisé d'Aloe ferox de chez Cailleau Herboristerie ; **D.** Schéma d'une coupe de feuille d'Aloe vera (modifié à partir de Maan et al, 2018¹¹⁷)

1.1.3. Le gel d'aloès : composition chimique et activités biologiques

Le gel des aloès est un tissu permettant le stockage de l'eau : la région centrale de la feuille est faite d'un parenchyme de larges cellules polyédriques à mucilage (**Figure 15-D.**), principalement composé d'eau (99%) et de polysaccharides (55% de la masse sèche) mais aussi d'acides aminés, de lipides, de stérols et d'enzymes^{117,118}. Ce gel est traditionnellement utilisé pour soigner plusieurs maux de la peau comme les brûlures, les blessures, les coupures, les coups de soleil, les dermatites ou encore l'acné, usage dont découle l'incorporation actuelle du gel d'*A. vera* dans de nombreux cosmétiques pour ses propriétés hydratantes^{107,118}.

De plus, des études ont mis en évidence une activité antibactérienne sur *S. aureus* [présence d'une zone d'inhibition après dépôt de 100 µL de gel d'*A. vera* dans un puit de gélose (*S. aureus* MTCC 2943)⁵⁹ et une CMI de 500 µg /mL par microdilution en bouillon d'un extrait éthanolique¹¹⁹]. Il a aussi été montré que ce gel avait des propriétés antiinflammatoires ainsi que cicatrisantes par application topique¹²⁰⁻¹²². **Le gel d'*A. vera* semble donc un bon candidat pour des remèdes destinés à soigner des abcès cutanés que ce soit sur les aspects infection, inflammation ou cicatrisation.**

1.1.4. Le latex d'aloès : composition et activités biologiques

Les latex en général sont considérés comme probablement impliqués dans la défense de la plante, notamment contre des attaques exogènes d'herbivores ou de microorganismes pathogènes^{123,124}. Ce sont donc par essence des drogues avec des activités biologiques marquées. Ces mixtures complexes sont sécrétées par des canaux laticifères, constitués de nombreux composés actifs pouvant inclure des anthranoïdes, des terpénoïdes, des composés phénoliques, des protéines, des carbohydrates ou encore d'autres familles phytochimiques selon les espèces^{123,124}. Celui de l'aloès est exsudé à partir des tubules péricycliques sous l'épiderme de la feuille (**Figure 15-D**). et est principalement composé d'anthracéniques (dérivés de l'anthraquinone) et de composés phénoliques qui lui confèrent ses propriétés laxatives mais aussi antibactériennes, en particulier contre des souches Gram+¹²⁵. En effet, si dans la littérature l'accent est particulièrement mis sur le gel d'*A. vera*, l'usage traditionnel du latex des aloès sur des blessures cutanées est également rapporté¹²⁶. Le suc de l'espèce *A. megalantha* Baker est notamment utilisé traditionnellement en Ethiopie sur les blessures cutanées¹²⁷. Il a effectivement montré une activité **antiinflammatoire** et **cicatrisante** par application topique en réduisant la taille d'œdèmes induits par injection de carraghénane dans des pattes de rat et a aussi amélioré la cicatrisation d'excisions et d'incisions réalisées sur des modèles murins (meilleures fermetures des plaies et meilleure résistance à la traction)¹²⁷.

Par ailleurs, si les activités biologiques du suc d'*A. vera* ont été bien moins étudiées que celles du gel, ce n'est pas le cas pour ses composés dont l'activité **antibactérienne** a été démontrée. Les composés majoritaires du latex sont des **anthrones**, avec dans l'ordre, la barbaloine **18** (aloïne A, *barbaloin* ou *aloin A* en anglais), l'isobarbaloine **19** (aloïne B, *aloin B*), l'aloèsine **20** (aloèrésine B, *aloesin* ou *aloeresin B* en anglais) et l'aloèrésine A **21** (*aloeresin A* en anglais)¹²⁸ (**Figure 16-A**). On retrouve ensuite d'autres anthrones mais aussi des anthraquinones et des chromones (**Figure 16-B**) comme l'aloé-émодол (aglycone oxydé de **18** et **19**, *aloe-emodin* en anglais), l'aloénine (*aloenin* en anglais), l'émодол (ou émodine, *emodin* en anglais), l'aloèrésine E et l'anthranol^{125,128}. Parmi ces composés, l'aloïne A **18** a montré par microdilution en bouillon sur une souche de *S. aureus* une CMI de 62,5 µg/mL, soit environ 149 µM, et son aglycone oxydée l'aloé-émодол a montré sur la même souche une CMI de 125 µg/mL, soit environ 463 µM, sur *S. aureus*¹²⁶. **Le suc d'*A. vera* présente une**

activité sur les bactéries Gram+ (dont *S. aureus*), l'inflammation et la cicatrisation, il constitue donc lui aussi un bon candidat pour l'ingrédient « aloès ».

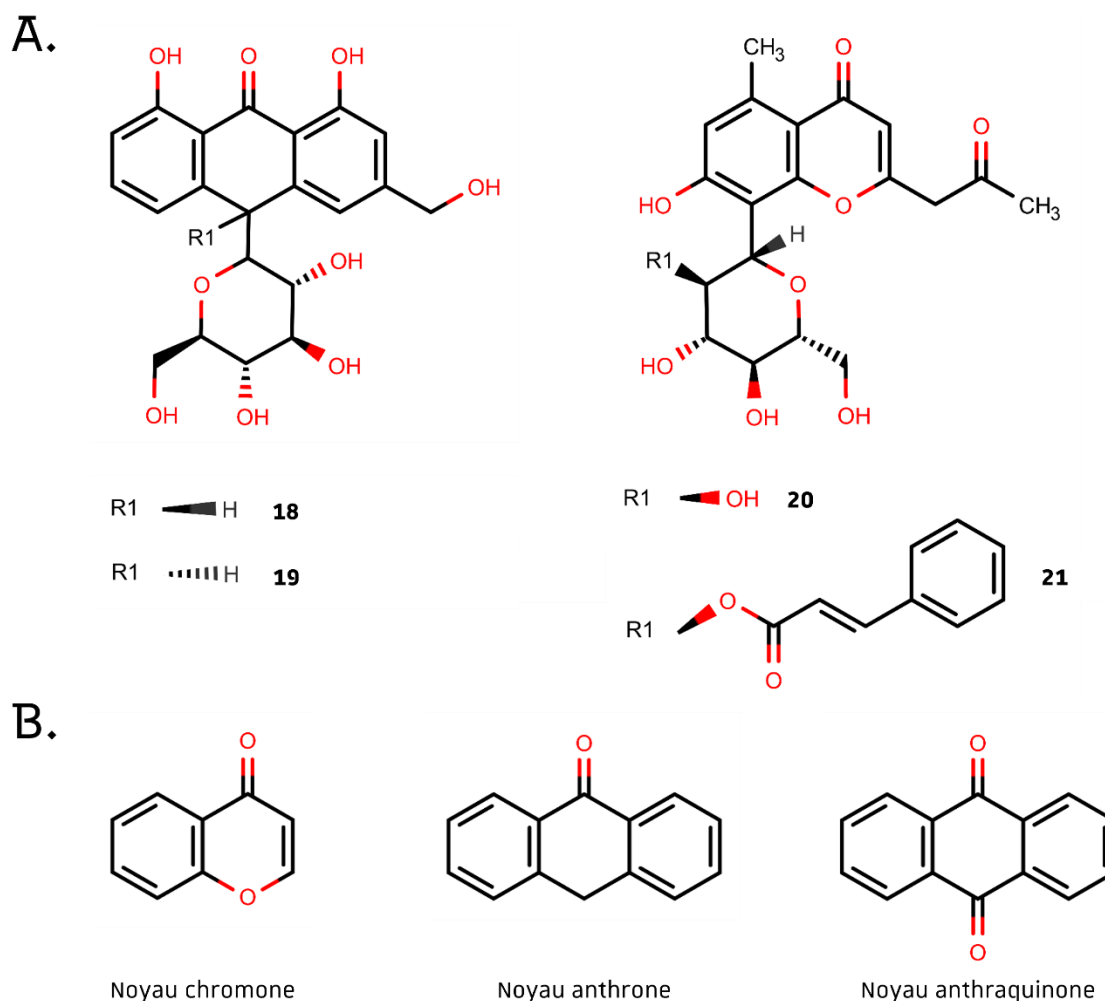


Figure 16 – **A.** Composés majoritaires du suc d'*A. vera* : aloïne A **18**, aloïne B **19**, aloèsine **20** et aloëresine A **21**; **B.** Noyaux des principales familles de composés présentes dans le suc d'*A. vera*^{125,128}

Si l'*Aloe vera* (L.) Burm.f. semble effectivement être l'espèce correspondante à l'ingrédient « aloès », il n'est nullement précisé la drogue utilisée. La seule indication est « jus d'aloès » pour le remède 1 R_1 mais autrement, ni Al-Kindi ni M. Levey ne donnent d'indications claires à ce sujet. Dans la littérature scientifique, le gel d'aloès a particulièrement été étudié pour ses bienfaits sur divers problèmes de peau, en faisant au premier abord un candidat évident pour nos remèdes. Or si « jus d'aloès » peut faire référence au jus des feuilles entières¹¹⁷, ce terme est aussi employé pour désigner le suc^{125,129}. Par ailleurs, le vocabulaire employé dans le mode de préparation et d'administration des remèdes, à savoir « broyer », « tamiser » ou « saupoudrer », laisse à penser que la drogue serait plutôt solide et sèche. Si le gel de la feuille est habituellement utilisé frais, le suc peut être employé sous une forme sèche (**Figure 15-C**). De plus, ce suc présente lui aussi des usages

et activités biologiques cohérents avec la prise en charge d'abcès cutanés, bien que cet usage soit moins prégnant que celui du gel. C'est sur la base de ces divers éléments que le suc d'*Ā. vera* a été considéré comme le meilleur candidat pour la drogue « aloès » mentionnée dans les remèdes R₁ et R₂ de l'aqrābādhīn d'Al-Kindī.

1.2. La myrrhe : l'oléorésine d'un genre botanique entier

1.2.1. Identification de la drogue et usages traditionnels

D'après M. Levey, la myrrhe utilisée par Al-Kindī proviendrait de *Balsamodendrum myrrha* T.Nees., soit l'actuelle *Commiphora myrrha* (T.Nees) Engl (1883, *Burseraceae*). En effet, le terme de myrrhe désigne actuellement l'oléorésine de toutes les espèces du genre *Commiphora*, le plus souvent de l'espèce *C. myrrha* d'après la Ph. Eur.¹¹¹. Les espèces de ce genre sont principalement réparties sur tout le continent africain, dans le sud de la péninsule arabique et en Inde¹³⁰ (**Figure 17**). Aujourd'hui cette oléorésine est toujours présente dans les médecines traditionnelles chinoise et ayurvédique, où elle est notamment utilisée contre la douleur, les maladies inflammatoires, les ulcères buccaux et les désordres cutanés dont l'acné¹³⁰. On retrouve également cette drogue dans les médecines traditionnelles de la péninsule arabique et en Iran^{131,132}.

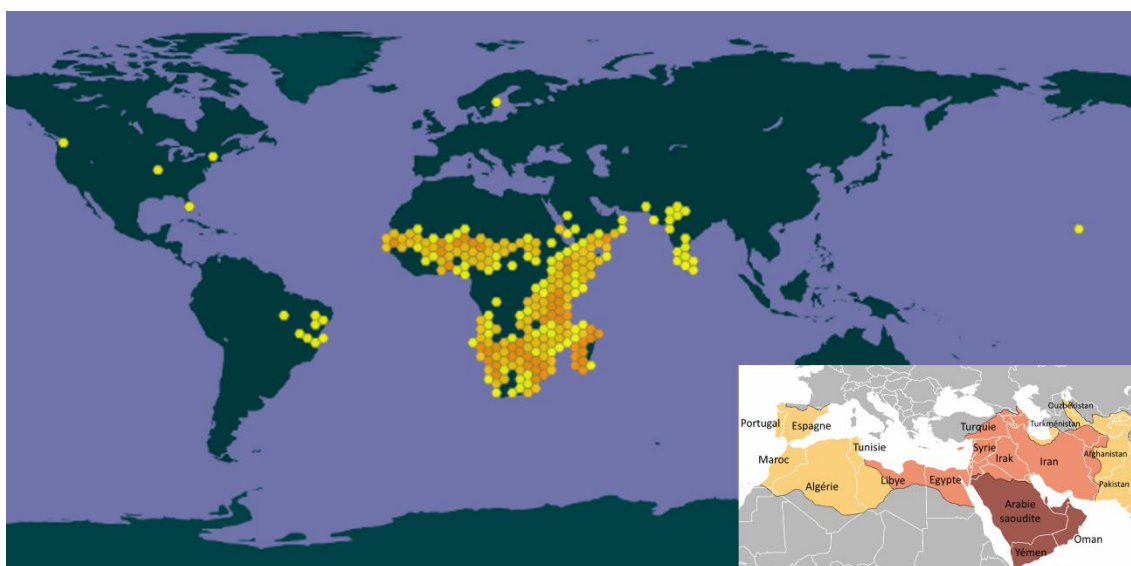


Figure 17 – Présence mondiale du genre *Commiphora* (carte GBIF sur la base des observations recensées, consultée le 10.11.2022¹³³)

Là aussi, la proposition de M. Levey semble probable : la myrrhe a vraisemblablement fait partie du *materia medica* d'Al-Kindi et a par ailleurs un usage cutané dans d'autres pharmacopées. Elle a pu correspondre à l'espèce *C. myrrha*, mentionnée dans la médecine traditionnelle iraquienne¹³⁴, ou correspondre à d'autres espèces de la péninsule arabique acquises commercialement.

1.2.2. Présentation botanique du genre *Commiphora*

Le genre *Commiphora* appartient à la famille des *Burseraceae* et est composé de plus de 150 espèces. Ce sont de petits arbres et arbustes plus ou moins épineux, aux feuilles alternes et généralement composées (3 folioles entières ou denticulées), aux inflorescences en panicule ou en fascicule composées de petites fleurs à 4 pétales, et à l'écorce grise (**Figure 18-A**) dont les blessures produisent ces exsudats résineux rouge-bruns et odorants appelés myrrhe (**Figure 18-B&C**)^{135,136}. La myrrhe est généralement commercialisée sous forme de larmes¹³⁷ (**Figure 18-C**) mais étant souvent utilisées broyées on peut aussi la trouver déjà réduite en poudre (**Figure 18-D**).

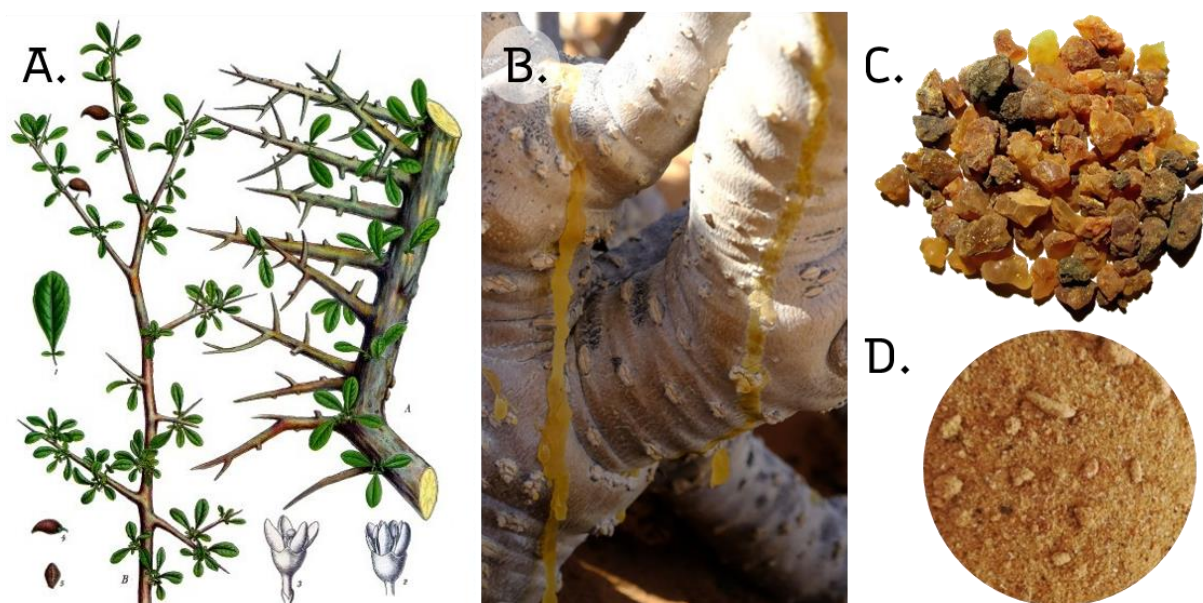


Figure 18 – **A.** Planche botanique de *C. myrrha*¹³⁸ ; **B.** Myrrhe exsudant du tronc d'un spécimen de *C. capensis* Engl. (1883, *Burseraceae*)¹³⁹ ; **C.** Myrrhe sous forme de larmes¹⁴⁰ ; **D.** Myrrhe séchée et pulvérisée de *C. abyssinica* (Cailleau Herboristerie)

1.2.3. Composition chimique et activités biologiques

Les résines ont généralement une définition assez floue, se mélangeant à celle des gommes, mucilages, huile, cire et latex : on peut néanmoins les définir comme un mélange complexe liposoluble, riche en terpénoïdes et composés phénoliques, volatiles ou non, sécrété par des structures spécialisées et ayant un rôle important dans les interactions écologiques¹⁴¹. En effet, tout comme le latex, elles sont considérées comme une défense face aux organismes prédateurs et pathogènes¹⁴¹. La myrrhe est considérée comme appartenant aux oléorésines, des résines principalement composées de terpénoïdes volatiles, dont la fraction volatile constitue par ailleurs une huile essentielle¹⁴².

Les propriétés thérapeutiques et la composition chimique de la myrrhe ont été l'objet de nombreuses études. Ainsi, des myrrhes de différentes espèces ont montré des effets **antiinflammatoire**, **analgésique** et **antibactérien**¹³⁰. Une activité antibactérienne a été mise en évidence vis-à-vis de bactéries Gram+ comme Gram- par antibiogrammes pour l'huile essentielle, les extraits méthanolique et à l'acétate d'éthyle de *C. myrrha*¹⁴³. Un effet analgésique périphérique et un effet antiinflammatoire ont été caractérisés pour des extraits éthanolique, à l'éther de pétrole et à l'acétate d'éthyle de *C. myrrha* sur des œdèmes par injection de formaline sur modèle murin¹⁴⁴. Un extrait méthanolique de la résine de *Balsamodendrum mukul* Hook. ex Stocks (1849, *Burseraceae*) [syn. *C. mukul* (Hook. ex Stocks) Engl. (1883, *Burseraceae*)] a quant à lui montré un effet antiinflammatoire en provoquant une inhibition significative de la production de monoxyde d'azote (NO) sur des macrophages murins activés par le LPS^{130,145}.

Les métabolites identifiés comme les plus présents sont des **terpénoïdes**, principalement des sesquiterpénoïdes (dont des furanosesquiterpénoïdes, des sesquiterpènes dont une partie de la chaîne prénylée se lie à un atome d'oxygène et se replie en furane) et triterpénoïdes dont un certain nombre est impliqué dans les propriétés thérapeutiques de la drogue¹³⁰. Des sesquiterpènes présents dans la résine de *Commiphora molmol* Engl. ex Tschirch (1925, *Burseraceae*) [syn. *C. myrrha*] ont montré une activité sur la souche Gram+ *S. aureus* ATCC25923 mais aussi sur les souches Gram- *E. coli* ATCC11238 et *P. aeruginosa* ATCC15442^{130,146}. Ainsi, la curzérénone **22** (**Figure 19**) a présenté des CMI de 0,7 µg/mL sur *S. aureus*, 1,4 µg/mL sur *P. aeruginosa* et 2,8 µg/mL sur *E. coli*, soit respectivement environ 3 µM, 6 µM et 12 µM (microdilution en bouillon)^{130,146}. De la même manière, un mélange de furanodiène-6-one **23** et de 2-méthoxyfuranoguaia-9-ène-8-one **24** (**Figure 19**) a montré des CMI entre 0,18 et 2,8 µg/mL sur les mêmes souches^{130,146}.

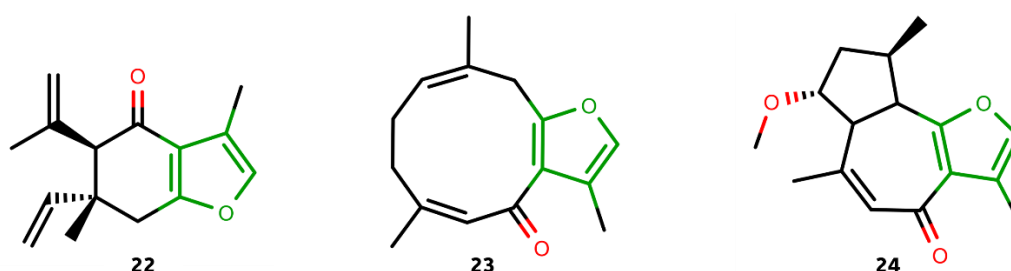


Figure 19 –Furanosesquiterpènes de la myrrhe de *C. myrrha* présentant une activité antibactérienne (cycle furane) : la curzérénone **22**, le furanodiène-6-one **23** et le 2-méthoxyfuranoguaia-9-ène-8-one **24**^{130,146}

L'activité antiinflammatoire de la myrrhe de *C. wightii* (Arn.) Bhandari est notamment expliquée par la présence de myrrhanol A **25**, de myrrhanone A **26** et de E- et Z-guggulsterones **27** et **28** (**Figure 20-A**), qui préviennent la production de NO *in vitro* sur des macrophages murins J774.1 activés par le LPS¹³⁰. Concernant l'activité analgésique, un pré-traitement par injection de 1,25 mg/kg de curzérène **29** ou de furanoeudesma-1,3-diène **30** (**Figure 20-B**) isolés de la myrrhe de *C. molmol* (syn. *C. myrrha*) a permis une réduction significative de la fréquence de léchage chez des

souris brûlées à l'aide d'une plaque chauffante^{130,147}. La myrrhe issue des espèces du genre *Commiphora* a donc des propriétés antibactériennes démontrées – notamment sur des souches de *S. aureus* – mais aussi anti-inflammatoire et analgésique, rendant crédible son utilisation dans un remède pour abcès cutané.

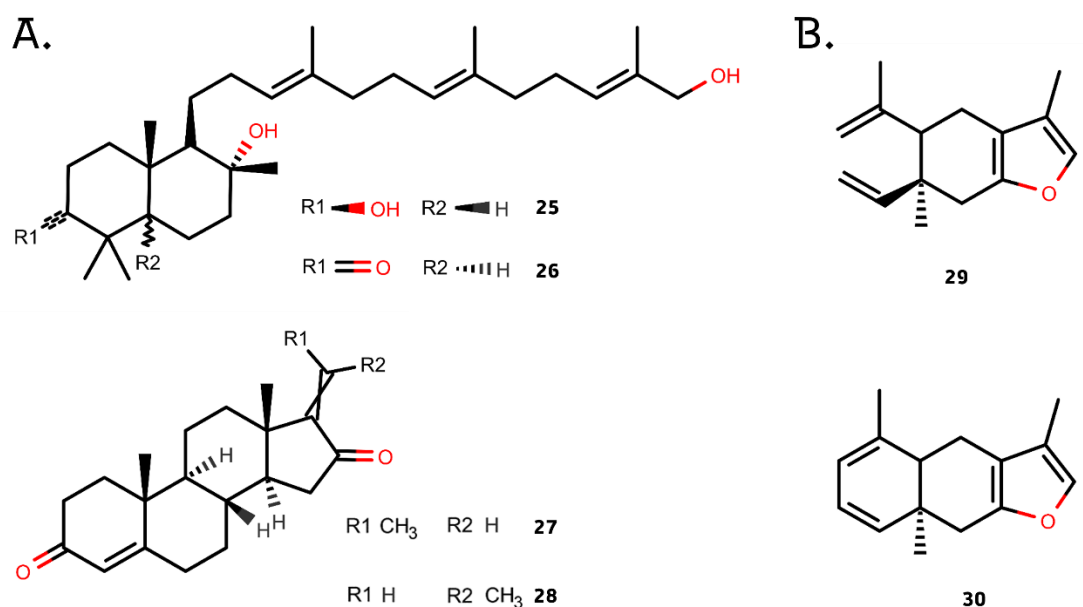


Figure 20 – A. Sesquiterpénoïdes anti-inflammatoires isolés de la myrrhe de *C. wightii*¹³⁰ : le myrrhanol A **25**, le myrrhanone A **26**, l'E-guggulstérone **27** et le Z-guggulstérone **28**; **B.** Furanosesquiterpénoïdes analgésiques isolés de la myrrhe de *C. myrrha*^{130,147} : le curzérène **29** et le furanoeudesma-1,3-diène **30**

L'espèce produisant la myrrhe qu'Al-Kindi utilisait est difficile à déterminer, même si *C. myrrha* semble probable car présente dans la région. Néanmoins, les activités biologiques évoquées précédemment sont communes à plusieurs espèces du genre *Commiphora*, laissant à penser que l'espèce n'était peut-être pas déterminante pour l'efficacité des remèdes. Sur la base de ces éléments, nous avons considéré que la drogue « myrrhe » des remèdes R₁ et R₂ de l'aqrābādīn d'Al-Kindī correspondait à la gomme-résine des espèces du genre *Commiphora*, et plus probablement de l'espèce *C. myrrha*.

1.3. La gomme sarcocolle : une drogue peu étudiée

1.3.1. Identification de la drogue et usages traditionnels

La gomme sarcocolle, aussi appelée *anzaroot*, a été identifiée par M. Levey comme pouvant provenir soit de *Penaea mucronata* L. (1753, *Penaeaceae*), soit d'*Astragalus sarcocolla* Dymock (1890, *Fabaceae*). La gomme sarcocolle est aujourd'hui encore considérée comme pouvant être produite par plusieurs espèces¹⁴⁸.

En effet, des ouvrages d'histoire naturelle datant du début du 19^{ème} siècle attribuent cette drogue à l'espèce *Penaea sarcocolla* L. (1753, *Penaeaceae*) mais dès les années 1890, on considère qu'elle est produite par *Astragalus sarcocolla*^{149,150}. Dans la littérature scientifique actuelle, c'est effectivement cette espèce qui est attribuée à la gomme sarcocolle ainsi que l'espèce *Astragalus fasciculifolius* Boiss (1843, *Fabaceae*). Dans la flore iranienne et iraquienne, seule l'espèce *A. fasciculifolius* est recensée, où elle est alors mentionnée comme la source de gomme sarcocolle¹¹⁵. De plus, si le genre *Astragalus* est un l'un des plus grands genres parmi les plantes vasculaires et est distribué sur tous les continents (**Figure 21**), une proportion importante des espèces se trouve en Iran : sur environ 2900 espèces connues, 850 y sont présentes dont 527 endémiques¹⁵¹. On peut noter que l'usage le plus important dans le genre est la production d'une autre gomme, la tragacanthé ou gomme adragante, considérée produite par 7 espèces d'*Astragalus*¹⁵¹. Les gommages produites par le genre *Astragalus* semblent donc avoir un potentiel thérapeutique, et soulignent une possible équivalence entre les différentes espèces en termes d'effets thérapeutiques et donc de composition chimique.

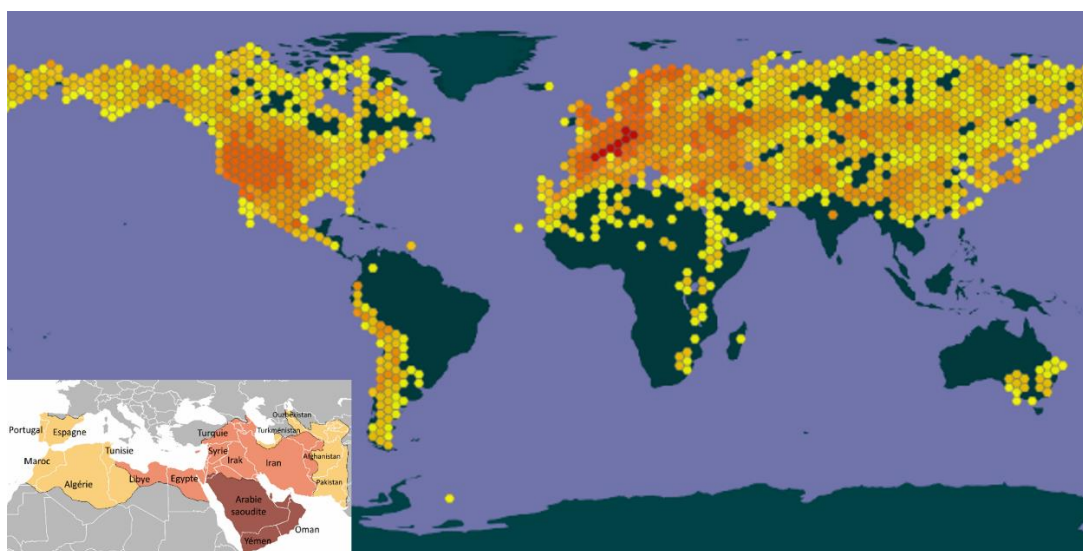


Figure 21 – Présence mondiale du genre *Astragalus* (carte GBIF sur la base des observations recensées, consultée le 10.11.2022¹⁵²)

Concernant ses usages, les ouvrages d'histoire naturelle du 19^{ème} siècle consultés mettent en avant l'utilisation en tant que cicatrisant au travers de son étymologie grecque signifiant « recolle-chairs »^{149,150}. La gomme sarcocolle issue de *A. fasciculifolius* est traditionnellement utilisée pour limiter la coagulation du sang, soulager la douleur et traiter la peau^{115,153-155}. Une étude du genre *Astragalus*, décrivant cette fois-ci l'espèce *A. sarcocolla* comme la source de la gomme sarcocolle (tout en soulignant l'usage médicinal de l'espèce *A. fasciculifolius*), rapporte que la sarcocolle était utilisée comme encens et contre la douleur¹⁵¹. De plus, certains ouvrages traitant du *materia medica* de cette région à l'époque médiévale citent l'espèce *A. sarcocolla* comme soignant les blessures putrescentes, les abcès et les maladies de l'œil^{156,157}. C'est aussi cette espèce qui est citée dans une étude sur la sarcocolle réalisée en Arabie saoudite en 2017¹⁵⁸. Par ailleurs, bien qu'il s'agisse d'une région géographique autre que celle des Califats Islamiques, au Pakistan et en Inde c'est la gomme de cette espèce qui est actuellement utilisée dans les médecines traditionnelles^{159,160}.

Ainsi, la gomme sarcocolle utilisée par Al-Kindī provenait probablement d'*A. fasciculifolius* mais pouvait aussi provenir d'*A. sarcocolla*, une espèce reconnue par d'autres pharmacopées traditionnelles. Ses usages traditionnels décrits, qu'ils soient cutanés ou non, peuvent se révéler pertinents dans un remède contre les abcès, notamment concernant la cicatrisation et la douleur.

1.3.2. Présentation botanique du genre *Astragalus*

Le genre *Astragalus* est composé d'herbes annuelles (~ 80 espèces), d'herbes pérennes à rhizomes ou hémicryptophytes (~ 2500 espèces) et d'arbustes épineux en coussin (~ 300 espèces) : la plupart de ces espèces sont adaptées aux milieux semi-arides à arides¹⁵¹ (**Figure 22-A&B**). De nombreuses espèces d'*Astragalus* ont des usages traditionnels dans la médecine et l'alimentation mais également comme bois de chauffage, comme fourrage ou encore comme plantes ornementales¹⁵¹. Concernant l'espèce *A. fasciculifolius*, elle est décrite comme un petit arbrisseau épineux, aux calices fructifères plus larges que les autres espèces (2 cm au lieu de 1,5 cm) mais aux feuilles trop petites pour appartenir à *A. bruguieri* (1849, *Fabaceae*)¹⁵⁵. *A. sarcocolla* est quant à elle décrite comme un buisson pérenne aux feuilles divisées¹⁵⁶ (**Figure 22-A**). La gomme sarcocolle est soit issue des racines¹⁶¹ soit des tiges sous forme d'exsudats appelés « larmes »¹¹⁵, notamment provoquées par des piqûres d'insectes (**Figure 22-C**)¹⁵⁴.

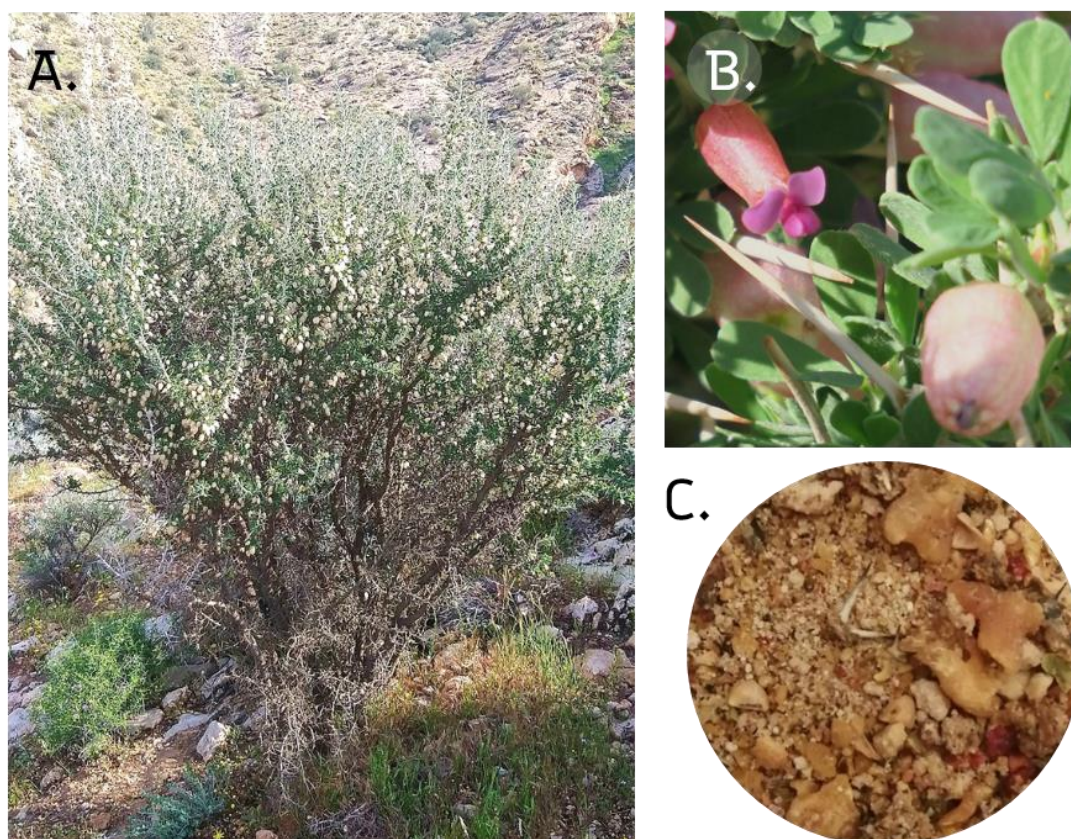


Figure 22 – **A.** Arbuste d'*A. sarcocolla*¹⁶² ; **B.** Fleurs et branches épineuses d'*A. fasciculifolius*¹⁶³ ; **C.** Gomme sarcocolle achetée chez un tradithérapeute au Pakistan, sous forme de larmes

1.3.3. Composition chimique et activités biologiques

Différents usages traditionnels sont attribués à la gomme sarcocolle mais peu d'études ont été réalisées sur ses activités biologiques ou sa composition chimique. L'activité **antibactérienne** d'extraits aqueux et éthanolique de la gomme sarcocolle d'*A. sarcocolla* a été mise en évidence par diffusion sur gélose dans des puits sur différentes bactéries Gram+ et Gram–, dont une souche modèle de *S. aureus* ATCC29213¹⁶⁴. L'extrait aqueux a alors montré une CMI de 12,5 µg/mL, tandis que l'extrait éthanolique restait sans effet aux concentrations testées¹⁶⁴. Les 2 extraits ont également montré une activité sur *E. coli* ATCC35218 et *P. aeruginosa* ATCC27853 avec des CMI entre 12,5 et 50 µg/mL¹⁶⁴.

Parmi les effets pouvant être liés à la résorption d'un abcès cutané, les propriétés cicatrisantes qui seraient à l'origine de son nom semblent être une piste davantage prometteuse. En effet, la gomme sarcocolle d'*A. fasciculifolius* a été administrée sous forme de crème à 5 ou 10% sur des dos de rats diabétiques où un morceau de peau et de tissu sous-cutané avaient été retirés artificiellement : cette application a permis une augmentation significative (ANOVA, $P > 0,001$) du ratio de **cicatrisation** par rapport au groupe de rats témoins¹⁵³. Un cas clinique a également été

documenté sur un homme de 50 ans ayant un ulcère cutané ne s'étant toujours pas résorbé au bout de 5 mois, avant d'être traité avec un onguent de gomme résine d'*A. sarcocolla* et de miel en proportion égale nommé « Marham-i-'Āsal » (Srinagar, Inde, 2020)¹⁶⁰. Au bout de 7 jours, la taille de la blessure a significativement diminuée et a été totalement résorbée au bout de 21 jours, à raison de 2 applications par jour¹⁶⁰.

L'analyse globale des composés présents dans un extrait aqueux et un extrait éthanolique de la gomme sarcocolle d'*A. sarcocolla* a mis en évidence la présence d'alcaloïdes, de terpénoïdes, de flavonoïdes, de saponines (uniquement dans l'extrait aqueux), de stérols et de tannins, ces différentes familles pouvant avoir une activité antibactérienne¹⁶⁴. Par ailleurs, le genre *Astragalus* est décrit comme uniforme d'un point de vue composition chimique : les composés actifs y sont les polysaccharides et les saponines (**Figure 23-A**), tandis que les composés les plus toxiques sont les alcaloïdes indolizidiniques (*indolizidine alkaloids* en anglais) (**Figure 23-B**), les composés azotés endécaphyllines (*endecaphyllins* en anglais, des dérivés de 3-nitropropanoate de glucose), les 3-nitropropyl-glucosides et les acides aminés sélénisés (*seleno-amino acids* en anglais)¹⁶⁵. Un des saponosides d'*A. membranaceus* (Fisch.) Bge. a été isolé, l'astramembrainnine I (*astramembrainnin I* en anglais) (**Figure 23-A**), et a montré une activité antiinflammatoire sur des œdèmes à la carraghénane sur un modèle de rat¹⁶⁵. Cependant, à notre connaissance aucun composé de la gomme sarcocolle (actif ou non) n'a encore été isolé et identifié.

Les quelques études menées sur l'usage thérapeutique et les activités biologiques de la gomme sarcocolle rapportent un effet positif sur des infections cutanées ainsi qu'un effet antibactérien pour un extrait aqueux. De plus, des composés issus du genre *Astragalus* présentent des propriétés antiinflammatoires.

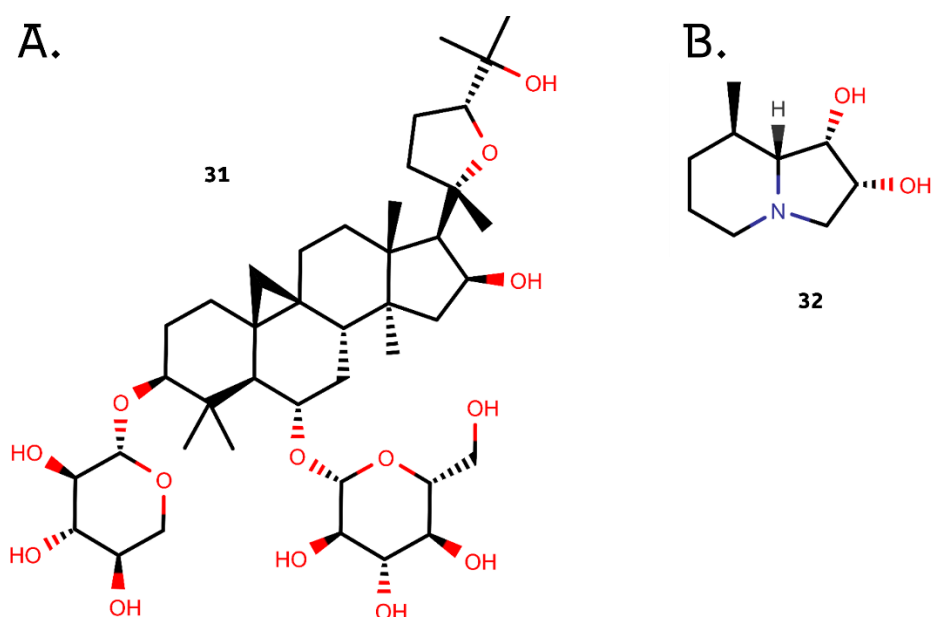


Figure 23 – Composés du genre *Astragalus* : **A.** Exemple de saponine : l'astramembrainnine I **31**^{165,166} ; **B.** Exemple d'alcaloïde indolizidinique : le swainsonine **32**¹⁶⁵

Si la gomme sarcocolle est moins étudiée que les autres drogues de nos deux remèdes, il s'agit d'une drogue ayant été longuement utilisée comme cicatrisant par les Grecs anciens, dont la pharmacopée est une des bases de la pharmacopée arabe médiévale. Les études récentes apportent quelques éléments en faveur de cet usage, que ce soit antibactérien ou antiinflammatoire. Cette drogue a donc certainement fait partie du *materia medica* d'Al-Kindī, et son utilisation pour une infection cutanée semble cohérente avec son usage traditionnel et ses activités biologiques récemment mises en lumière.

1.4. La gomme ammoniacque : perse ou africaine ?

1.4.1. Identification de la drogue et usages traditionnels

Pour la gomme ammoniacque, M. Levey a identifié *Ferula marmarica* Asch. & Taub. ex Asch. & Schweinf. (1893, *Apiaceae*) ou *Ferula tingitana* L. (1753, *Apiaceae*), ainsi que *Dorema ammoniacum* D. Don (1833) correspondant à l'actuelle *Ferula ammoniacum* (D. Don) Spalik, M. Panahi, Piwarczyński & R. Puchałka (2015, *Apiaceae*). Il précise que c'est cette dernière espèce qui est considérée comme productrice de la drogue par le Monde Arabe.

Des ouvrages de pharmacie et de médecine français et anglais datant du 19^{ème} siècle rapportent un usage ancien de la gomme ammoniacque, déjà mentionné par Dioscoride, avec cependant un flou persistant sur son origine botanique et géographique¹⁶⁷. D'après Pline, elle tire son nom du temple de Ammon (assimilé à Jupiter) auprès duquel elle était récoltée, et Dioscoride rapportait déjà qu'elle provenait d'une fêrulle poussant dans l'actuelle Lybie^{167,168}. Mais au 19^{ème} siècle, on distingue deux origines de la gomme ammoniacque : la « gomme ammoniacque perse » qui provient de *D. ammoniacum* (syn. *F. ammoniacum*) en Iran et la « gomme ammoniacque africaine » qui provient de différentes espèces de *Ferula* poussant en Afrique, notamment au Maroc, et plus précisément l'espèce *F. tingitana* L.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Si la gomme des écrits de Dioscoride est estimée comme étant probablement celle qu'on appelle gomme ammoniacque africaine, produite par les fêrules d'Afrique, elle est considérée comme ayant été très tôt confondue avec la gomme ammoniacque perse. Cette substitution se serait notamment faite au moment de la reproduction des textes de Dioscoride par des traducteurs arabes et perses, qui auraient alors traduit la gomme africaine par le nom vernaculaire de la gomme perse (*ushaq*)¹⁷⁰⁻¹⁷². Cette théorie sous-entend que la gomme ammoniacque utilisée dans l'Empire Islamique à l'époque de la traduction (contemporaine à Al-Kindi, le mouvement de traduction ayant débuté fin 8^{ème} - début 9^{ème} siècle¹⁷³) était bien la « gomme ammoniacque perse », produite par *D. ammoniacum* (syn. *F. ammoniacum*). Ceci est appuyé par le fait que *F. ammoniacum* est effectivement considérée comme endémique du sud-ouest et du centre de l'Asie, dont les actuels Iran^{174,175} et Irak¹⁷⁶.

Dans la littérature moderne, le terme gomme ammoniacque désigne encore soit la gomme résine de *F. ammoniacum*, soit la gomme résine de n'importe quelle espèce du genre *Ferula*^{171,174}. Les espèces du genre *Ferula* sont réparties principalement dans l'Asie centrale et du sud-ouest mais aussi dans le bassin méditerranéen et le nord de l'Inde^{177,178} (**Figure 24**). Il est à noter que d'autres gomme-résines sont également issues de ce genre et utilisées en thérapeutique, à savoir l'ase fétide (*asa-foetida*) qui est produite par *Ferula assa-foetida* L. (1753, *Apiaceae*) et le galbanum qui est obtenu de *Ferula gummosa* Boiss. (1856, *Apiaceae*)¹⁷⁴. Leur usage médicinal est d'ailleurs proche de celui de la gomme ammoniacque, laissant à penser que les gomme-résines pourraient avoir des principes actifs similaires¹⁷⁴.

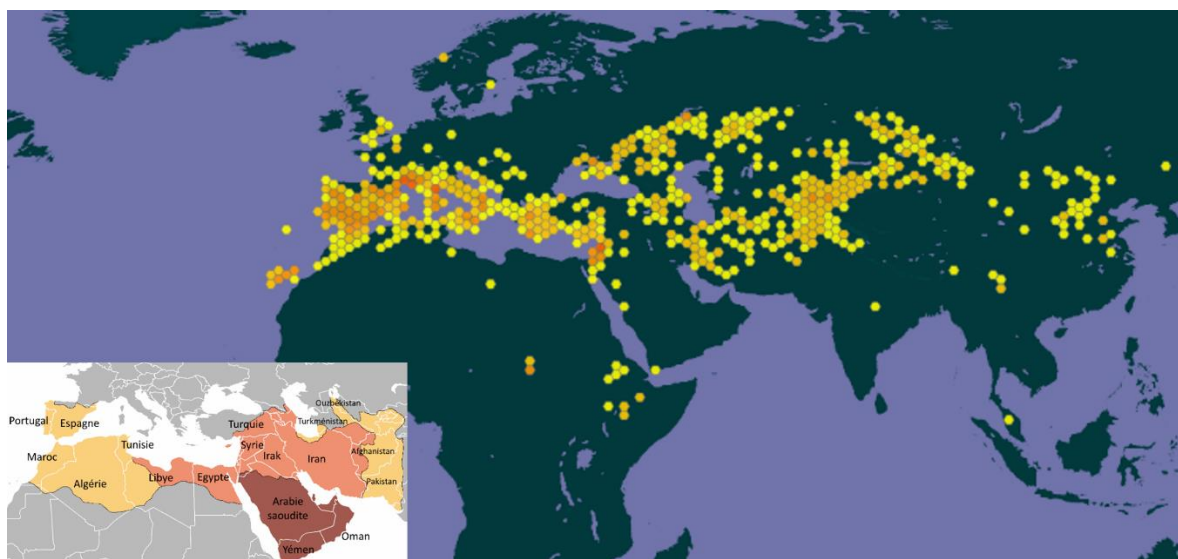


Figure 24 - Présence mondiale (hors continent américain et australien) du genre *Ferula* (carte GBIF sur la base des observations recensées, consulté le 10.11.2022¹⁷⁹)

Concernant son utilisation traditionnelle, la gomme ammoniacque de *F. ammoniacum*, aussi appelée *ushaq*, est principalement rapportée comme expectorant et antispasmodique¹⁷⁴. Un usage cutané est également mentionné contre des maladies de la peau^{180,181} et dans la médecine traditionnelle iranienne on la retrouve dans un soin destiné à diverses blessures¹⁸². Quant à la gomme ammoniacque africaine, on rapporte que les graines de la fêrulle la produisant étaient chauffées jusqu'à excréter une substance liquide, pour être ensuite appliquée sur des maladies de peau¹⁷⁰. Il n'a pas été fait mention d'autres applications topiques pour ces gommes ammoniacques. On peut cependant noter que le galbanum est utilisé pour soigner les blessures¹⁷⁴ et que les fêrulles ont été beaucoup utilisées dans les médecines traditionnelles, notamment pour les infections cutanées¹⁷⁷. Si ce n'est pas précisé pour la fêrulle produisant la gomme ammoniacque, le genre *Ferula* et ses résines semblent donc bien utilisés contre des infections cutanées.

La gomme ammoniacque produite par *F. ammoniacum* a vraisemblablement fait partie des drogues utilisées par Al-Kindī. Néanmoins, le Maroc et plus largement l'Afrique du Nord faisaient également partie des Califats Islamiques à cette époque : il a donc pu avoir accès à de la gomme ammoniacque issue de *Ferula* poussant dans ces régions. Si les usages thérapeutiques traditionnels les plus rapportés pour ces deux drogues ne sont pas liés aux infections cutanées, quelques mentions y sont faites notamment dans le genre *Ferula* en général.

1.4.2. Présentation botanique du genre *Ferula*

Le genre *Ferula* appartient à la famille des *Apiaceae* et comprenant plus de 150 espèces^{177,178}. Les fêrulles sont de grandes herbacées biennuelles ou vivaces, à la tige robuste, aux feuilles pennées plus ou moins finement divisées avec une gaine foliaire généralement gonflée, aux

nombreuses ombelles composées de fleurs crèmes, jaunes ou verdâtres et aux fruits fortement comprimés dorsalement^{183,184} (**Figure 25-A&B**). La gomme-résine des différentes espèces est sécrétée suite aux piqûres d'insectes sur la tige, ou d'incisions de la main de l'homme sur les tiges et parfois les racines, d'où la résine s'écoule sous forme de larmes ou de masses^{171,174} (**Figure 25-C**).

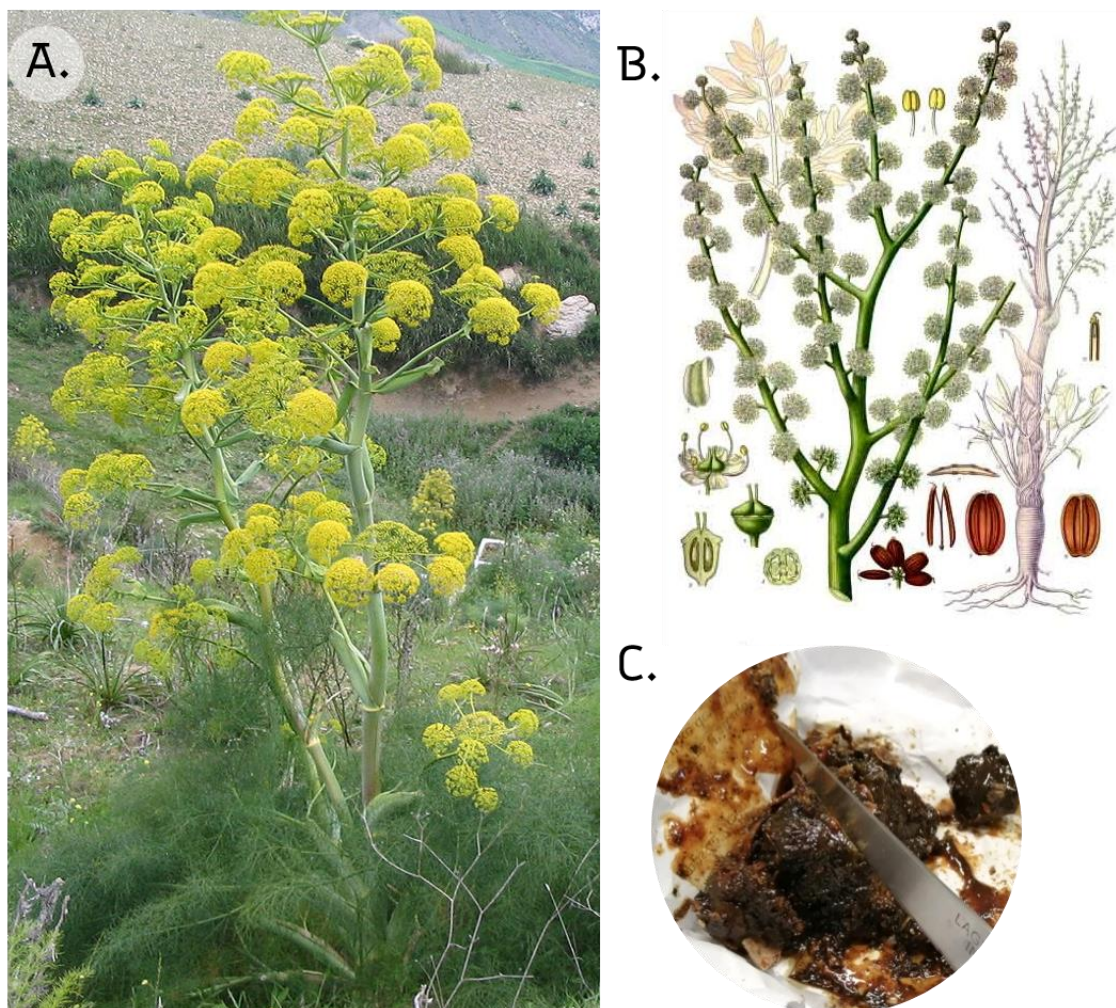


Figure 25 – **A.** Plant de *Ferula* communis ; **B.** Planche botanique de *Ferula ammoniacum* ; **C.** Gomme ammoniacque achetée sous forme de masse chez un tradithérapeute à Rabat, Maroc.

1.4.3. Composition chimique et activités biologiques

Si les usages anciens se concentrent davantage sur les maladies respiratoires, un certain nombre d'études récentes ont mis en évidence l'activité **antibactérienne** au sein du genre *Ferula*¹⁷⁷. Une activité antibactérienne a notamment été trouvée pour l'huile essentielle de *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuff. (1853, *Apiaceae*) sur *S. epidermidis* ATCC12228 par microdilution en bouillon (CMI 17,6 µg/mL), pour des extraits à l'éther de pétrole, à l'hexane, à l'eau chaude, à l'eau

froide et à l'éthanol de *F. assa-foetida* sur *S. aureus* par diffusion sur gélose, pour l'oléorésine de *F. gummosa* sur *S. aureus* ATCC29737 (CMI 3,125 µL/mL) et pour l'huile essentielle de fruits de *Ferula elaeochytris* Korovin (1947, *Apiaceae*) sur *S. aureus* ATCC29213 par microdilution en bouillon (CMI 32 µg/mL)¹⁷⁷. Une activité antibactérienne a également été mise en évidence pour l'extrait DCM:EtOH 1:1 (v/v) de la gomme ammoniacque de *F. ammoniacum* sur *S. aureus* ATCC29737 à 40 µg/mL et sur d'autres bactéries Gram+¹⁸⁵.

En plus de l'activité antibactérienne sur *S. aureus*, une activité **antiinflammatoire** et **antidouleur** a aussi été mise en évidence pour un extrait aqueux d'ase-fétide (gomme-résine de *F. assa-foetida*) sur des modèles de souris via différents tests (brûlures par plaque chauffante, injections d'acide acétique par voie intrapéritonéale, œdèmes induits par injection de carraghénane dans les pattes)¹⁸⁶, ainsi qu'un effet antidouleur pour l'extrait à l'acétone des racines de *F. gummosa* sur des modèles de souris et de rats^{187,188}. Un effet antiinflammatoire a également été montré pour l'extrait aqueux de la gomme ammoniacque de *F. ammoniacum* sur des œdèmes à la carraghénane sur des pattes de souris¹⁸⁸. Une meilleure cicatrisation a aussi été observée pour quelques espèces, dont *Ferula persica* Willd. (1798, *Apiaceae*) après application d'un onguent contenant 5% d'extrait méthanolique¹⁸⁹.

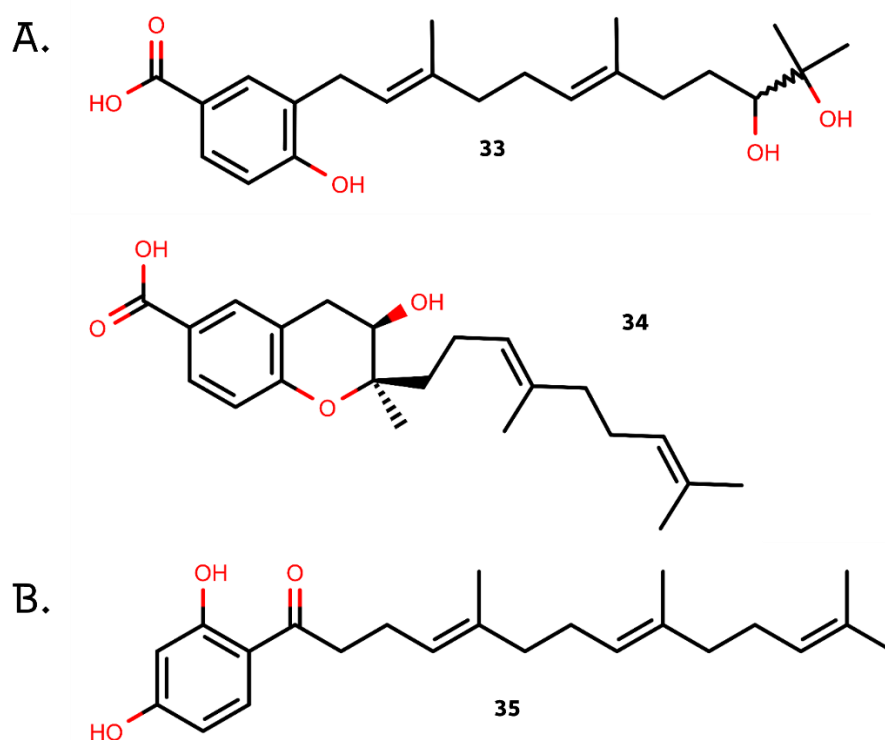


Figure 26 – Sesquiterpènes antibactériens isolés de différentes *Ferula* : **A.** Le kuhistanol A **33** et le kuhistanol D **34** isolés de *F. kuhistania*¹⁹⁰ ; **B.** La dshamirone **35** isolée de *F. feruloides*¹⁷⁷

Plusieurs composés ont été identifiés chez les férules comme ayant une activité antibactérienne. Il s'agit principalement de dérivés de sesquiterpènes. Des sesquiterpènes phénoliques ont notamment été isolés et testés comme le kuhistanol A **33** et le kuhistanol D **34**, deux acides 4-hydroxybenzoïque prénylés présents dans les racines et tiges de *Ferula kuhistanica* Korovin (1947, *Apiaceae*) (**Figure 26-A**) et présentant une CMI de 63 µg/mL contre des isolats cliniques de *S. aureus* résistantes ou non à la méticilline¹⁹⁰. La dshamirone **35** (**Figure 26-B**) et ses dérivés, isolés de racines de *Ferula feruloides* (Steud.) Korovin (1947, *Apiaceae*), ont également montré une forte activité contre la souche *S. aureus* XU212, une souche résistante à la méticilline et à la tétracycline, avec une CMI de 1 µg/mL pour la dshamirone¹⁷⁷.

Des coumarines sesquiterpéniques, plus précisément des 4-hydroxycoumarines prénylées, ont également été identifiées dont le féruléol **36** (**Figure 27-A**) et ses dérivés, isolés du rhizome de *Ferula communis* L. (1753, *Apiaceae*) et présentant une forte activité antibactérienne sur *S. aureus*, avec une CMI de 2,5 µg/mL pour le féruléol¹⁷⁷. Par ailleurs, ces 4-hydroxycoumarines prénylées sont tenues pour responsables de la toxicité de certaines *F. communis* (chénotype toxique), causant un syndrome hémorragique léthal du bétail appelée « férulose »¹⁹¹. Il est cependant à noter que le féruléol est également rapporté dans le chénotype non-toxique¹⁹². Plusieurs coumarines sesquiterpéniques ont également montré une activité antiinflammatoire. C'est le cas de l'ombelliprénine **37** (**Figure 27-B**) isolée des racines de *F. szowitsiana* qui a permis de réduire de manière significative la taille d'œdèmes provoqués à la carraghénane sur des pattes de rats, et des coumarines sesquiterpéniques isolées de *F. fukanensis* qui ont inhibé de manière significative l'expression de la NO-synthase^{188,191}.

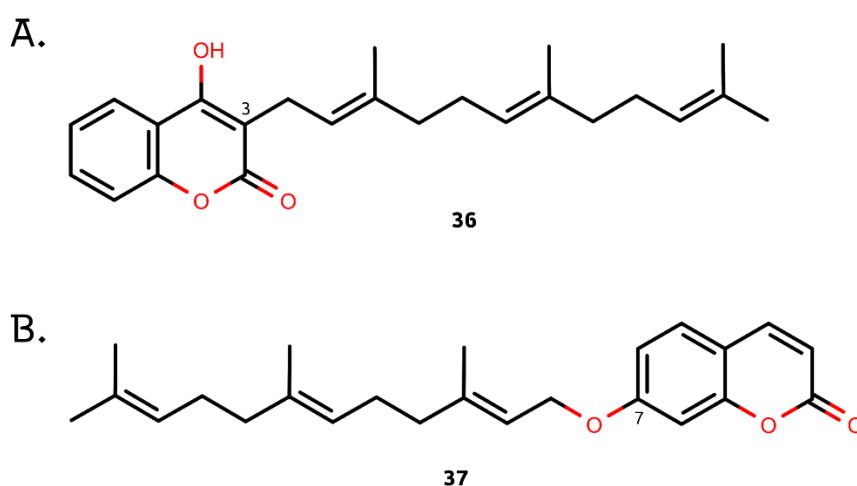


Figure 27 – Coumarines sesquiterpéniques bioactives d'espèces du genre *Ferula* : **A.** Féruleol **36**, 4-hydroxycoumarine prénylée antibactérienne isolée de *F. communis*¹⁷⁷ ; **B.** Ombelliprénine **37**, antiinflammatoire et isolée de *F. szowitsiana*^{188,191}

Enfin, des esters de daucane ont été isolés de *F. hermonis* et ont notamment montré une bonne activité contre *S. aureus*, comme la férutinine **38** (**Figure 28-A**) avec une CMI inférieure à 0,39 µg/mL sur une souche résistante à la méticilline¹⁷⁷. Certains esters de daucane comme la férutinine **38**, la téféridine **39** et la téférine **40** (**Figure 28**) isolés de racines de *F. hermonis* ont également montré une activité antiinflammatoire sur des œdèmes induits au carraghénane¹⁸⁸.

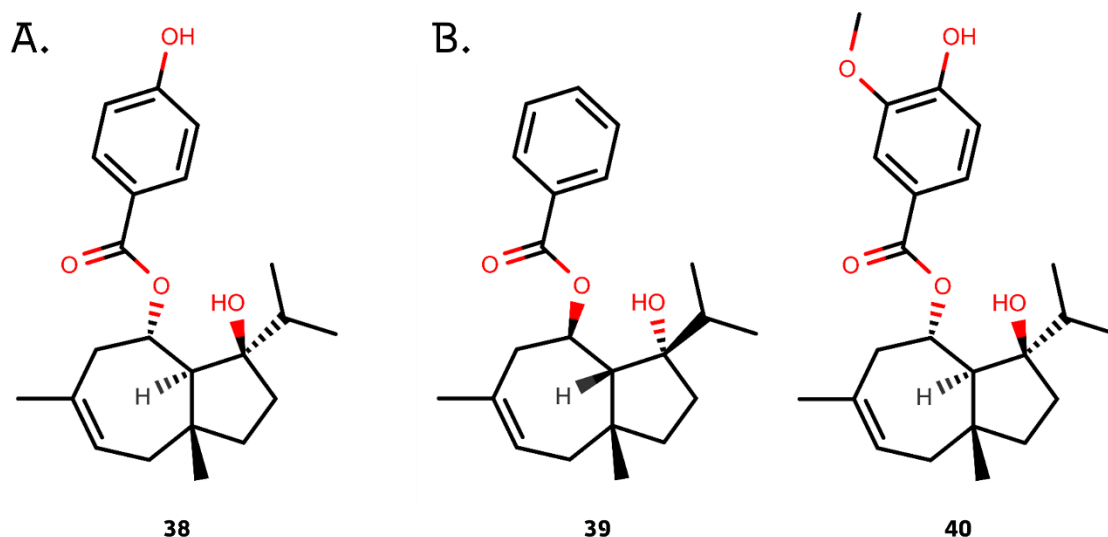


Figure 28 – Esters de daucane bioactifs isolés de *F. hermonis*¹⁸⁸ : **A.** La férutinine **38**, antibactérienne et antiinflammatoire ; **B.** La téféridine **39** et la téférine **40**, antiinflammatoires

Des activités antibactériennes et antiinflammatoires ont été mises en évidence pour plusieurs espèces de *Ferula*, dont la gomme-résine de *F. ammoniacum*. Plusieurs de leurs composés de type sesquiterpène ont été isolés et ont montré ces mêmes activités. La gomme ammoniacque et plus largement le genre *Ferula* semblent donc présenter des propriétés antibactériennes et antiinflammatoires en accord avec le traitement d'un abcès cutané.

La gomme ammoniacque dite « perse » produite par *F. ammoniacum* a plus vraisemblablement fait partie du *materia media* d'Al-Kindī que la gomme dite « africaine » produite par des *Ferula* du Maroc. Il a néanmoins pu avoir accès à cette gomme via le commerce au sein des Califats Islamiques. La gomme ammoniacque et d'autres gomme-résines du genre *Ferula* ont un usage traditionnel thérapeutique important, bien que l'usage cutané ne soit pas le plus mentionné. Cependant, des études sur l'activité d'extraits et de composés isolés de ce genre ont mis en évidence des activités antibactériennes et antiinflammatoires qui sont en accord avec le traitement d'un abcès cutané. Al-Kindī a donc pu utiliser la gomme résine de *F. ammoniacum* pour des infections cutanées, même si la gomme-résine d'autres espèces de *Ferula* n'est pas à exclure.

1.5. Le vert-de-gris : un mélange complexe et variable de sels de cuivre

1.5.1. Définition de la drogue et usages traditionnels

M. Levey décrit le vert-de-gris comme obtenu en faisant réagir du cuivre avec du vinaigre. Cette substance était déjà connue par en Grèce Antique : elle est décrite par Pline comme un pigment bleu-vert obtenu après exposition de cuivre métal soit à du marc de raisins, soit effectivement à du vinaigre¹⁹³. Le vert-de-gris est alors une mélange complexe, composé de plusieurs sels de cuivre dont principalement de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (**Figure 29**)¹⁹⁴. Cette méthode de production a été conservée dans le bassin méditerranéen jusqu'au 19^{ème} siècle^{39,193} et a été décrite dans un manuscrit écrit par le scribe Abu 'Abdallah Muhammad ibn Ahmad ibn Yusuf al-Khwarizmi en 997 comme une référence à la cour des Samanides¹⁹⁵.

On peut donc supposer que le vert-de-gris utilisé sous les Califats Islamiques était lui aussi obtenu à l'aide de vinaigre et était donc principalement composé d'acétate de cuivre. Il est toutefois à noter que plusieurs recettes de vert-de-gris ne donnent pas d'acétate de cuivre mais d'autres sels de cuivre¹⁹⁴.



Figure 29 – **A.** Vert-de-gris formé sur une pièce de monnaie (acier cuivré) enveloppée pendant 3 jours dans un papier régulièrement imbibé de vinaigre de vin (pièce non-traitée en référence); **B.** Acétate de cuivre

Le cuivre et les métaux en général sont associés à une forte tradition antibactérienne comme nous l'avons vu précédemment dans le **Chap.1-5.2**^{4,196}. En Egypte et Grèce Antique on utilisait le cuivre pour stériliser l'eau et traiter des blessures^{197,198}, et l'on avait encore recours au cuivre lors des épidémies de choléra du 19^{ème} siècle (*Vibrio cholerae*, Gram-)¹⁹⁶. Son utilisation est généralement limitée à une application topique du fait de sa toxicité, déjà connue par les Grecs Anciens¹⁹⁷. Du vert-de-gris a par ailleurs été reproduit selon une méthode traditionnelle utilisant de la malachite, de la chrysocolle et des vapeurs de vinaigre : le vert-de-gris obtenu a permis d'inhiber la croissance de 3 bactéries isolées d'une blessure^{196,197}. Le vert-de-gris et le cuivre ont une utilisation traditionnelle généralement topique dans le traitement de blessures, ainsi qu'une utilisation antibactérienne encore récente.

1.5.2. Activités biologiques

Les propriétés **antibactériennes** du cuivre ont été testées sur différentes souches bactériennes en tant que surface : ainsi des souches méticilline-résistantes de *S. aureus* (MRSA) déposées sur une surface de cuivre ont été tuées en quelques minutes à 22°C et en quelques heures à 4°C¹⁹⁶. Elles ont également été étudiées *in vitro* pour une application topique sur blessures : des fibres contenant de l'oxyde de cuivre a permis de réduire la densité bactérienne sur la surface testée, notamment celle d'une souche *S. aureus* ATCC6538¹⁹⁹. Cette activité antibactérienne est surtout rapportée pour le cuivre 1 Cu(I) et peu pour le cuivre 2 Cu(II), bien que le cytoplasme de certaines bactéries comme *E. coli* réduisent le Cu(II) en Cu(I)²⁰⁰. Cette différence s'explique par la réactivité plus importante du Cu(I), l'amenant à davantage se lier aux constituants de la bactérie, comme cela a été démontré pour des souches de *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*²⁰¹. Le cuivre est naturellement plus souvent sous forme Cu(II) que Cu(I) (notamment dans l'acétate de cuivre) pouvant expliquer son activité antibactérienne plus faible par rapport à d'autres métaux comme l'argent²⁰¹. Néanmoins, l'étude du cuivre sur les différents aspects d'une blessure semble indiquer que le métal impacterait la **réponse inflammatoire** ainsi que les phases de prolifération et de remodelage lors de la **cicatrisation**¹⁹⁶.

De plus, des études récentes mettent en avant l'utilisation d'acétate de cuivre dans la synthèse de **nanoparticules de cuivre (CuNP)** avec des propriétés **antibactériennes** intéressantes⁸⁵. Ces propriétés sont notamment dues à la forme des nanoparticules, cette forme dépendant du précurseur (acétate de cuivre ou autre sel de cuivre) et de l'agent réducteur⁸⁵. **Ces CuNP ont la propriété de relarguer régulièrement des ions Cu²⁺, permettant une forte concentration en un point précis, perturbant le métabolisme des cellules et bactéries environnantes mais limitant localement la toxicité**⁸⁵. Afin de limiter davantage cette toxicité, les CuNP peuvent être combinées à des polymères afin de créer un réservoir pour les ions cuivre⁸⁵.

Ainsi, le vert-de-gris est connu depuis longtemps des médecins pour des applications topiques sur des plaies. Cette drogue et son protocole d'obtention à l'aide de vinaigre étaient déjà connus par les médecins sous les Califats Islamiques. Cette drogue est principalement décrite comme de l'acétate de cuivre, un sel de cuivre constitué d'ions Cu²⁺ et de contre-ions acétates. Ces ions Cu²⁺ ont des propriétés antibactériennes, à conditions qu'ils soient présents en assez grande quantité. Ces grandes quantités viennent alors expliquer l'usage topique local, permettant d'avoir une activité anti-infectieuse tout en limitant la toxicité pour l'organisme. **Il semble donc probable qu'Al-Kindī ait utilisé du vert-de-gris, alors principalement composé d'acétate de cuivre, pour une utilisation topique locale sur des blessures infectées.** Une application locale similaire mais plus fine serait l'utilisation de nanoparticules de cuivre CuNP.

Les différentes recherches bibliographiques menées sont donc en accord avec l'étude du *materia medica* d'Al-Kindī par M. Levey et ont permis d'affiner l'identification de certaines des drogues employées dans les remèdes sélectionnés. Les drogues identifiées pour les deux remèdes d'Al-Kindī sont résumées dans le **Tableau 3**. Ces identifications sont néanmoins à considérer avec précaution, de par la période de temps s'étant écoulée entre l'écriture, l'interprétation par M. Levey, et nos propres recherches.

Tableau 3 – Résumé des drogues végétales utilisées dans les deux remèdes d'Al-Kindī étudiés

Ingrédients	Espèce correspondante identifiée	Partie de la plante
Aloès	<i>A. vera</i>	Suc
Myrrhe	<i>C. myrrha</i> + <i>Commiphora</i> sp.	Oléorésine
Gomme sarcocolle	<i>A. sarcocolla</i>	Gomme-résine
Gomme ammoniacque	<i>F. ammoniacum</i> + <i>Ferula</i> sp.	Gomme-résine

Une fois ces différentes hypothèses établies, il a fallu se procurer chacune des drogues via différents circuits d'approvisionnement. Cette étape ainsi que l'étape d'extraction sont décrites dans les parties suivantes de ce chapitre. Dans la dernière partie, différents contrôles ont été faits sur l'identité botanique des drogues végétales, notamment sur la base de la composition phytochimique des extraits réalisés.

2. Approvisionnement(s) des différentes drogues

Les espèces ou les genres botaniques correspondant aux différents ingrédients végétaux ayant été déterminés ainsi que les parties de plantes correspondantes, un approvisionnement a été réalisé pour chaque drogue végétale (**Tableau 4**). Si cet approvisionnement n'a pas posé de problèmes pour une partie des espèces étudiées, d'autres se sont révélées difficiles à trouver dans les délais impartis, car tombées en désuétude dans notre région du globe. Certaines drogues ont de ce fait été achetées sur des marchés étrangers (Maroc, Pakistan). Les démarches dictées par l'APA sont encore en cours.

Tableau 4 - Drogues végétales utilisées dans l'étude

Ingrédients	Code	Espèce identifiée	Partie de la plante	Fournisseur	Pays d'origine
Aloès	ALOF	<i>A. ferox</i> Mill.	Suc séché et pulvérisé	Cailleau Herboristerie (49120 Chemillé-en-Anjou, France)	Afrique du Sud
Myrrhe	COMA1	<i>C. abyssinica</i> (Engl.) Engl.	Gomme-résine séchée et pulvérisée	Cailleau Herboristerie (49120 Chemillé-en-Anjou, France)	Kenya
	MYRR1	<i>Commiphora</i> sp.	Gomme-résine séchée en larmes	Tradithérapeute local	Rabat, Maroc
Gomme sarcocolle	SARC	Hypothèse : <i>A. sarcocolla</i> Dymock	Gomme-résine en larme	Tradithérapeute local	Pakistan
Gomme ammoniac	AMMO1	<i>F. communis</i> L.	Gomme-résine en masse	Tradithérapeute local	Rabat, Maroc

Le suc d'*A. vera* a été substitué par du suc d'*A. ferox* Mill., considéré comme équivalent par la Ph. Eur.¹¹¹ (**0**). Il est commercialisé par Cailleau Herboristerie (49120 Chemillé-en-Anjou, France) sous forme séchée et pulvérisée.

La première myrrhe utilisée provient de *C. abyssinica* (Engl.) Engl. et a également été achetée chez Cailleau Herboristerie, sous une forme séchée et pulvérisée. Une seconde myrrhe a été achetée chez un tradithérapeute à Rabat (Maroc) dans le cadre d'une collaboration entre Pierre Fechter (UMR7242, Strasbourg, France) et Hassan Ait Benhassou (MAScIR, Rabat, Maroc) pour la thèse de Basma Abdallah, réalisée en co-tutelle entre les deux laboratoires. L'espèce productrice de cette myrrhe n'était cependant pas précisée et a donc nécessité des contrôles d'identification, notamment sur ses extraits.

La gomme sarcocolle étant peu disponible sur le marché européen, elle a été achetée chez un tradithérapeute au Pakistan. Elle a été achetée sous forme de larmes sèches de gomme-résine mélangées à des éléments végétaux, sans mention de l'espèce productrice. La gomme sarcocolle

étant considérée au Pakistan comme produite par *A. sarcocolla*¹⁶⁴, la drogue employée a été considérée comme provenant de cette espèce. A l'heure actuelle, nous n'avons pas encore pu infirmer ou confirmer cette hypothèse malgré les contrôles réalisés sur les extraits obtenus.

De la même manière, la gomme ammoniacque n'était pas disponible sur le marché européen : elle a donc été achetée uniquement chez des tradithérapeutes au Maroc, dans la cadre de la collaboration évoquée précédemment. Elle a été achetée sous forme de masse de gomme-résine de production artisanale. Par conséquent la gomme brute était hétérogène, avec de nombreux débris végétaux mais aussi minéraux et l'espèce n'était pas précisée. La gomme ammoniacque africaine peut être produite par plusieurs espèces de fêrues dont *F. tingitana*, mais les contrôles réalisés sur la drogue et ses extraits présentés ci-après nous ont amené à considérer *F. communis* L., une fêrue abondante dans le bassin méditerranéen, comme une source probable.

Concernant le vert-de-gris, de l'acétate de cuivre $C_4H_6CuO_4$ sous forme de poudre anhydre (Strem Chemicals Inc., Massachusetts) a été utilisé (code : **Cu(OAc)₂**).

Des cônes femelles de *Humulus lupulus* L. (1978, Cannabaceae) (code : **HUML**) ont également été utilisés pour l'obtention d'un extrait de référence pour l'activité antibactérienne.

Par ailleurs, des échantillons de référence ont été utilisés pour contrôler l'identité de la myrrhe et de la gomme ammoniacque (**Tableau 5**), dont deux échantillons de myrrhe et de gomme ammoniacque généreusement fournis par le droguier de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Tours, par l'intermédiaire du Dr. Leslie Boudesocque-Delaye.

Tableau 5 – Drogues végétales de référence utilisées dans l'étude

Ingrédients	Code	Espèce identifiée	Partie de la plante	Pays d'origine	Origine et donateur
Myrrhe	COMA2	<i>C. abyssinica</i>	Gomme-résine séchée en bloc	Somalie	Droguier de l'UMR 7200, Strasbourg
	MYRR2	?	Gomme-résine séchée en larmes	?	Droguier de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Tours
Gomme ammoniacque	AMMO3	?	Gomme-résine séchée en larmes	?	Droguier de la Faculté de Pharmacie de Tours

Des démarches ont également été entreprises auprès des jardins botaniques royaux de Kew, qui ont prévu de nous faire parvenir à titre gracieux des échantillons de résine d'*Astragalus sarcocolla* (Iran) et de résine de *Ferula ammoniacum* (Iran ou Afghanistan).

L'ensemble des codes utilisés pour désigner les différentes drogues sont résumées dans l'**index** disponible en fin de document p278 (version imprimée).

3. Extraits végétaux obtenus

Trois types d'extraction solide/liquide non-successives ont été réalisées sur chacune des drogues végétales, dans 3 solvants de polarité décroissante : l'éthanol à 70% EtOH 70%, l'acétate d'éthyle EtOAc et le dichlorométhane DCM (**Part.Exp.2.2**). Les extraits obtenus sont présentés dans le **Tableau 6**. Les rendements d'extraction sont généralement élevés car il s'agit d'exsudats et non pas d'organes (absence de tissus cellulaires). Seuls l'extrait DCM du suc d'aloès a été obtenu avec un rendement trop faible pour qu'il puisse être utilisé dans la suite de l'étude. Ces extraits ont ensuite été analysés pour déterminer et/ou confirmer l'identité des drogues (partie **4**), puis ont été employés dans les différents tests biologiques *in vitro* (**Chapitre 3** – Etude des activités biologiques des différents ingrédients).

Tableau 6 – Extraits des drogues végétales : masses (m) et rendements (R) (- : rendements trop faibles)

Drogues	Solvant	Code	m sèche (g)	m extraite (g)	R (%)
Suc d'A. ferox commercial ALOF	EtOH 70%	ALOF-EH	20	15	75
	EtOAc	ALOF-A	20	1	5
	DCM	ALOF-D	-	-	-
Gomme résine de C. abyssinica commerciale COMA1	EtOH 70%	COMA1-EH	20	3	15
	EtOAc	COMA1-A	30	2	6
	DCM	COMA1-D	10	2	20
Myrrhe traditionnelle MYRR1	EtOH 70%	MYRR1-EH	4,0583	0,6408	15,8
	EtOAc	MYRR1-A	4,2290	0,6210	14,7
	DCM	MYRR1-D	4,0915	1,1279	27,6
Gomme sarcocolle traditionnelle SARC	EtOH 70%	SARC-EH	20	11	55
	EtOAc	SARC-A	20	2	10
	DCM	SARC-D	10	1	10
Gomme ammoniacale traditionnelle AMMO1	EtOH 70%	AMMO-EH1	12	4	33
		AMMO-EH2	15	7,0850	47
	EtOAc	AMMO-A1	8	4	50
		AMMO-A2	21,2457	9,8796	46,5
	DCM	AMMO-D1	5	2	40

Pour les premiers extraits, une balance de faible précision a été utilisée (1g) tandis que pour les extraits les plus récents, une balance précise à 0,0001 g a été utilisée.

Pour la drogue de référence HUML, un extrait méthanolique MeOH a été réalisé (HUML-MeOH) afin d'évaluer son activité antibactérienne. Pour les drogues de référence COMA2, MYRR2 et AMMO3 pour l'identification botanique, seuls des extraits acétate d'éthyle (A) ont été réalisés.

Dans le but d'évaluer plus finement l'activité antibactérienne des remèdes et notamment l'interaction positive entre les différentes drogues, des extractions ont également été réalisées sur le mélange des 4 drogues végétales des remèdes.

Les 4 drogues végétales ALOF, COMA1, SARC et AMMO1 ont été broyées séparément puis mélangées dans les proportions des remèdes, à savoir 1/1/1/1 (m/m/m/m). Ce mélange, que nous appellerons ici RDV, a été extrait avec les mêmes solvants utilisés pour les drogues seules : EtOH 70%, EtOAc et DCM. Les rendements d'extraction correspondants sont présentés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 – Extraits du mélange des 4 drogues végétales des remèdes RDV : masses (m) et rendements (R)

Drogues	Solvant	Code	m sèche (g)	m extraite (g)	R (%)
RDV – Mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m)	EtOH 70%	RDV-EH1	8	4	50
		RDV-EH2	11	7	64
	EtOAc	RDV-A	8	1	12
	DCM	RDV-D	12	2	16

4. Contrôles de l'identité botanique des différentes drogues végétales et caractérisation des extraits

Pour les drogues bénéficiant d'une monographie analytique dans l'édition en vigueur de la Ph. Eur.¹¹¹, les contrôles d'identité A, B et C prescrits dans ces monographies ont été réalisés (**Part.Exp-2.3.1**). En complément et pour les drogues n'étant pas inscrites à la Ph. Eur., les extraits bruts ont été analysés par HPLC-DAD ainsi que HPLC-HRMS/MS ESI + et ESI – selon une méthode optimisée pour chacun (**Part.Exp-2.3.2**), afin de les caractériser et apporter des éléments de réponse sur l'espèce productrice. La comparaison à un échantillon de référence par HPLC-DAD et HPLC-HRMS/MS a également été réalisée lorsque c'était possible.

4.1. Contrôle de l'identité et caractérisation chimique du suc d'*A. ferox* ALOF

4.1.1. Contrôle selon la Ph. Eur.

Le contrôle du suc séché et pulvérisé de l'*A. ferox* a été réalisé selon la monographie de la Ph. Eur. 01/2017:0258 (**Annexe 2**) : la poudre était effectivement brun-vert (**Figure 15-C** à la page 28) et la Chromatographie sur Couche Mince CCM réalisée présentait bien les bandes attendues sous UV 365 nm (**Figure 30**).

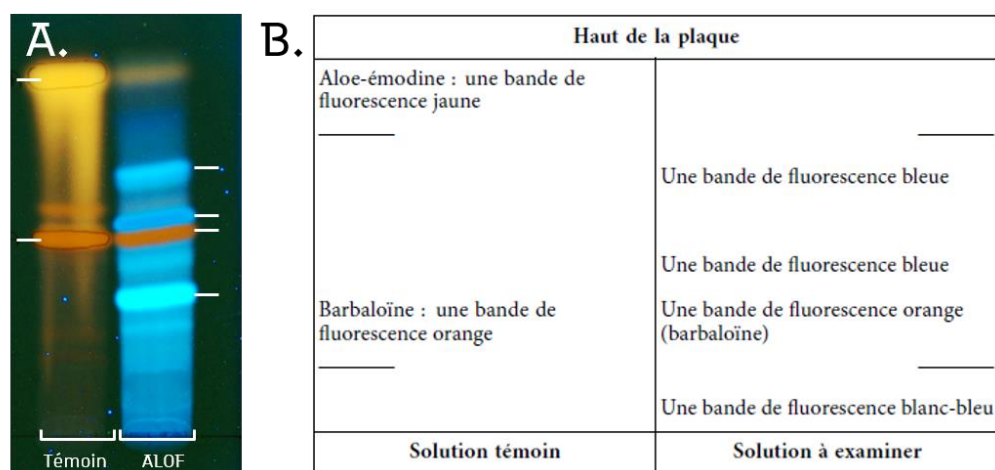


Figure 30 – CCM contrôle du suc d'*A. ferox* ALOF réalisée selon la monographie analytique (Ph. Eur.¹¹¹ **Annexe 2**), observée sous UV 365 nm : **A.** CCM avec la solution témoin d'aloe-émodine + barbaloïne (Témoins) et l'extrait de suc (ALO), gel de silice avec un système H₂O/MeOH/EtOAc 13/10/100 v/v/v ; **B.** Résultats attendus par la monographie de la Ph. Eur.

Afin de différencier le suc d'*A. ferox* et d'*A. vera*, la Ph. Eur. se base sur la présence ou non de bandes de fluorescence vert-bleu intenses au-dessous de la bande blanc-bleu du tiers inférieur¹¹¹ : nous n'avons observé aucune de ces bandes. Après révélation avec une solution de KOH (non illustré ici), la bande correspondant à la barbaloine sous UV 365 nm est bien devenue brune et une bande violette était visible à un rapport frontal Rf inférieur. La drogue est bien conforme à l'espèce *A. ferox* d'après la Ph. Eur.

Le contrôle réalisé selon la Ph. Eur. identifie donc la drogue ALOF au suc d'*A. ferox*. Néanmoins, bien que la CCM soit une méthode simple et puissante, elle est soumise au biais humain notamment concernant la perception des couleurs. Aussi, ce contrôle d'identité a été complété par une caractérisation chimique et l'identification des composés principaux détectés par HPLC-HRMS/MS.

4.1.2. Contrôle et caractérisation par HPLC-DAD et HPLC-HRMS/MS

Les chromatogrammes obtenus pour les 2 extraits de suc d'*A. ferox* commercial ALOF ont montré 4 pics majoritaires communs en HPLC-DAD (**Figure 31**).

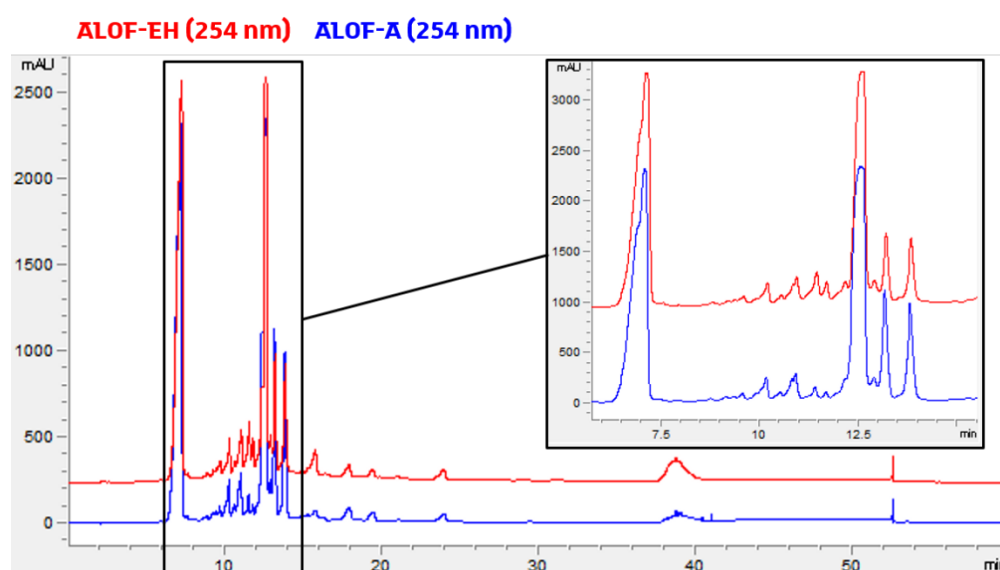


Figure 31 – Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits hydroalcoolique (**EH**) et acétate d'éthyle (**A**) du suc d'*A. ferox* commercial **ALOF** (méthode **REFERENCE**)

En HPLC-HRMS, on retrouve les mêmes pics majoritaires pour l'extrait hydroalcoolique du suc d'aloès ALOF-EH, que ce soit en ionisation positive ESI+ ou en ionisation négative ESI- (**Figure 32** et **Tableau 8**).

Sur la base des formules brutes prédites à partir des masses des ions protonés et déprotonés de ces 4 pics et de la littérature, nous avons pu émettre une hypothèse sur leur identité. Il s'agirait alors de l'**aloèsine 20** $C_{19}H_{22}O$, l'**aloèrésine A 21** $C_{28}H_{28}O_{11}$ et **deux aloïnes** $C_{21}H_{22}O_9$, probablement l'aloïne A & B **18** et **19** (**Figure 32**, structures représentées dans la **Figure 16-A**), confirmant l'identité botanique de notre drogue. En effet, ces composés sont décrits comme les 4 composés majoritaires du suc d'*A. ferox*, présents dans un ratio moyen de 2,5/3,5/5/1/1²⁰². Cette identification putative des composés majoritaires vient donc appuyer l'identification de la drogue ALOF comme étant du suc d'*A. ferox*. Afin de confirmer l'identification de ces composés, il faudra les isoler et résoudre leur structure par RMN ou bien les comparer à un standard.

Sur la base des caractères organoleptiques, des identifications A, B et C de la Ph. Eur. et des masses détectées dans l'extrait EtOH70%, nous avons considéré qu'il s'agissait bien de suc d'*A. ferox*.

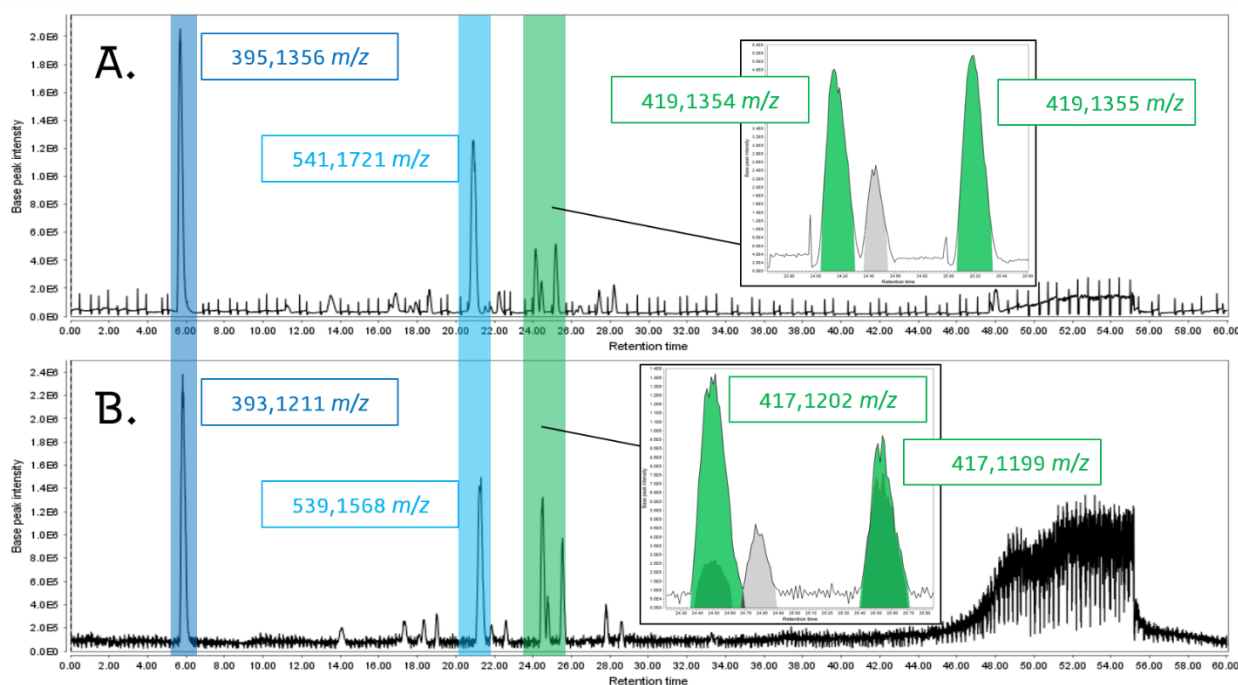


Figure 32 – Chromatogrammes HPLC-HRMS/ESI (base peak) de l'extrait hydroalcoolique de suc d'*A. ferox* commercial **ALOF-EH** (méthode **ALOES**) : **A.** HPLC-HRMS/ESI+ ; **B.** HPLC-HRMS/ESI-

Tableau 8 –Données HPLC-HRMS/MS des pics majoritaires de l'extrait hydroalcoolique du suc d'*A. ferox* commercial **ALOF-EH** (méthode **DOREMA**)

ID	ESI	RT (min)	m/z	Ions majoritaires	Formule brute	Δ ppm mDa	4 fragments les plus intenses en MS/MS (majoritaire en gras)	Identification 203,204
1	+	5,69	395,1356	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	3,52 1,39	203,0696 ; 233,0814 ; 245,0810 ; 275,0918	Aloèsine 20
	-	5,82	393,1211	[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	6,47 2,54	203,0712 ; 231,0664 ; 245,0827 ; 273,0777	
2	+	20,89	541,1721	[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₁	2,06 1,11	147,0442 ; 257,0802 ; 275,0909 ; 377,1215	Aloèrésine A 21
	-	21,30	539,1568	[M-H] ⁻	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₁	2,71 1,46	19,0499 ; 163,0403 ; 243,0674 ; 375,1076	
			1079,3194	[2M-H]			163,0406 ; 375,1097 ; 393,1197 ; 539,1565	
3	+	24,14	419,1354	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	2,85 1,19	85,0297 ; 211,0758 ; 239,0706 ; 257,0811	Aloïne A ou B 18 et 19
	-	24,51	417,1202	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	2,85 1,19	251,0703 ; 255,0630 ; 268,0743 ; 297,0779	
			463,1253	[M+HCOO] ⁻			X	
4	+	25,18	419,1355	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	3,08 1,29	85,0284 ; 211,0752 ; 239,0701 ; 257,0806	Aloïne A ou B 18 et 19
	-	25,54	417,1199	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	3,22 1,34	251,0716 ; 255,0637 ; 268,0718 ; 297,0767	
			463,1253	[M+HCOO] ⁻			255,0642 ; 268,0740 ; 279,0643 ; 297,0773	

Une absence de fragmentation est notée X.

4.2. Contrôle de l'identité et caractérisation chimique de la myrrhe commerciale COMA1

4.2.1. Contrôle selon la Ph. Eur.

Le contrôle de la myrrhe séchée et pulvérisée de *C. abyssinica* a été réalisé selon la monographie de la Ph. Eur.¹¹¹ 07/2017:1349 (**Annexe 3**). Les différents éléments attendus pour la diagnose microscopique ont bien été observés au microscope optique. A l'inverse, la CCM réalisée n'était pas conforme à la monographie de la Ph. Eur. de par l'intensité et la couleur des bandes observées. Sous UV à 365 nm, aucune bande de fluorescence bleue ou violette ne devait être observée dans le tiers inférieur de la CCM et effectivement, l'extrait de COMA1 ne présentaient que des bandes de fluorescence blanche (non illustré ici). Mais après révélation avec la solution d'aldéhyde anisique, l'extrait réalisé dans les conditions de la monographie a montré une concentration en composés en deçà de ce qui était attendu (**Figure 33**). En effet, les bandes étaient à peine visibles : il a fallu faire un dépôt 8 fois plus concentré pour pouvoir les visualiser correctement et distinguer leur couleur. De plus, le profil était quelque peu différent de celui attendu, notamment concernant la couleur de la première bande, censée être marron mais que nous distinguons comme violette (**Figure 33**).

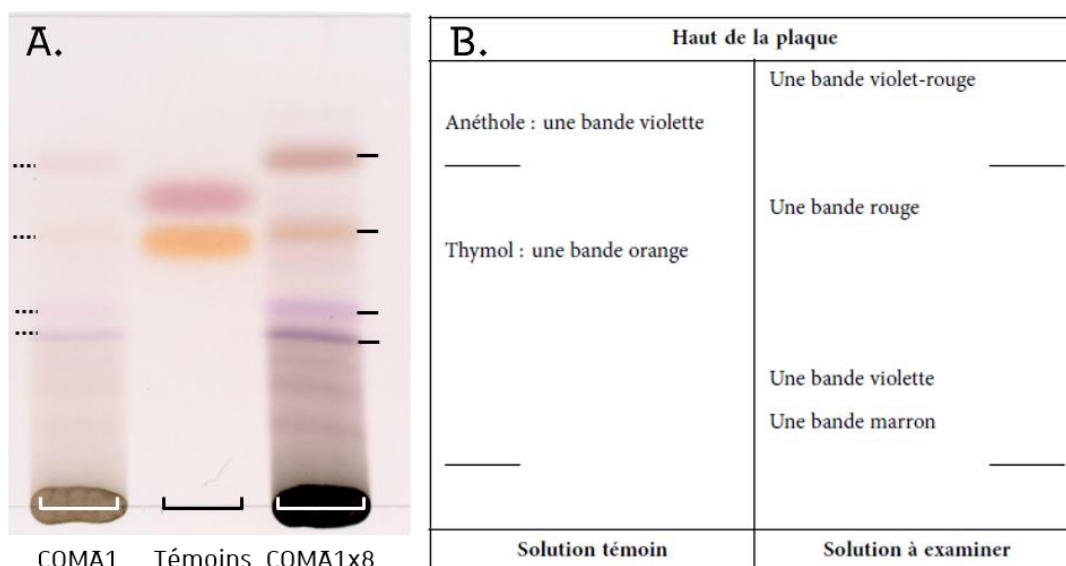


Figure 33 - CCM contrôle de la myrrhe de *C. abyssinica* commerciale réalisée selon la monographie analytique (Ph. Eur¹¹¹ **Annexe 3**) après révélation à la solution d'anisaldéhyde : **A.** CCM avec l'extrait de myrrhe (COMA1), la solution témoin (Témoins) et l'extrait de myrrhe 8 fois concentré (COMA1x8), gel de silice avec un système acide acétique glacial/éther isopropylique/cyclohexane 10/40/60 (v/v/v) ; **B.** Résultats attendus par la monographie de la Ph. Eur.

D'après les contrôles réalisés selon la Ph. Eur., il semblerait que COMA1 soit bien de la myrrhe, mais particulièrement pauvre en composés marqueurs. Cela pourrait être dû à une perte partielle des composés marqueurs pendant l'étape de pulvérisation ou le stockage. Nous avons donc comparé cet échantillon à celui d'une autre myrrhe issue de *C. abyssinica* (COMA2).

4.2.2. Comparaison à un échantillon de référence par CCM

Un échantillon d'oléorésine de *C. abyssinica* (COMA2) issu du droguier de l'UMR7200 a été utilisé comme référence, afin de comparer les profils observés en CCM dans les conditions de la Ph. Eur (**Figure 34**).

La myrrhe de chez Cailleau Herboristerie COMA1 est apparue comme bien moins concentrée en composés marqueurs que la myrrhe du droguier COMA2, confirmant ce que les premiers contrôles avaient suggérés. La myrrhe de chez Cailleau Herboristerie n'est donc pas de qualité Ph. Eur. Un dernier contrôle a été réalisé par analyse en HPLC-DAD et HPLC-HRMS, afin d'observer des composés majoritaires qui permettraient d'identifier la myrrhe COMA1 de chez Cailleau Herboristerie.

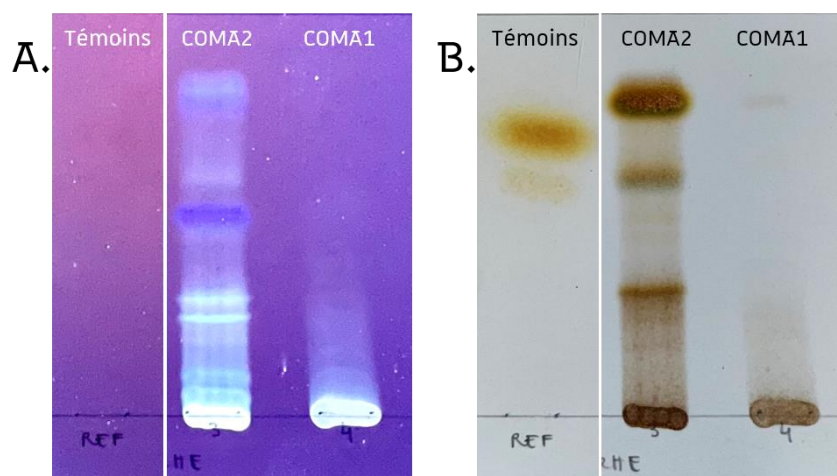


Figure 34 – Comparaison des CCM de la myrrhe *C. abyssinica* commerciale COMA1 et de référence COMA2, selon la Ph. Eur.¹¹¹ (**Annexe 3**), gel de silice avec un système acide acétique glacial/éther isopropylique/cyclohexane 10/40/60 (v/v/v) : **A.** sous UV à 365 nm ; **B.** après révélation à la solution d’anisaldéhyde

4.2.3. Caractérisation par HPLC-DAD et comparaison à un échantillon de référence

Les chromatogrammes HPLC-DAD des 3 extraits de COMA1 n’ont montré que des signaux faibles malgré l’injection standard (10 µL à 10 mg/mL) (**Figure 35**). De plus, lorsqu’on injecte les extraits à l’acétate d’éthyle de la myrrhe de *C. abyssinica* commerciale COMA1 et celle de référence COMA2, les signaux ne sont en rien comparables en termes d’intensité et de temps de rétention (**Figure 36**). À l’inverse, le profil HPLC-DAD de COMA2-A est très semblable à celui d’autres myrrhes (**Chap.2 - 4.3.3**).

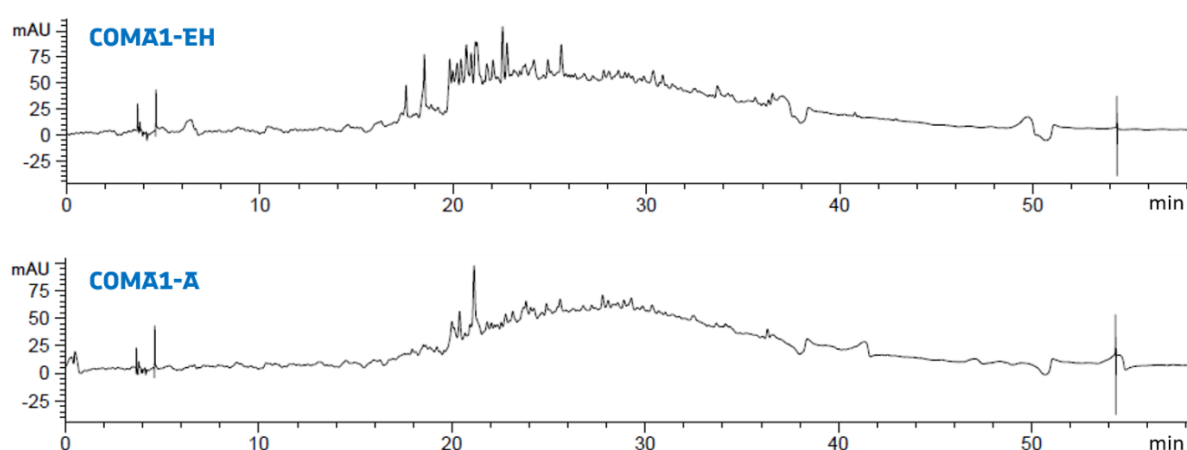


Figure 35 – Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits hydroalcoolique (**EH**) et à l’acétate d’éthyle (**A**) (chromatogramme de l’extrait au DCM similaire) de la myrrhe de *C. abyssinica* commerciale **COMA1** (méthode **DOREMA**)

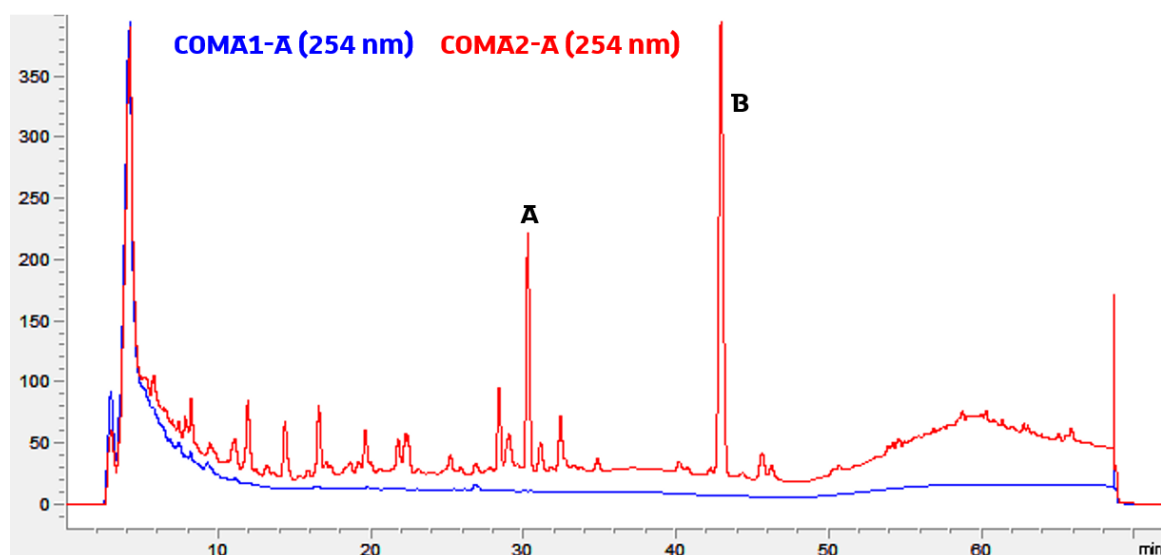


Figure 36 –Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits acétate d'éthyle des myrrhe de *C. abyssinica* commerciale (Cailleau Herboristerie) **COMA1-A** et de référence (droguier UM7200 Strasbourg) **COMA2-A** (méthode **DOREMA**)

4.2.4. Caractérisation par HPLC-HRMS et comparaison à un échantillon de référence

De la même manière, très peu d'ions sont détectés en HPLC-HRMS pour les extraits de la myrrhe de *C. abyssinica* commerciale COMA1 et leur intensité est très proche du bruit (non illustré ici). À l'inverse, dans les mêmes conditions d'injection plusieurs composés ont pu être détectés pour l'extrait à l'acétate d'éthyle de myrrhe de *C. abyssinica* de référence COMA2 (**Figure 37** et **Tableau 9**).

Parmi les deux pics majoritaires en HPLC-UV, seul le pic **A** correspond à un composé s'ionisant en HPLC-HRMS, avec un ion protoné $[M+H]^+$ à m/z 275,1650 (**Tableau 9**). Le pic **B** ne s'ionise pas par *electrospray* : il pourrait alors s'agir d'un terpénoïde dépourvu d'oxygène. Un autre composé majoritaire est révélé en ESI+, correspondant à un ion protoné $[M+H]^+$ à m/z 233,1546 (**Figure 37** et **Tableau 9**). Ces deux composés ainsi que les quelques autres ions détectés sont également présents dans les myrrhes analysées par la suite, dans des proportions néanmoins différentes (**Chap.2-4.3**).

Ces analyses ont mis en évidence que la myrrhe de *C. abyssinica* commerciale COMA1 était pauvre en composés détectables en HPLC-DAD et en HPLC-HRMS en comparaison à la myrrhe de référence (droguier de l'UMR7200, Strasbourg) COMA2, les deux résines ayant été extraites et analysées dans les mêmes conditions.

La myrrhe de *C. abyssinica* COMA1 de chez Cailleau Herboristerie n'est donc pas une myrrhe de qualité Ph. Eur. : elle est bien moins concentrée en composés marqueurs qu'un échantillon de référence et a peu de composés détectables en UV et en ESI/MS en général. Nous avons donc considéré que cette myrrhe n'était pas de qualité suffisante pour continuer à l'utiliser dans notre étude et nous lui avons préférée une myrrhe traditionnelle (MYRR1).

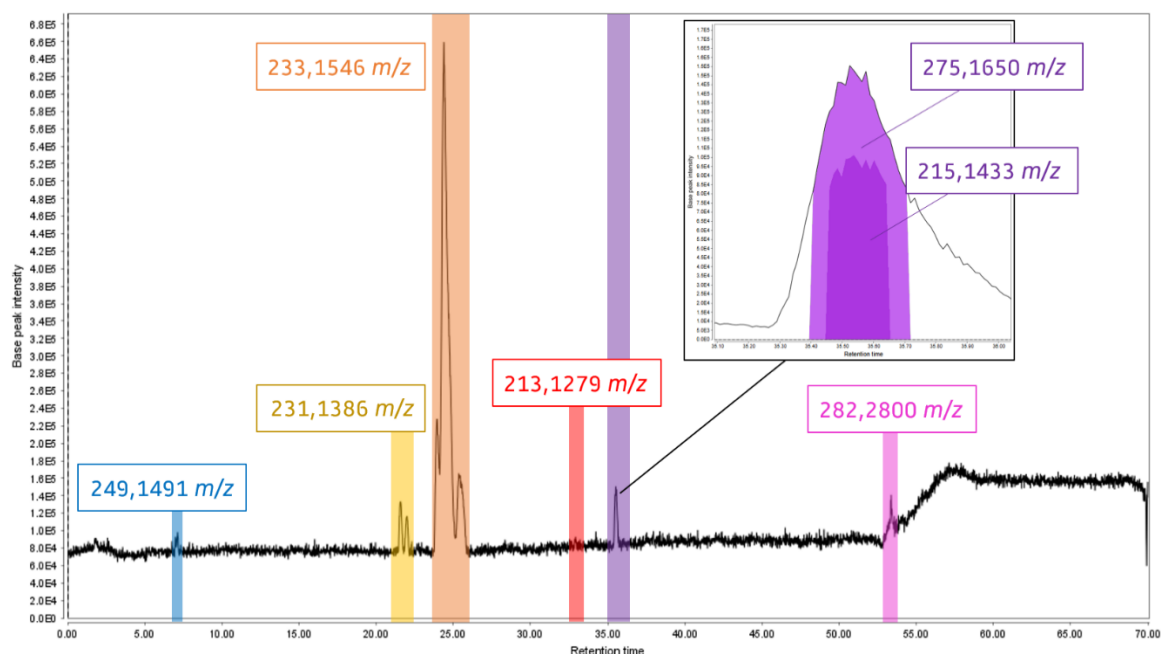


Figure 37 – Chromatogramme HPLC-HRMS/ESI+ (base peak) de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe de *C. abyssinica* de référence (droguier UMR7200) **COMA2-A** (méthode **DOREMA**)

Tableau 9 – Ions protonés et déprotonés des pics majoritaires en HPLC-HRMS/ESI+ de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe de *C. abyssinica* de référence (droguier UMR7200) **COMA2-A** (méthode **DOREMA**)

ID	RT (min)	m/z	Ions majoritaires	Formule brute	Δ ppm	Δ mDa	4 fragments les plus intenses en MS/MS (majoritaire en gras)	Identification
1	7,13	249,1491	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	0,12	0,03	105,0645 ; 109,0629 ; 111,0775 ; 143,0855	/
6	21,58	231,1386	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	0,41	0,10	79,0537 ; 91,0547 ; 119,0867 ; 128,0604	Curzérénone 22 ²⁰⁵
7	24,39	233,1546	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	1,91	0,45	91,0547 ; 105,0698 ; 117,0708 ; 119,0845	/
8	32,92	213,1279	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₆ O	-0,19	-0,04	79,0526 ; 105,0690 ; 128,0618 ; 165,0700	/
9	35,52	275,1650	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₂ O ₃	1,02	0,28	90,0639 ; 119,0842 ; 107,0838 ; 145,0757 (215,1432)	2-acétoxy- furanodiène
	35,54	215,1433	[M-AcOH+H] ⁺				X	41 ²⁰⁶
10	53,38	282,2800	/	/	/	/	55,0540 ; 57,0696 ; 69,0697 ; 71,0829	/

Une absence de fragmentation est notée X et une absence d'identification est notée /.

4.3. Contrôle de l'identité et caractérisation chimique de la myrrhe traditionnelle MYRR1

La première myrrhe de chez Cailleau Herboristerie n'étant pas conforme, un second approvisionnement (MYRR1) a été fait dans une boutique traditionnelle à Rabat, Maroc.

4.3.1. Contrôle selon la Ph. Eur.

Contrairement à la première myrrhe, la CCM réalisée était conforme à la monographie de la Ph. Eur. avec les 4 bandes attendues bien visibles après révélation avec la solution d'aldéhyde anisique, sans nécessiter de déposer plusieurs fois l'échantillon afin de le concentrer (**Figure 38** page suivante). Cette myrrhe MYRR1 est donc de qualité pharmacopée d'après l'identification C de la Ph. Eur.

4.3.2. Comparaison à un échantillon de référence par CCM

Le droguier de Tours nous a fourni un échantillon d'oléorésine enregistré comme myrrhe (MYRR2), sans que l'espèce ne soit précisée. Nous avons réalisé la CCM de MYRR2 en même temps que celle de MYRR1 afin de les comparer : les profils CCM sont très semblables avec 2 bandes caractéristiques majoritaires en haut de plaque (**Figure 38** page suivante). Le profil est par ailleurs très semblable à celui de la myrrhe de *C. abyssinica* COMA2 du droguier de l'UMR 7200 (**Figure 34**). On peut donc considérer que notre échantillon MYRR1 est bien de la myrrhe, venant confirmer les contrôles de la Ph. Eur.

4.3.3. Caractérisation par HPLC-DAD et comparaison à un échantillon de référence

Les chromatogrammes HPLC-DAD des 3 extraits de MYRR1 mais aussi de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la myrrhe de référence MYRR2-A ont montré les 2 mêmes pics majoritaires (**Figure 39** page suivante). Ces signaux sont par ailleurs identiques à ceux trouvés dans l'extrait à l'acétate d'éthyle de myrrhe de *C. abyssinica* du droguier de l'UMR7200 COMA2-A (**Figure 39**).

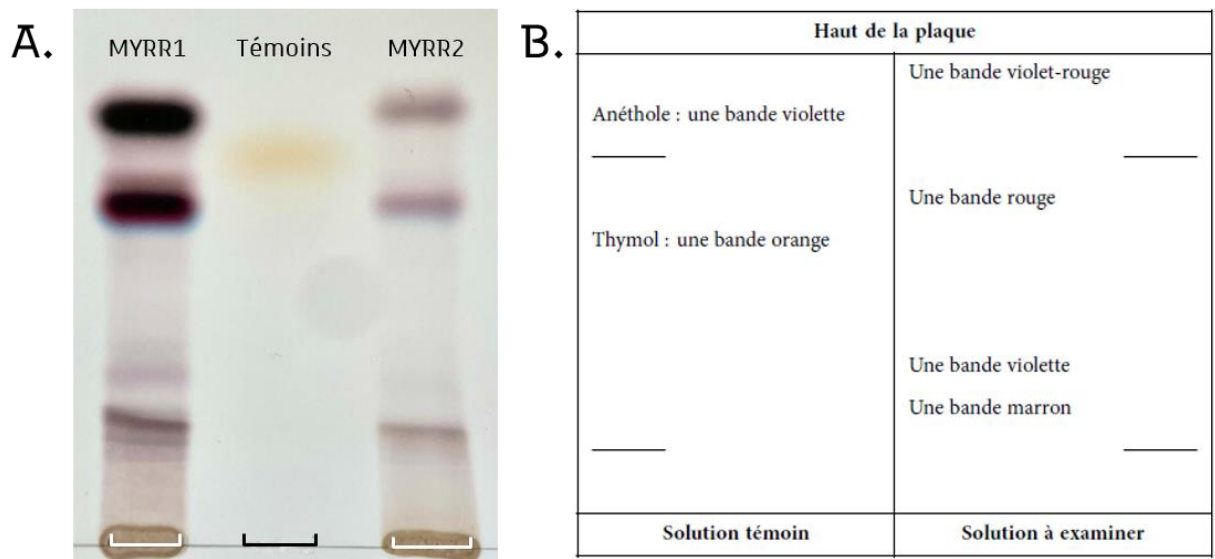


Figure 38 – CCM contrôle de la myrrhe traditionnelle MYRR1 et de référence MYRR2 réalisées selon la Ph. Eur. (**Annexe 3**), après révélation à la solution d’anisaldéhyde : **A.** CCM avec l’extrait de MYRR1, la solution témoin et l’extrait de MYRR2, gel de silice avec un système acide acétique glacial/éther isopropylique/cyclohexane 10/40/60 (v/v/v) ; **B.** Description des résultats attendus par la Ph. Eur.

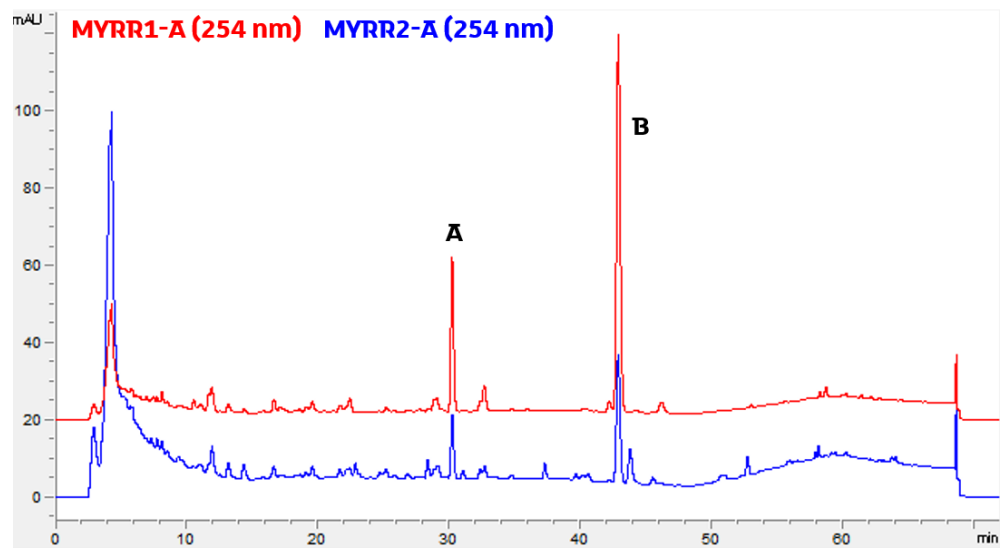


Figure 39 – Chromatogrammes HPLC-DAD à 254 nm des extraits acétate d’éthyle de la myrrhe traditionnelle (Maroc) **MYRR1-A** (représentatif des 3 extraits) et de la myrrhe de référence (droguier Tours) **MYRR2-A** (méthode **DOREMA**)

4.3.4. Caractérisation par HPLC-HRMS et comparaison à un échantillon de référence

Plusieurs composés ont été détectés en HPLC-HRMS/ESI+ dans les 3 extraits de la résine MYRR1, là aussi sans différence notable entre les 3 extraits (**Figure 40** et **Tableau 10** page 75). Un certain nombre de composés sont communs avec ceux détectés en HPLC-HRMS/ESI+ pour l'extrait à l'acétate d'éthyle de la résine de référence MYRR2 (**Figure 41** et **Tableau 11** page 76). On remarque néanmoins un décalage entre du chromatogramme de MYRR2-A (**Figure 41**) par rapport aux chromatogrammes des deux autres myrrhes, à l'origine des Δ importants pour la prédiction de formule (**Tableau 11**). Aucun composé n'a pu être ionisé en HPLC-HRMS/ESI- (non illustré ici).

Malgré une différence de calibration et d'élution ne permettant pas une comparaison stricte des chromatogrammes et des masses mesurées, les extraits à l'acétate d'éthyle de MYRR1 (représentatif de tous les extraits), de MYRR2 mais également COMA2 semblent avoir plusieurs composés en commun (**Figure 37**, **Figure 40** et **Figure 41**). Les deux principaux détectés pour les résines MYRR1 et MYRR2 sont le pic **7** entre 24 et 25 minutes, avec un ion protoné $[M+H]^+$ de m/z 233,15 (détecté uniquement en masse) et le pic **9** entre 35 et 36 minutes, avec un ion protoné $[M+H]^+$ de m/z 275,16 et un fragment protoné (fragmentation dans la sonde) $[M+H]^+$ de m/z 215,14 (correspondant au pic **A** en HPLC-UV, **Figure 39**). Sa ressemblance avec la myrrhe de référence du droguier de Tours (espèce inconnue), mais également en partie avec la myrrhe de *C. abyssinica* du droguier de Strasbourg, vient confirmer que la résine MYRR1 est bien de la myrrhe.

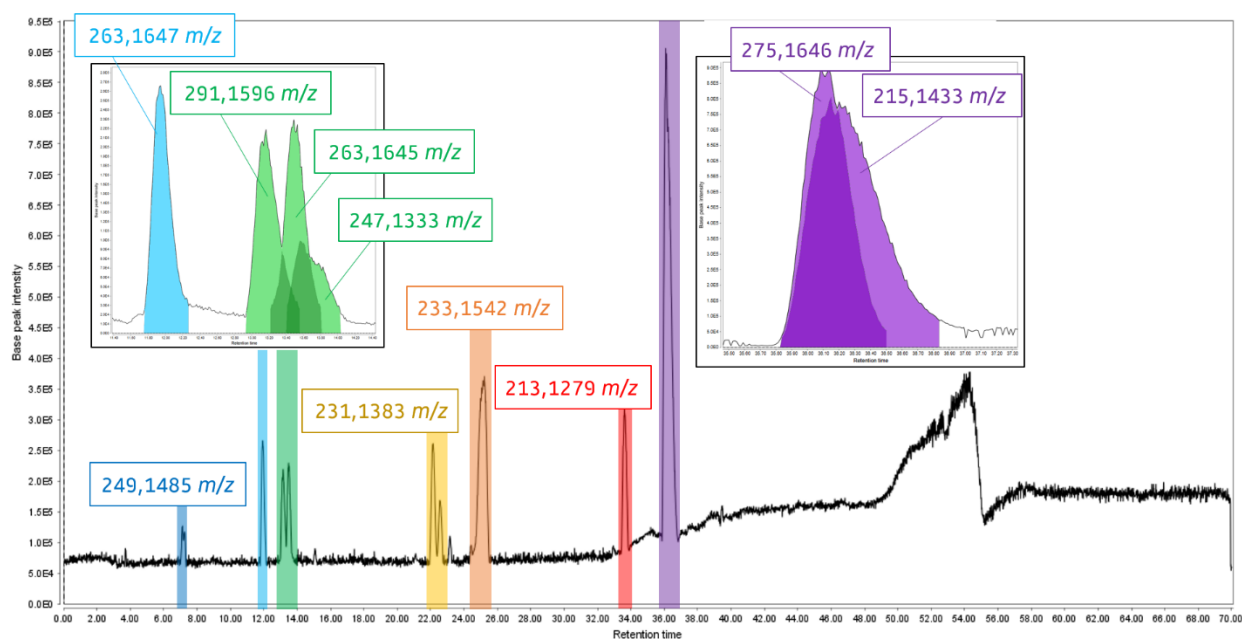


Figure 40 – Chromatogramme HPLC-HRMS/ESI⁺ (base peak) de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe traditionnelle (Maroc) **MYRR1-A**, représentatif des 3 extraits (méthode **DOREMA**)

Tableau 10 – Ions protonés des pics majoritaires en HPLC-HRMS/ESI⁺ de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe provenant d'un tradithérapeute marocain **MYRR1-A** (méthode **DOREMA**)

ID	RT (min)	m/z	Ions majoritaires	Formule brute	Δ ppm	Δ mDa	4 fragments les plus intenses en MS/MS (majoritaire en gras)	Identification
1	7,14	249,1485	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	- 2,29	- 0,57	81,0700 ; 95,0868 ; 109,0641 ; 142,0753	/
2	11,94	263,1647	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	- 0,07	- 0,02	91,0528 ; 105,0674 ; 119,0828 ; 128,0632	/
3	13,16	291,1596	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₂ O ₄	- 0,12	- 0,03	91,0532 ; 105,0673 ; 119,0836 ; 157,1010	/
4	13,49	263,1645	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	- 0,83	- 0,22	91,0532 ; 119,0846 ; 142,0800 ; 157,0988	/
5	13,55	247,1333	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	- 0,48	- 0,12	77,0377 ; 105,0729 ; 119,0826 ; 143,0815	/
6	22,14	231,1383	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	- 0,89	- 0,2	77,0381 ; 105,0700 ; 129,0662 ; 142,0738	Curzérénone 22 ²⁰⁵
7	25,22	233,1542	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	0,19	0,05	79,0530 ; 91,0550 ; 105,0704 ; 131,0845	/
8	33,61	213,1279	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₆ O	- 0,19	- 0,04	77,0387 ; 105,0700 ; 165,0689 ; 155,0857	/
9	36,08	275,1646	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₂ O ₃	- 0,43	- 0,12	107,0854 ; 109,0641 ; 119,0851 ; 145,074	2-acétoxy- furanodiène 41 ²⁰⁶
	36,15	215,1433	[M-AcOH+H] ⁺				105,0700 ; 91,0539 ; 107,0844 ; 119,0847	

Une absence de fragmentation est notée X et une absence d'identification est notée /.

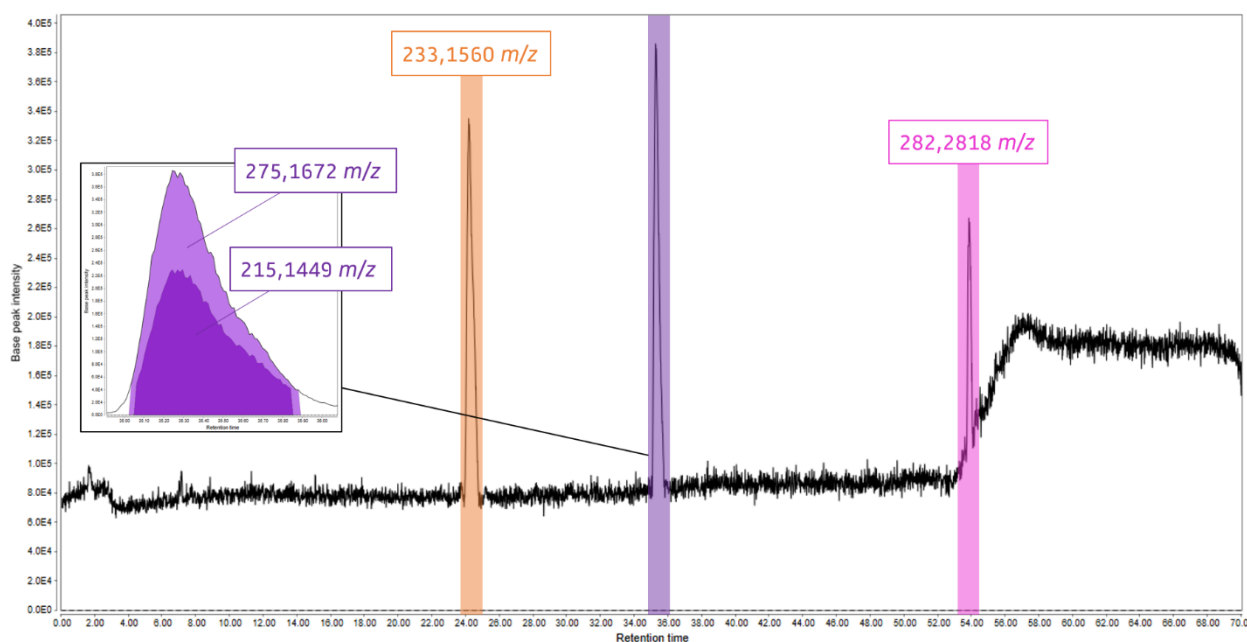


Figure 41 – Chromatogramme HPLC-HRMS/ESI+ (base peak) de l'extrait acétate d'éthyle (**A**) de la myrrhe de référence du droguier de tours **MYRR2** (méthode **DOREMA**)

Tableau 11 – Ions protonés des pics majoritaires en HPLC-HRMS/ESI+ de l'extrait acétate d'éthyle (**A**) de la myrrhe provenant d'un tradithérapeute marocain **MYRR2**, représentatif des 3 extraits (méthode **DOREMA**)

ID	RT (min)	m/z	Ions majoritaires	Formule brute	Δ ppm	Δ mDa	4 fragments les plus intenses en MS/MS (majoritaire en gras)	Identification
7	24,16	233,1560	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	7,91	1,85	91,0560 ; 105,0685 ; 119,0875 ; 131,0856	/
9	35,24	275,1672	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₂ O ₃	9,01	2,48	107,0863 ; 109,0658 ; 119,0849 ; 145,0693	2-acétoxy-furanodiène
	35,30	215,1449	[M-AcOH+H] ⁺				X	41 ²⁰⁶
10	53,83	282,2818	/	/	/	/	55,0548 ; 57,0687 ; 69,0698 ; 83,0850	/

Une absence de fragmentation est notée X et une absence d'identification est notée /

Les Δ sont ici particulièrement élevés, indiquant un décalage dans la mesure par rapport aux autres myrrhes

4.3.5. Identification putative des composés majoritaires communs aux différentes myrrhes

L'ion majoritaire des pics MYRR1-A et MYRR2-A correspond aux ions protonés $[M+H]^+$ à m/z 275,1646 et $[M+H]^+$ à m/z 275,1672, respectivement. Ces deux ions pourraient correspondre au $[M+H]^+$ d'un composé de formule brute $C_{17}H_{22}O_3$ ($[M+H]^+$ calculé à m/z 275,16417) (**Tableau 10** et **Tableau 11**). Il est accompagné d'un ion presque aussi intense ayant un signal m/z à 215,1433 pour MYRR1-A et à 215,1449 pour MYRR2-A, ces deux ions pouvant correspondre au $[M+H]^+$ d'un composé de formule brute $C_{15}H_{18}O$ ($[M+H]^+$ calculé à m/z 215,14304) (**Tableau 10** et **Tableau 11**).

Dans la littérature scientifique de la myrrhe, on retrouve deux composés avec ces formules brutes : le 2-acétoxyfuranodiène **41** $C_{17}H_{22}O_3$ ²⁰⁷ et du furanoeudesma-1,3-diène **42** $C_{15}H_{18}O$ ²⁰⁸ (**Figure 42**), majoritairement présents dans l'huile essentielle de *C. myrrha*^{207,208}.

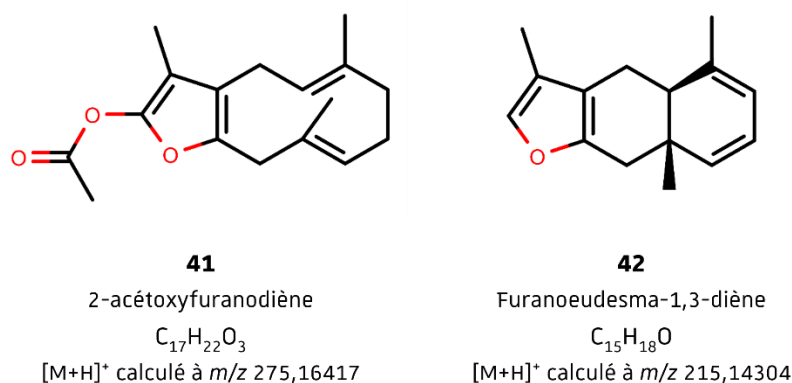


Figure 42 – Structure des deux furanosesquiterpènes chez la myrrhe pouvant correspondre au composé majoritaire de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe traditionnelle **MYRR1-A**

Ces deux composés ont été identifiés comme les composés majoritaires d'une sous-fraction obtenue par EtOH80% - DCM - éther de pétrole de la gomme-résine de *C. myrrha*²⁰⁹. Ils sont également les composés majoritaires de l'huile essentielle (HE) et de l'extrait à l'hexane d'une résine de *C. molmol* (syn. *C. myrrha*). Le 2-acétoxyfuranodiène **41** a été dosé à 26,82 % dans l'HE et à 9,21 % dans l'extrait, tandis que le furanoeudesma-1,3-diène **42** y a été dosé à 20,4% et 15,99 %²¹⁰. On relève également la présence du 2-acétoxyfuranodiène **41** dans un extrait chloroforme de myrrhe commerciale²¹¹ et un autre extrait hexane de résine de *C. molmol* (syn. *C. myrrha*)²¹¹. Concernant le furanoeudesma-1,3-diène **42**, il est considéré comme le composant majoritaire de l'huile essentielle de myrrhe par de nombreuses études²¹¹ et a été dosé à 12,5%²¹¹, 15%²¹¹, 19%²⁰⁸ dans l'huile essentielle de *C. myrrha*. On l'a également identifié comme l'un des composé principaux d'extraits à l'hexane de *C. myrrha* et de *C. molmol* (syn. *C. myrrha*)²¹¹. On considère que ce composé, mélangé au lindrestrène, donne son odeur si particulière à la myrrhe²¹¹. [Sur la base de la littérature de la myrrhe,](#)

ces deux hypothèses d'identification viendraient l'une comme l'autre appuyer l'identification de la résine MYRR1 comme étant de la myrrhe.

Il a été supposé dans un premier temps que l'ion 275 m/z était un adduit acétate d'éthyle de l'ion 215 m/z , du fait que des solvants avec 0,1 % d'acide acétique aient été utilisés sur la colonne HPLC peu de temps avant l'analyse. Cependant, si cet adduit se rencontre en *electrospray* négatif MS/ESI⁻, il n'en est pas fait pas mention pour les adduits communs en *electrospray* positif MS/ESI⁺.

A l'inverse, cet ion 215 m/z pourrait être le fragment de l'ion m/z 275 issu d'une fragmentation dans la source (**Figure 43**). Par ailleurs, dans l'extrait COMA2-A, le composé ionisé $[M+H]^+$ à m/z 275,1650 est lui-aussi accompagné d'un ion $[M+H]^+$ de m/z 215,1433 mais a également un fragment MS/MS à m/z 215,1432 bien que faiblement présent (**Tableau 9**). Il semble donc plus probable que ce composé soit du 2-acétoxyfuranodiène **41** que du furanoeudesma-1,3-diène **42**.

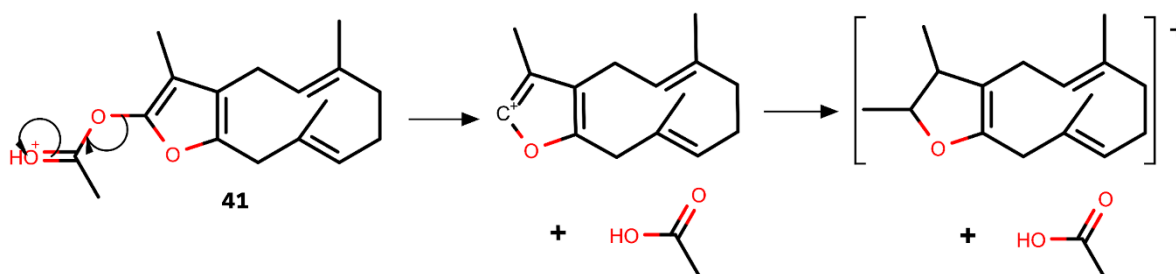


Figure 43 – Proposition de fragmentation du 2-acétoxyfuranodiène **41** en ionisation ESI⁺

Le 2-acétoxyfuranodiène $C_{17}H_{22}O_3$ n'a pas été, à notre connaissance, caractérisé en HPLC-MS/ESI. Cependant, en GC-MS (énergie d'ionisation de 70eV), son ester acétylique se dissocie facilement du furanosesquiterpène en libérant un fragment $[M-AcOH]^+$ de m/z 214 et un fragment $[Me\equiv O]^+$ de m/z 43, ce qui est décrit comme fragmentation typique des esters acétyliques²⁰⁷. La même fragmentation semble avoir lieu en EIMS, où des fragments à m/z 214 et m/z 43 sont également observés²⁰⁶. De plus, la prédiction du spectre de fragmentation de ce composé en ESI⁺ sur le site CFM-ID 4.0²¹² montre comme fragment principal le furanosesquiterpène ayant perdu son acétate, même avec une faible énergie de collision (10V). L'acétate étant le groupement se dissociant le plus facilement du 2-acétoxyfuranodiène **41**, ce dernier a donc pu le perdre durant l'ionisation.

Bien que le 2-acétoxyfuranodiène **41** semble le candidat le plus probable, cela reste une identification putative. Afin de s'assurer de l'identité du composé, une co-injection en HPLC-DAD pourra être effectuée avec les deux standards commercialisés, ou bien le composé pourra être isolé afin d'être analysé en RMN. Néanmoins, l'identification putative du composé majoritaire des extraits

acétate d'éthyle des résines MYRR1 et MYRR2 en HPLC-HRMS/ESI+ vient donc encore appuyer notre hypothèse d'identification.

Les différents contrôles, en particulier la comparaison à un échantillon de myrrhe de référence du droguier de Tours, viennent tous appuyer l'hypothèse que la résine **MYRR1** est bien de la myrrhe sans pouvoir en préciser l'espèce productrice. L'identification du composé principal reste cependant à confirmer, de même que celle du composé visible en UV (**Figure 39** pic **B**) mais ne s'ionisant pas en HPLC-HRMS/ESI. Pour ce dernier, une analyse en GC-MS se révélerait certainement très informative au vue de la richesse de la myrrhe en composés volatils²¹¹. L'identification de plusieurs composés communément trouvés dans différentes myrrhes et leur abondance respective pourraient alors donner des indices sur l'espèce productrice.

4.4. Contrôle de l'identité et caractérisation chimique de la gomme sarcocolle traditionnelle SARC

Aucune monographie de contrôle n'a pu être trouvée pour la gomme sarcocolle, il n'a donc pas été possible de contrôler son identité de cette façon. De plus, la composition chimique de cette drogue est encore mal connue.

4.4.1. Contrôle et caractérisation par HPLC-DAD et HPLC-HRMS

Une caractérisation des trois extraits de gomme sarcocolle SARC a été faite par HPLC-DAD mais seuls de faibles signaux ont été obtenus en injection standard (10 µL à 10 mg/mL) (**Figure 44**).

En HPLC-HRMS, les composés de l'extrait hydroalcoolique de gomme sarcocolle SARC-EH ont été plus facilement ionisés que ceux de l'extrait acétate d'éthyle SARC-A (**Figure 45**) : par rapport à l'UV, quelques signaux supplémentaires ont été détectés pour l'extrait SARC-EH tandis que certains ont été perdus pour l'extrait SARC-A. Cependant, aucun composé n'a été considéré comme assez majoritaire pour servir de composé marqueur pour l'identification de la drogue.

Cette pauvreté en composés visibles peut être dû à une faible absorbance et ionisation de ces derniers ou, plus simplement, à une faible concentration en composés dans l'extrait due une méthode extractive peu adaptée. En effet, les saponines de la gomme sarcocolle sont décrites comme extractibles dans l'eau mais absentes d'un extrait EtOH80%¹⁶⁴ et les polysaccharides, très présents dans le genre *Astragalus*¹⁶⁵, précipitent plus ou moins dans l'éthanol (extraction) mais aussi dans le méthanol (échantillonnage pour l'HPLC-DAD et l'HPLC-HRMS)²¹³. Il est donc probable qu'une part importante des composés constituant cette gomme-résine n'aient pas été extraits, ou que certains aient été éliminés au moment de l'échantillonnage en solubilisant dans le MeOH puis en

filtrant sur 0,45 μm . Afin de vérifier cette hypothèse, un échantillon de la même gomme sera extrait dans l'eau et analysé en HPLC-DAD et HPLC-HRMS, ainsi que testé sur les mêmes cibles biologiques que les autres extraits.

Les contrôles réalisés ne permettent pas actuellement de confirmer ou d'infirmer que cette gomme sarcocolle SARC est bien issue d'*A. sarcocolla*. Afin de résoudre l'origine de cette gomme-résine, une étude des différentes molécules la composant devra être réalisée, après optimisation de la séparation pour les différents extraits. La composition chimique n'étant pas connue dans le détail, la recherche de correspondance sera étendue au genre *Astragalus*. Par ailleurs, les jardins botaniques royaux de Kew, Angleterre, ont accepté de nous envoyer un échantillon de gomme sarcocolle (résine de *Astragalus sarcocolla*, récoltée en Iran) : dès réception, un extrait aqueux ou EtOH70% (en fonction des tests effectués sur notre gomme-résine) sera réalisé et analysé en HPLC-HRMS/ESI afin d'être comparé à la gomme-résine SARC.

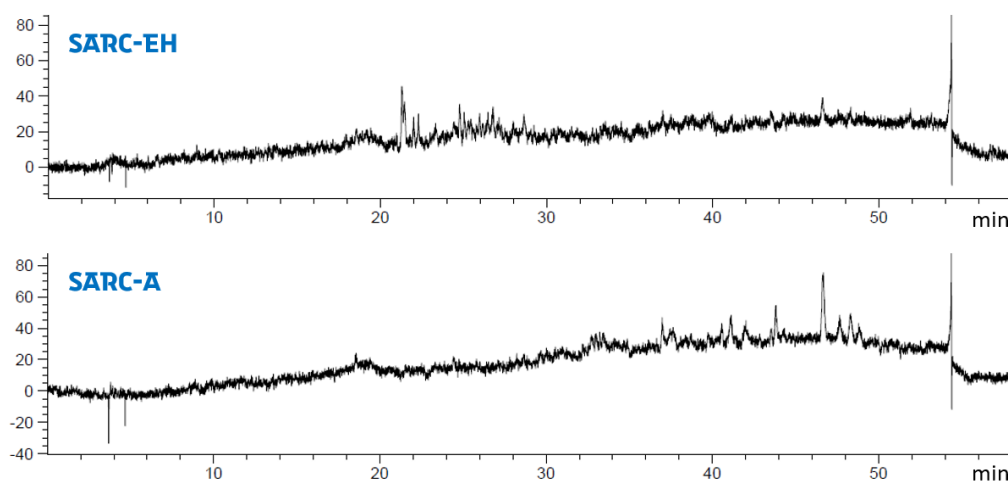


Figure 44 – Chromatogrammes HPLC-DAD à 254 nm des extraits hydroalcooliques (**EH**) et à l'acétate d'éthyle (**A**) (chromatogramme de l'extrait dichlorométhane similaire) de la gomme sarcocolle **SARC** (méthode **REFERENCE**)

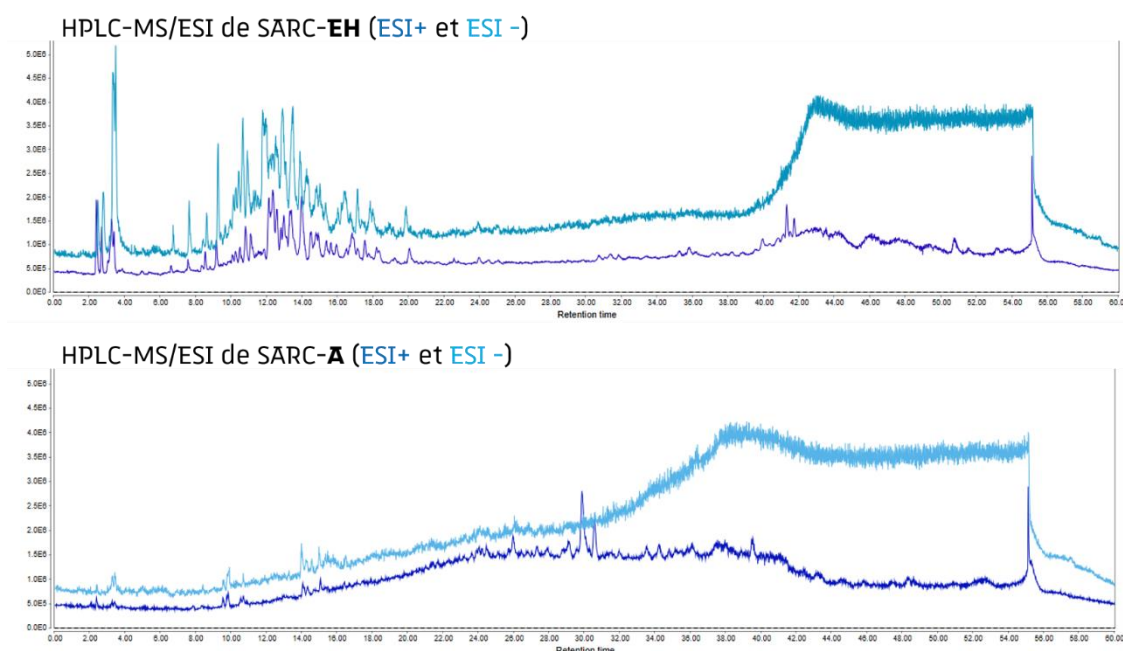


Figure 45 – Chromatogrammes HPLC-HRMS/ESI+ et ESI- (base peak) des extraits hydroalcooliques (**EH**, méthode **SARCOCOLLE-HYDRO**) et acétate d'éthyle (**A**, méthode **SARCOCOLLE-LIPO**) de la gomme sarcocolle **SARC**

4.5. Contrôle de l'identité et caractérisation chimique de la gomme ammoniacque traditionnelle AMM01

Tout comme la gomme sarcocolle, aucune monographie de contrôle n'a été trouvée pour la gomme ammoniacque. Néanmoins, un contrôle par comparaison à une référence a été possible en HPLC-DAD et HPLC-HRMS, grâce au don d'un échantillon de gomme ammoniacque par le droguier de Tours. De plus, la composition chimique du genre *Ferula* mais également celle de la drogue en elle-même ont été étudiée, facilitant l'identification putative des composés majoritaires de l'extrait retenus lors de la caractérisation par HPLC-DAD et HPLC-HRMS.

La gomme ammoniacque prenant une place centrale dans la suite de cette thèse, une extraction d'ADN a été menée dans le but d'identifier des espèces potentielles, en collaboration avec le doctorant Armando Espinosa Prieto avec l'aide du docteur Laurent Hardion, tous deux travaillant au Laboratoire Image Ville Environnement (UMR7362).

4.5.1. Caractérisation par HPLC-DAD et comparaison à un échantillon de référence

Les chromatogrammes HPLC-DAD des 3 extraits de gomme ammoniacque AMM01 ont montré des profils similaires avec plusieurs pics majoritaires bien distincts (**Figure 46**). Néanmoins, lors de la comparaison des profils de l'extrait à l'acétate d'éthyle AMM01- $\bar{A}$ avec celui de la gomme ammoniacque du droguier de Tours AMM03- $\bar{A}$, aucun pic en commun n'a pu être trouvé (**Figure 46**).

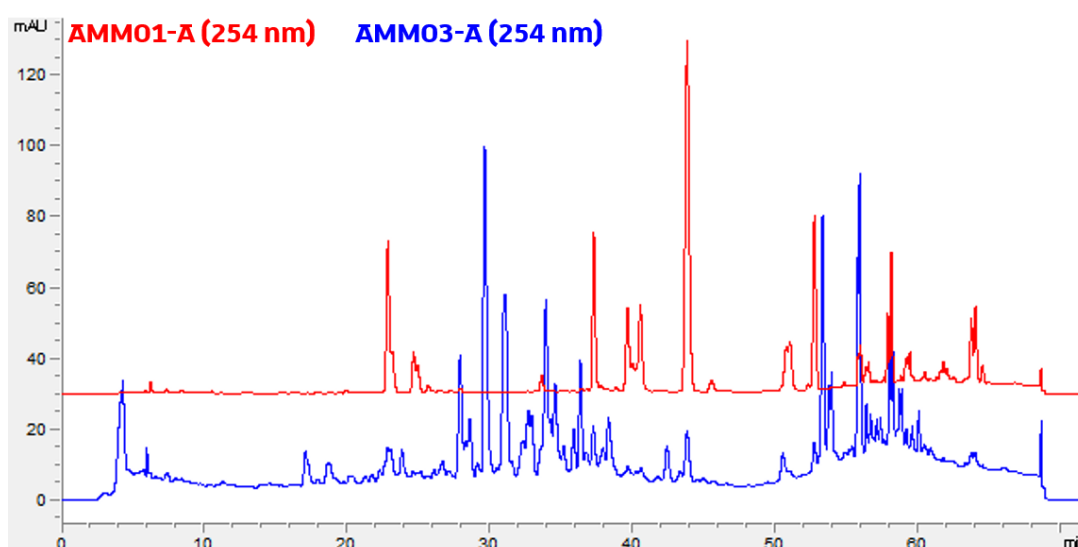


Figure 46 – Chromatogrammes HPLC-DAD à 254 nm des extraits acétate d'éthyle de la gomme ammoniacque traditionnelle (Maroc) **AMM01- $\bar{A}$** (représentatif des 3 extraits) et de la gomme ammoniacque de référence (droguier Tours) **AMM03- $\bar{A}$** (méthode **DOREMA**)

Sur la base de leurs composés visibles sous UV 254 nm, il semblerait donc que la « gomme ammoniacque » AMMO1 soit différente de celle du droguier de Tours. Toutefois, l'espèce n'étant pas mentionnée pour cette dernière, il pourrait s'agir d'une différence entre une gomme ammoniacque « africaine » (AMMO1) et une « perse » (AMMO3). La comparaison avec l'échantillon de référence demandé aux jardins botaniques de Kew, identifié comme « perse » car provenant de *Dorema ammoniacum* (syn. *F. ammoniacum*), pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

4.5.2. Caractérisation par HPLC-HRMS et comparaison à un échantillon de référence

Plusieurs composés ont été détectés en HPLC-HRMS/ESI dans les 3 extraits de la résine AMMO1, que ce soit en ESI+ ou ESI- et là aussi sans différence notable entre les 3 extraits (**Figure 47** et **Tableau 12**). Comme en HPLC-UV, aucun composé commun ne semble ressortir entre l'extrait à l'acétate d'éthyle de la résine AMMO1 et celui de la gomme ammoniacque de référence AMMO3 (**Figure 48**).

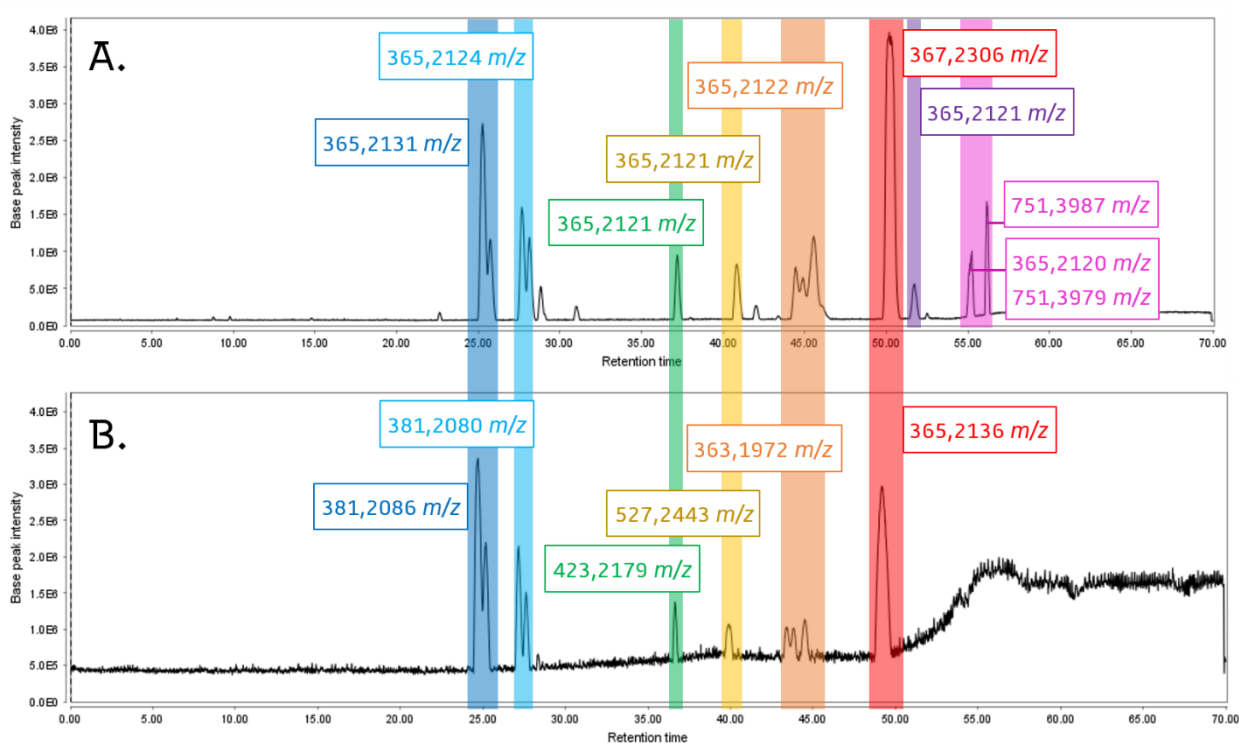


Figure 47 – Chromatogrammes HPLC-HRMS/ESI (base peak) de l'extrait acétate d'éthyle de « gomme ammoniacque » AMMO1-A (méthode DOREMA) : **A.** HPLC-HRMS/ESI+ ; **B.** HPLC-HRMS/ESI-

Tableau 12 – Ions protonés et déprotonés des pics majoritaires en HPLC-HRMS/**ESI+** et HPLC-HRMS/**ESI-** de l'extrait acétate d'éthyle de la gomme ammoniacque **AMM01** (méthode **DOREMA**)

ID	ESI	RT (min)	m/z	Ions majoritaires	Formule brute	Δ ppm mDa	4 fragments les plus intenses en MS/MS (majoritaire en gras)	Identification
1	+	25,57	365,2131	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₀ O ₄	3,92 1,43	107,0748 ; 121,1004 ; 135,1167 ; 175,0393	Isomères Z/E d'ω- hydroxyférul énol 43 ^{214,215}
			383,2228	[M+H] ⁺		1,48 0,57	X	
	-	24,70	381,2086	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₀ O ₄	5,29 2,02	187,0381 ; 213,0550 ; 228,0782 ; 381,2070	
2	+	27,66	365,2124	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₀ O ₄	2,00 0,73	107,0595 ; 121,0998 ; 135,1162 ; 175,0388	Isomères Z/E d'ω- acétoxyférul énol 44 ²¹⁵
	-	27,17	381,2080	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₀ O ₄	3,71 1,42	381,2065 ; (228,0786) ; 214,0627 ; 174,0316	
3	+	37,17	365,2121	[M-AcOH+H] ⁺	C ₂₆ H ₃₂ O ₅	1,18 0,43	175,0393 ; 135,1167 ; 121,1009 ; 107,0705 ;	Isomères Z/E d'ω- acétoxyférul énol 44 ²¹⁵
			425,2333	[M+H] ⁺		1,18 0,5	X	
	-	36,64	423,2179	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₂ O ₅	1,77 0,75	423,2161 ; 363,1950 ; 228,0775 ; 213,0543 ;	
4	+	40,82	365,2121	[M-C ₉ H ₈ O ₃ +H] ⁺	C ₃₃ H ₃₆ O ₆	1,18 0,43	175,0384 ; 135,1178 ; 121,0991 ; 109,1010 ;	/
			529,2594	[M+H] ⁺		0,73 0,39	X	
	-	39,89	527,2443	[M-H] ⁻	C ₃₃ H ₃₆ O ₆	1,78 0,94	527,2435 ; 381,2073 ; 363,1961 ; 228,0770 ;	
5	+	45,55	365,2122	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₂₈ O ₃	1,45 0,53	175,0388 ; 189,527 ; 135,1157 ; 121,1029 ;	Ferprénine 45 ²¹⁶
			387,1941	[M+Na] ⁺		1,26 0,49	X	
			751,3968	[2M+Na] ⁺		- 0,88 -0,66	X	
	-	44,50	363,1972	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₂₈ O ₃	3,25 1,18	363,1954 ; 295,1353 ; 228,0777 ; 213,0549 ;	
6	+	50,18	367,2306	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₃₀ O ₃	8,93 3,28	175,0396 ; 107,0496 ; 95,0855 ; 81,0703 ;	Férulénol 36 ²¹⁴
			389,2101	[M+Na] ⁺		2,15 0,84	X	
	-	49,15	365,2136	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₀ O ₃	5,29 1,93	365,2122 ; 228,0785 ; 213,0551 ; 187,0390 ;	
7	+	51,71	365,2121	?	n.d		175,0387 ; 135,1163 ; 121,1011 ; 107,0722 ;	/
			995,4704	?	n.d		X	
8	+	55,24	365,2120	?	n.d		175,0383 ; 135,1167 ; 121,0302 ; 107,0599 ;	/
			387,1938	?	n.d		X	
			751,3979	?	n.d		(751,4899) ; 387,1936 ; 213,1607 ; 197,0207	
9	+	56,15	751,3987	?	n.d		(751,4866) ; 387,1936 ; 213,1607 ; 197,0207	/

Une absence de fragmentation est notée X et une absence d'identification est notée /

La comparaison des profils HPLC-HRMS des deux gommes ammoniacque vient confirmer l'absence de composé en commun entre la résine utilisée dans notre étude, AMM01, et l'échantillon de référence du droguier de tours, AMM03. Comme mentionné dans la caractérisation par HPLC-UV, il pourrait s'agir d'une différence due à l'existence de deux types de gomme ammoniacque. La comparaison avec un autre échantillon de référence, où l'espèce botanique est connue, permettra de confirmer ou infirmer cette hypothèse, mais l'identification des composés majoritaires présents dans notre résine apporte déjà des éléments de réponse.

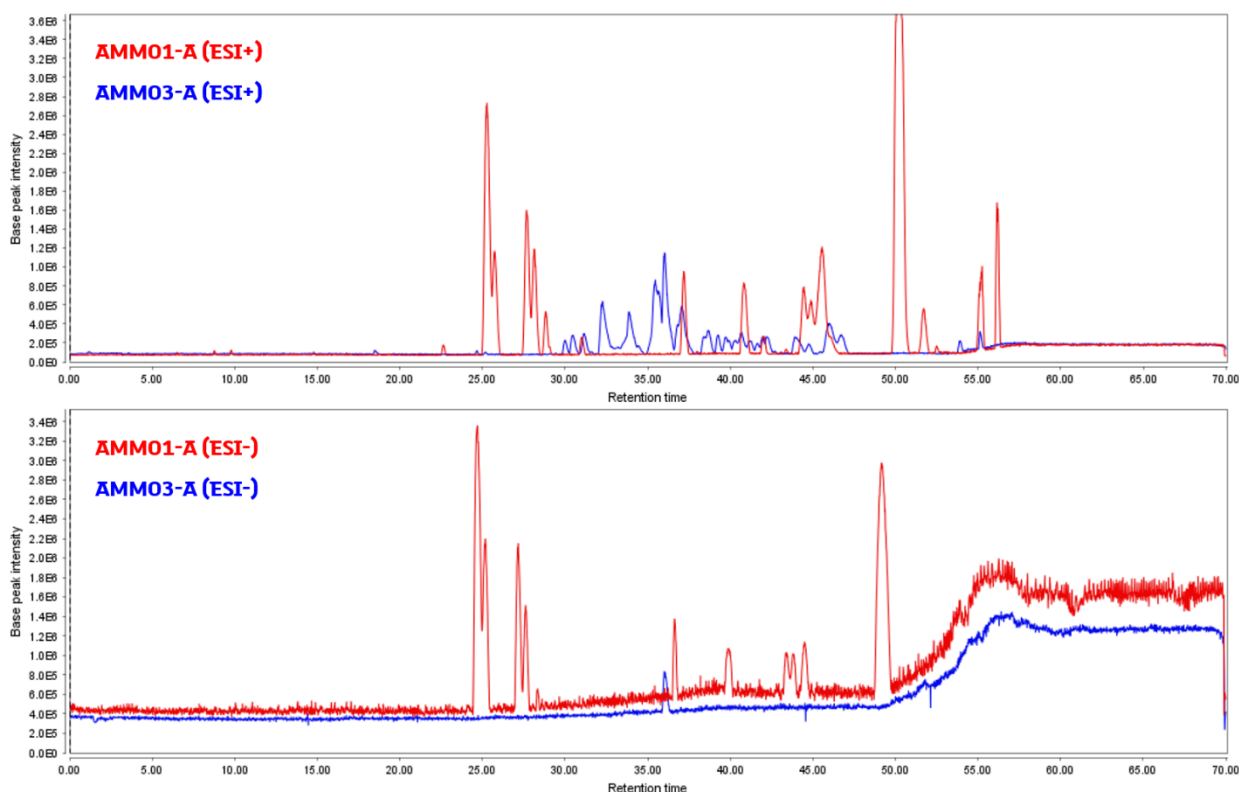


Figure 48 – Chromatogrammes HPLC-HRMS/ESI (base peak) des extraits acétate d'éthyle de la gomme ammoniacque traditionnelle **AMM01-A** et de la gomme ammoniacque de référence (droguier Tours) **AMM03-A** (méthode **DOREMA**)

4.5.3. Identification putative des composés majoritaires de la résine AMM01

Sur la base des formules prédites et des fragments obtenus, une hypothèse a été faite sur l'identité des 2 composés majoritaires de la résine AMM01 (**ID 1** et **ID 6** dans le **Tableau 12**). Pour le pic 1, les ions majoritaires sont à m/z 365,2131 en ESI+ et à m/z 381,2086 en ESI-. Ces deux ions pourraient correspondre au $[M-H_2O+H]^+$ et au $[M-H]^-$ d'un composé de formule brute $C_{24}H_{30}O_4$ ($[M+H]^+$ calculé à m/z 383,2217 et $[M-H]^-$ calculé à m/z 381,2071). Cela semble d'autant plus probable que l'ion majoritaire en ESI+ est accompagné d'un ion intense à m/z 383,2228, qui serait alors l'ion $[M+H]^+$. Pour le pic 6, les ions majoritaires sont à m/z 367,2306 en ESI+ et à m/z 365,2136 en ESI-. Ils

pourraient quant à eux correspondre aux $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ d'un composé de formule brute $C_{24}H_{30}O_3$ ($[M+H]^+$ calculé à m/z 367,2268 et $[M-H]^-$ calculé à m/z 365,2122). On remarque que l'ion $[M-H_2O+H]^+$ du pic 1 a une masse très proche de l'ion $[M-H]^-$ du pic 6, le composé du pic 1 pourrait donc être un dérivé de celui du pic 6. Comme l'ion majoritaire du pic 1 correspond à la perte d'une molécule d'eau, il pourrait s'agir de la déshydratation d'un alcool et le composé du pic 1 serait alors un dérivé hydroxylé du composé du pic 6.

Dans la littérature scientifique du genre *Ferula*, on retrouve deux composés avec ces formules brutes : le féruléol **36** $C_{24}H_{30}O_3$ et du ω -hydroxyféruléol **43** $C_{24}H_{30}O_4$ (Figure 49), le second étant bien un dérivé hydroxylé du premier. Ces deux coumarines sesquiterpéniques sont principalement rapportées dans l'espèce *F. communis*, dans les chémotypes dit « toxiques » responsables de la férulose^{191,214}.

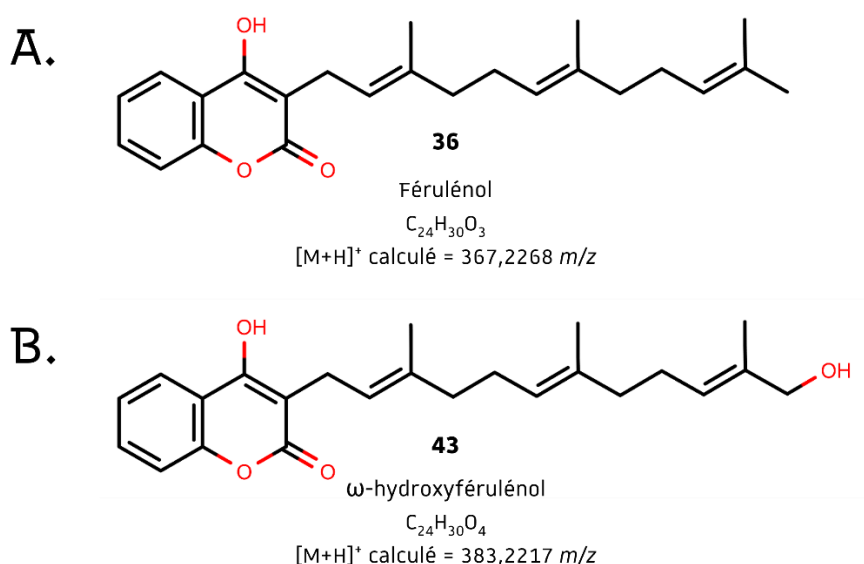


Figure 49 – Structures chimiques de deux 4-hydroxycoumarines sesquiterpéniques du chémotype toxique de *Ferula communis* : **A.** Féruléol **36** ; **B.** ω -hydroxyféruléol **43**

L'identification putative de ces 2 composés a été confirmée en résolvant leur structure chimique par RMN 1D et 2D (Chap.4-2.). Dans la littérature scientifique, la synthèse des 4-hydroxycoumarines est surtout décrite pour des champignons ascomycètes comme *Penicillium* ou *Aspergillus* [notamment par fermentation de plantes contenant du mélilotoside, comme *Melilotus albus* Medik (1787, *Fabaceae*)]²¹⁷. Chez les plantes, si une synthèse a été rapportée chez des cellules élicitées de *Sorbus aucuparia* L. (1753, *Rosaceae*), les 4-hydroxycoumarines sont principalement rapportées dans la famille des *Asteraceae* et des *Apiaceae*, de même que les coumarines prénylées^{217,218}. Les deux 4-hydroxycoumarines prénylées identifiés sont majoritairement décrites dans le genre *Ferula*, plus précisément chez *F. communis* une férule

particulièrement étudiée^{191,219}. Il est cependant à noter que le férulénol a également été rapporté dans d'autres espèces de fêrues, comme *F. vesceritensis* Coss. & Durieu ex Trab. (1905, *Apiaceae*)²²⁰ mais aussi chez la carotte sauvage *Daucus carota* L. ssp. *carota* (1753, *Apiaceae*)²²¹.

Si ces deux composés ne permettent pas d'affirmer qu'il s'agisse bien de gomme-résine de *F. communis*, ils nous confortent fortement dans l'idée qu'il s'agit bien de la gomme-résine d'une *Ferula*, nous permettant de la considérer comme de la gomme ammoniacque¹⁷⁴. Par ailleurs, *Ferula communis* reste notre meilleur candidat pour l'espèce productrice en prenant en compte ces composés mais aussi le lieu d'achat (Maroc).

4.5.4. Extraction d'ADN résiduel de la gomme ammoniacque AMMO1 pour identification

L'extraction de l'ADN et son amplification par PCR ont été réalisés au sein de l'UMR 7362 – Equipe *Hydrosystèmes* par le doctorant Armando Espinosa Prieto, actuellement en thèse sur le sujet « L'ADN environnemental comme descripteur des plantes aquatiques et indicateur environnemental », sous la direction du Pr. Jean-Nicolas Beisel et avec l'encadrement du Dr. Laurent Hardion.

La difficulté à identifier l'espèce productrice de notre gomme-résine nous a amené à considérer l'identification par séquençage de l'ADN²²². En effet, s'il s'agit d'un exsudat et non d'une partie de la plante avec des cellules et donc de l'ADN, il peut rester une trace de cette information génétique. Une étude a montré que l'ADN pouvait être retrouvé dans du *hashish*, la résine de *Cannabis sativa* L. (*Cannabaceae*, 1753), en quantité et qualité suffisante pour être séquencé et permettre l'identification de l'espèce *C. sativa*²²³. Nous avons donc voulu vérifier s'il pouvait en être de même pour notre gomme-résine.

Le souci principal avec l'identification par ADN des plantes médicinales est la présence de polyphénols et de polysaccharides, ces composés rendant les échantillons visqueux²²³ et inhibant un grand nombre de réactions enzymatiques²²⁴ dont celles impliquées de l'extraction et l'amplification du matériel génétique. Afin de se débarrasser des composés pouvant interférer avec ces différentes étapes, un protocole adapté a été utilisé (**Part.Exp-2.3.3.1**).

L'extraction de l'ADN s'est faite selon le protocole d'extraction d'ADN au CTAB habituellement utilisé au sein de l'UMR 7362, en adaptant l'extraction selon l'étude Alaoui *et al*, 2013²²³ où une extraction d'ADN a été réalisée sur du *hashish*. Cette extraction consiste à extraire le matériel génétique de la gomme ammoniacque, à le séparer des autres métabolites à l'aide de plusieurs lavages puis à éliminer l'ARN afin de ne garder que l'ADN. Cet ADN a ensuite été quantifié par fluorimétrie, avant d'amplifier les régions *Internal Transcribed Spacer* ITS (ou Espaceur Interne Transcrit en français) par *Polymerase Chain Reaction* PCR (ou Amplification en Chaîne par Polymérase ACP en français) à l'aide de différentes amorces (**Part.Exp-2.3.3.2**).

Malheureusement, à peine 1 ng/μL d'ADN ont été obtenus à partir de 500 mg de gomme ammoniacale et après PCR avec les amorces ITS de White *et al*, 1990²²⁵, aucune amplification significative n'a été observée. Il semblerait donc que l'ADN extrait soit en trop petite quantité et de trop mauvaise qualité pour permettre une amplification correcte de cette région. Des essais ont alors été réalisés afin de concentrer mais également mieux nettoyer l'ADN afin d'éviter une dégradation lors de cette étape d'extraction. Tout d'abord plusieurs échantillons d'ADN déjà extraits ont été mélangés entre eux puis reprécipités afin de concentrer le matériel génétique mais cet essai a abouti à une perte d'ADN, certainement pendant l'étape de nettoyage. Ensuite, un essai a été réalisé sur un nouvel échantillon de gomme ammoniacale avec un kit d'extraction d'ADN de plante (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Venlo, Pays-Bas) et a permis d'obtenir une concentration en ADN satisfaisante. Dans le cas où l'ADN serait particulièrement dégradé, une amplification uniquement de la région ITS2 (environ 250 paires de bases) a alors été réalisée à l'aide des amorces de Chen *et al*, 2010²²⁶. Néanmoins, là aussi aucune amplification significative n'a été observée, laissant penser que soit l'ADN était trop dégradé pour pouvoir amplifier par PCR même un segment aussi petit que l'ITS2, soit qu'il y avait tout simplement trop peu d'ADN de plante.

Il semblerait donc que notre gomme-résine ne contienne que peu d'ADN de plante ou bien un ADN trop dégradé, dans nos conditions expérimentales. Cela pourrait notamment s'expliquer par la méthode de récolte : là où pour le *hashish* l'inflorescence est broyée pour faire sortir la résine des trichomes, la gomme ammoniacale serait *a priori* obtenue par incision de la racine ou des tiges, causant ainsi moins de dégâts dans les tissus et donc moins de débris cellulaires susceptibles de contenir de l'ADN.

L'identification par ADN n'a donc pas pu être possible dans le cas de notre gomme-résine. Néanmoins, dans le cas de drogues végétales autres que des exsudats, contenant des tissus, cette méthode pourrait se révéler pertinente si le laboratoire est de nouveau amené à travailler sur des drogues d'origine botanique incertaine.

5. Conclusion sur l'identification des ingrédients des remèdes et l'étude phytochimique des drogues végétales

Les recherches bibliographiques nous ont amené à constater que la définition des différentes drogues végétales des remèdes étudiés n'était pas toujours précise et fixe, parfois englobant tout un genre ou ayant fait l'objet de confusion et de substitution au cours du temps. Nous avons néanmoins pu arrêter certaines hypothèses sur les espèces qui auraient pu être utilisées par Al-Kindi (**Tableau 13**). La drogue minérale, quant à elle, s'est révélée être un mélange complexe et variable de sels de cuivre, que nous avons dû réduire à l'acétate de cuivre pour cette étude.

Les espèces identifiées pour chacune des drogues végétales n'ont pas toutes été accessibles lors de l'approvisionnement, nous amenant soit à utiliser une espèce proche de substitution, soit à nous approvisionner auprès de tradithérapeutes exerçant dans des pays où ces drogues sont encore utilisées (**Tableau 13**). L'espèce productrice n'étant alors pas précisée, l'étape de contrôle de l'identité s'est révélée cruciale.

Tableau 13 – Résumé de l'identification, l'approvisionnement et les contrôles d'identité des drogues utilisées dans les deux remèdes d'Al-Kindi étudiés

Ingrédients	Espèce/Composé identifié	Espèce/Composé utilisé	Contrôle(s) de l'identité : conclusion
Aloès	Suc d' <i>A. vera</i>	Suc commercial d' <i>A. ferox</i> (Cailleau Herboristerie)	Identification putative de composés majoritaires : <i>A. ferox</i>
Myrrhe	Oléorésine de <i>Commiphora</i> sp.	Myrrhe traditionnelle (tradithérapeute, Maroc)	Comparaison à un échantillon de référence : myrrhe ; identification putative de composés majoritaire : <i>Commiphora</i> sp.
Gomme sarcocolle	Gomme-résine d' <i>A. sarcocolla</i>	Gomme sarcocolle traditionnelle (tradithérapeute, Pakistan)	-
Gomme ammoniacque	Gomme-résine de <i>F. ammoniacum</i>	Gomme ammoniacque traditionnelle (tradithérapeute, Maroc)	Comparaison à un échantillon de référence ; identification putative de composés majoritaire : <i>F. communis</i> ; extraction d'ADN
Vert-de-gris	Différents sels de cuivre dont des acétates de cuivre	Acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (Strem Chemicals Inc.)	- (formulation commerciale)

- : absence de contrôle

Dans la littérature scientifique, chaque drogue était chimiquement caractérisée à différents niveaux de précision, parfois uniquement avec des méthodes d'analyses que nous n'avions pas à

disposition, parfois avec très peu d'informations sur la composition chimique attendue. La comparaison avec des échantillons de référence et l'identification putative de composés majoritaires à l'aide des données HPLC-HRMS/MS nous ont cependant permis d'émettre des hypothèses argumentées sur le genre de l'espèce productrice, parfois l'espèce (**Tableau 13**). Seule la gomme sarcocolle n'a offert que peu d'indices sur son identité, que ce soit dans la littérature ou dans les résultats des analyses réalisées.

La reconstitution de ces remèdes traditionnels revêt donc de nombreuses contraintes. Tout d'abord, ils ont été rédigés dans un contexte socioculturel précis, impliquant l'utilisation de noms vernaculaires compliquant l'identification des espèces mais aussi l'omission de certains détails, par exemple la partie de la plante utilisée, car alors certainement considérés comme évidents par Al-Kindī. Ensuite, les drogues employées ont une longue histoire médicinale ayant donné lieu à des substitutions par d'autres espèces selon les régions du monde, en plus de la possible évolution de ces espèces depuis le 9^{ème} siècle, période de vie d'Al-Kindī. Ces substitutions compliquent à la fois l'identification de l'espèce botanique la plus probable mais aussi l'approvisionnement actuel de la drogue, différentes drogues pouvant être désignées par le même terme vernaculaire. S'ajoute à cela les difficultés inhérentes à toutes études phytochimiques, comme la variabilité chimique au sein d'une même espèce (chémotypes) rendant impossible la généralisation de l'étude d'un seul échantillon à toute une espèce, cette variabilité dépendant notamment de son environnement, de sa récolte et de son mode de conservation.

C'est en connaissance de ces éléments, propres à la pharmacognosie et la phytochimie en général, que nous avons mené notre étude sur une des reconstitutions possibles de ces remèdes traditionnels.

1. Cytotoxicité

2. Activité antibactérienne

3. Réponse inflammatoire

4. Activité cicatrisante

Chapitre 3

Etude des activités
biologiques des différents
ingrédients

p 91 à p 118

Chapitre 3 – Etude des activités biologiques des différents ingrédients

Les remèdes étudiés sont tous les deux prescrits contre des infections cutanées : des « abcès pour lesquels le bistouri n'est pas préconisé » pour le remède R₁ et des « abcès » et des « mauvais furoncles » pour le remède R₂. Dans ces infections, les bactéries arrivent à passer la barrière cutanée et se multiplient, déclenchant une réponse inflammatoire chez l'hôte. La zone infectée va alors chauffer et gonfler, au point que la peau à cet endroit peut facilement se percer, lorsque ce n'est pas fait artificiellement. Un abcès implique donc une infection bactérienne mais également une réponse inflammatoire des cellules hôtes et une cicatrisation de la peau durant la phase de réparation des tissus (**Chap.1-3**). Dans ce chapitre, nous avons mené une étude préliminaire sur ces trois aspects en criblant les différentes drogues sur l'activité antibactérienne, sur les activités pro et anti-inflammatoires ainsi que sur l'activité cicatrisante.

La toxicité des différents ingrédients a été évaluée au travers d'un test de cytotoxicité sur des macrophages murins (extraits végétaux et acétate de cuivre) et des fibroblastes murins (extraits végétaux). Cette première mesure de la cytotoxicité va permettre d'estimer si les substances testées sont plus actives que toxiques à travers le calcul d'un indice de sélectivité IS *in vitro* (*selectivity index* SI en anglais).

Pour l'activité antibactérienne, les différents extraits de chaque drogue végétale ainsi que l'acétate de cuivre ont été criblés contre la bactérie la plus souvent responsable des abcès cutanés, *S. aureus*. D'autres staphylocoques et bactéries de la flore cutanée ont été testés, ces dernières pouvant parfois également provoquer des infections de la peau. Une dernière souche a été ajoutée, *E. coli*, afin d'évaluer l'activité inhibitrice sur les bactéries Gram -.

Pour l'effet sur la réponse inflammatoire, les synthèses de deux médiateurs pro-inflammatoires, le monoxyde d'azote NO et la cytokine pro-inflammatoire TNF- α , ont été évaluées chez des macrophages murins incubés avec les extraits des drogues végétales (l'acétate de cuivre s'est révélé trop toxique sur les macrophages murins). Afin d'évaluer l'effet pro-inflammatoire, les deux médiateurs ont été dosés sur des cellules traitées uniquement avec les extraits afin d'évaluer la promotion de ces synthèses. Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire, les deux médiateurs ont été dosés cette fois-ci sur des cellules dont la réponse inflammatoire avait été préalablement activée avec du LPS puis traitées avec les extraits afin d'évaluer l'inhibition de ces synthèses.

Le criblage de l'effet pro-cicatrisant s'est fait par *scratch test* sur des fibroblastes murins : la migration des cellules a été mesurée au bout de 24h sur des tapis de fibroblastes cultivés avec du surnageant de macrophage murins, ces macrophages ayant été préalablement incubés avec les extraits.

Suite à des contraintes de mise au point et d'adaptation de protocoles, ces criblages ont été réalisés uniquement sur les extraits à l'acétate d'éthyle pour l'étude de la cytotoxicité, des activités pro et anti-inflammatoire ainsi que de l'activité pro-cicatrisante. En revanche, l'activité antibactérienne a pu être évaluée sur l'ensemble des extraits végétaux.

Ce chapitre résume les différents résultats pour chaque activité, dans l'ordre énoncé.

1. Evaluation de la cytotoxicité

Des tests de cytotoxicité ont été réalisés au sein de l'UMR 7199 – Equipe *Biovectorologie* par Geoffrey Bianchi, stagiaire en deuxième année de Master sous la tutelle de la Pr. Sylvie Fournel (UMR 7199) et du Dr. Pierre Fechter (UMR 7242), avec l'encadrement de l'ingénieure Cendrine Seguin (UMR 7199). Ces tests ont été réalisés pour les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues et pour l'acétate de cuivre.

La viabilité cellulaire a été mesurée sur des macrophages murins RAW 264.7 (extraits végétaux et sel de cuivre) et sur des fibroblastes murins 3T3 (extraits végétaux) au travers de leur activité mitochondriale par test MTS (**Part.Exp-3.2**). Elle est exprimée en CI_{50} (Concentration Inhibitrice médiane ou *half maximal Inhibitory Concentration* IC_{50} en anglais), soit la concentration permettant l'inhibition de 50% de l'activité mitochondriale de ces lignées cellulaires.

Les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales montrent des CI_{50} supérieures ou égales à 500 $\mu\text{g/mL}$ sur les macrophages murins. Seul l'extrait AMM01- A est un peu plus toxique, avec une CI_{50} de 125 $\mu\text{g/mL}$ (**Tableau 14** et **Figure 50-A.**). Sur les fibroblastes murins, les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales montrent également des CI_{50} supérieures ou égales à 500 $\mu\text{g/mL}$, sauf pour la gomme ammoniacale où elle est égale à 250 $\mu\text{g/mL}$ (**Tableau 14** et **Figure 50-B.**). Les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales ne sont donc toxiques qu'en fin de gamme de concentration testée, sauf pour la gomme ammoniacale dont l'extrait est toxique à des concentrations un peu plus basses.

L'acétate de cuivre présente quant à lui une CI_{50} de 0,3 mM, soit plutôt en début de gamme de concentration testée (**Tableau 14** et **Figure 51**). Ces tests préliminaires de viabilité cellulaire seront confirmés ultérieurement sur des lignées cellulaires humaines (par exemple endothélium cutané HMEC-1).

Tableau 14 – Cytotoxicité des extraits à l'acétate d'éthyle (**A**) des drogues végétales et de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ sur les macrophages RAW264.7 et les fibroblastes 3T3, exprimée en CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$ et mM)

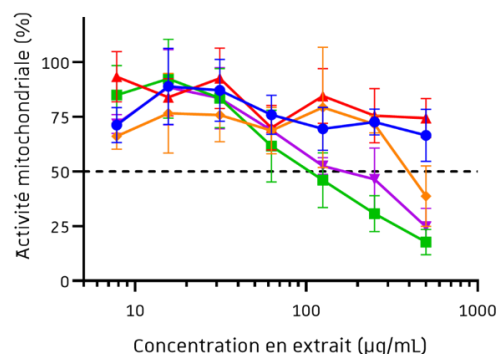
Lignées cellulaires	ALOF-A	COMA1-A	SARC-A	AMM01-A	RDV-A	$\text{Cu}(\text{OAc})_2$
RAW 264.7	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	125 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	0,3 mM
3T3	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	>500 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	-

Extraits à l'acétate d'éthyle de : ALOF-A suc commercial d'*A. ferox*; COMA1-A myrrhe commerciale de *C. abyssinica*; SARC-A gomme sarcocolle traditionnelle; AMM01-A gomme ammoniacale traditionnelle; RDV-A mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m)

Les valeurs de CI_{50} obtenues nous ont néanmoins permis de calculer un premier indice de sélectivité *in vitro* pour les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales et pour l'acétate de cuivre (**Chap.3-2.3**).

A. Viabilité des macrophages RAW 264.7

(Test MTS, n = 3)

**B. Viabilité des fibroblastes 3T3**

(Test MTS, n = 2)

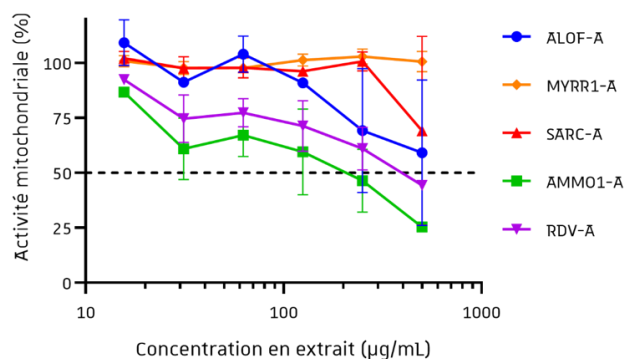


Figure 50 – Cytotoxicité des extraits acétate d'éthyle (**A**) des drogues végétales, exprimée en % d'activité mitochondriale en fonction de la concentration en extrait : **A.** sur des macrophages murins ; **B.** sur des fibroblastes murins

Macrophages ou fibroblastes incubés en présence des extraits à l'acétate d'éthyle de : **ALOF-A** suc commercial d'*A. ferox* ; **COMA1-A** myrrhe commerciale de *C. abyssinica* ; **SARC-A** gomme sarcocolle traditionnelle ; **AMMO1-A** gomme ammoniacale traditionnelle ; **RDV-A** mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 m/m/m/m

Viabilité des macrophages RAW 264.7

(Test MTS, n = 3)

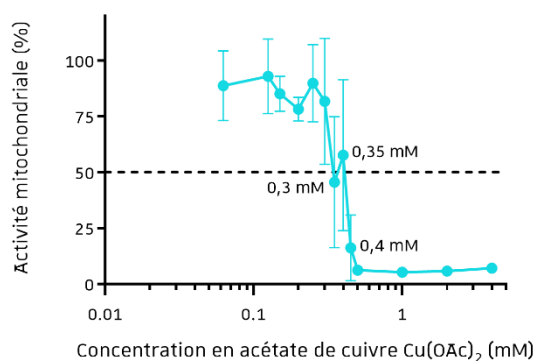


Figure 51 – Cytotoxicité de l'acétate de cuivre **Cu(OAc)₂** sur des macrophages murins, exprimée en % d'activité mitochondriale en fonction de la concentration en extrait

2. Evaluation de l'activité antibactérienne

Les différents tests antibactériens ont été réalisés au sein de l'UMR 7242 – Equipe *Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications*, dont une partie par l'ingénieure Régine Janel.

En accord avec l'usage traditionnel, l'activité antibactérienne des différents ingrédients a été évaluée sur des souches de laboratoire et cliniques Gram + endémiques de la flore cutanée. En effet, ces dernières sont généralement les responsables des infections de la peau, en particulier *Staphylococcus aureus*¹⁷. Leur activité a également été évaluée contre une souche de laboratoire Gram –, *Escherichia coli* (notamment présente dans la flore intestinale), afin de vérifier si les substances testées peuvent atteindre les bactéries de type Gram –, ces dernières étant plus résistantes que les bactéries de type Gram + (**Chap.1-1**). En cas d'activité contre *E. coli*, les extraits végétaux et le sel de cuivre ont ensuite été testés sur une autre souche de laboratoire Gram –, *Pseudomonas aeruginosa*, davantage résistante qu'*E. coli* et pouvant être impliquée dans des infections de la peau²²⁷.

Les extraits obtenus ont d'abord été criblés sur gel d'agar MH-II (n = 1) sur des souches de laboratoire : *S. aureus* HG001, *S. epidermidis* ATCC35983 et *E. coli* MG1655, ainsi que sur des souches issues des collections des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg HUS : *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* et *Corynebacterium striatum* (**Part.Exp-4.1**). Leur activité a ensuite été confirmée sur les mêmes souches (n ≥ 3) en déterminant les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) avec la méthode de microdilution en bouillon MH-II. Pour les extraits réalisés sur la myrrhe traditionnelle MYRR1 (obtenue plus tard dans l'étude) et l'acétate de cuivre (composé pur), les CMI ont été directement mesurées sans faire de criblage sur gélose.

Cette CMI a ensuite été comparée à la cytotoxicité de l'extrait, exprimée en CI_{50} , afin de calculer un indice de sélectivité IS selon la formule suivante : $IS = CI_{50} / CMI$ ²²⁸. Plus cet indice est élevé, plus l'activité de la substance testée est exploitable : certaines études estiment un extrait actif et non toxique à une valeur >1 ou >2 tandis que d'autres préconisent un seuil ≥ 10 pour considérer un échantillon sélectivement bioactif, sur le modèle de ce qui se fait pour l'activité anticancéreuse²²⁸.

2.1. Criblage par diffusion sur gel d'agar

Les extraits obtenus ont fait l'objet d'un premier criblage sur gel d'agar MH-II (n = 1) (**Part.Exp-4.5**). Les extraits secs ont été resolubilisés dans du DMSO et trois dépôts de 500 µg, 250 µg et 100 µg ont été réalisés sur chaque bactérie. L'ensemble des résultats du criblage sur boîte est résumé en **Tableau 15**.

Tableau 15 – Criblage antibactérien des extraits des différentes drogues végétales par diffusion sur gel d'agar (n = 1,) exprimé en dépôts à partir duquel on observe une zone d'inhibition

Souches bactériennes	ALOF		COMA1			SARC			AMM01			RDV		
	EH	A	EH	A	D	EH	A	D	EH	A	D	EH	A	D
<i>S. aureus</i> HG001	1	1	2	2	2	X	X	X	3	3	3	3	3	3
<i>S. epidermidis</i> ATCC35983	3	3	3	3	3	X	X	X	3	3	3	3	3	3
<i>S. epidermidis</i> HUS	3	X	2	2	2	X	X	X	3	3	3	3	3	3
<i>S. hominis</i> HUS	3	3	1	2	2	X	X	X	3	3	3	3	3	3
<i>S. haemolyticus</i> HUS	1	1	X	X	1	X	X	X	3	3	3	3	3	3
<i>C. striatum</i> HUS	X	X	X	X	X	X	X	X	3	3	3	3	3	3
<i>E. coli</i> MG1655	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Dépôts : 1 = 500 µg ; 2 = 250 µg ; 3 = 100 µg ; X = aucune zone d'inhibition observée ou X = zone d'inhibition due au DMSO.

Extraits : à l'éthanol 70% EH ; à l'acétate d'éthyle A ; au dichlorométhane D

Drogues végétales : ALOF suc commercial d'*A. ferox* ; COMA1 myrrhe commerciale de *C. abyssinica* ; SARC gomme sarcocolle traditionnelle ; AMM01 gomme ammoniac traditionnelle ; RDV mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 m/m/m/m

Les extraits du suc d'*A. ferox* (ALOF-EH et ALOF-A) et les extraits de myrrhe commerciale de *C. abyssinica* (COMA1-EH, COMA1-A et COMA1-D) montrent des zones d'inhibition plus ou moins marquées à diverses concentrations sur les Staphylocoques. Des zones d'inhibition plus marquées sont observées sur la souche de laboratoire de *S. epidermidis* ATCC35983, avec néanmoins des zones beaucoup plus discrètes pour les extraits de myrrhe commerciale COMA1 (**Figure 52**). Concernant la dernière souche Gram +, *C. striatum*, des zones d'inhibition sont observées sur les dépôts de DMSO (témoins négatifs), rendant les résultats ininterprétables pour les extraits ALOF et COMA1. **Les extraits ALOF et COMA1 montrent donc une activité antibactérienne sur les souches Gram + testées, plus ou moins marquée selon le type d'extrait et la souche testée.**

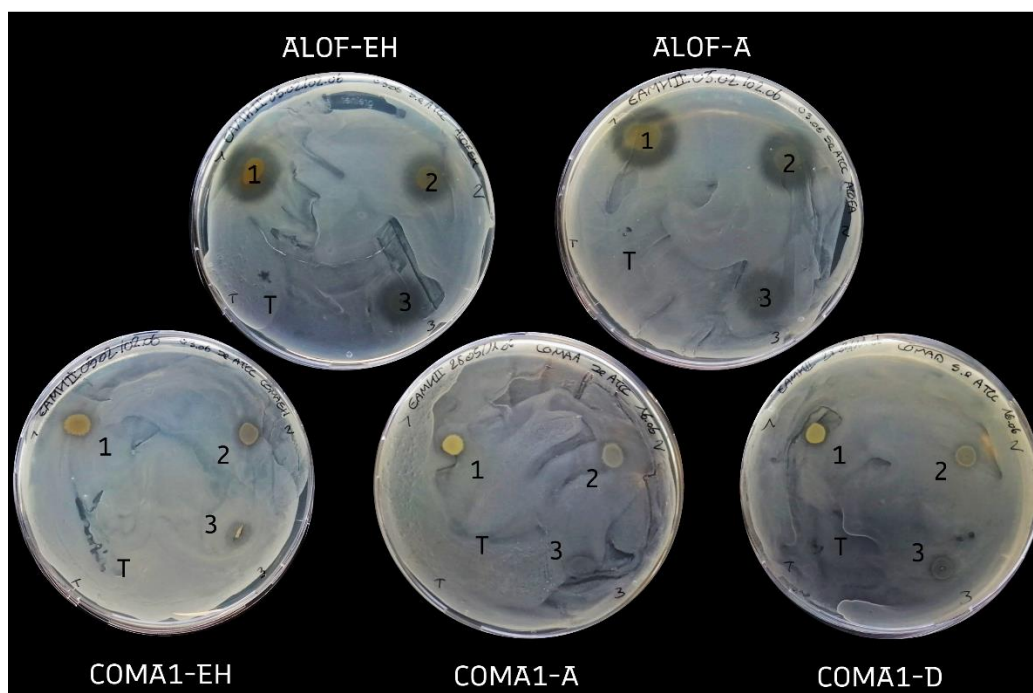


Figure 52 – Zones d’inhibitions obtenues pour les dépôts d’extraits de suc d’*A. ferox* (**ALOF**) et de myrrhe commerciale de *C. abyssinica* (**COMA1**) sur la souche *S. epidermidis* ATCC35983

Dépôts (5 μ L) des extraits secs resubstitués dans du DMSO : 1 = 500 μ g ; 2 = 250 μ g ; 3 = 100 μ g ; T = DMSO.

Extraits : EH à l’éthanol 70% ; A à l’acétate d’éthyle ; D au dichlorométhane

Les extraits de la gomme ammoniac traditionnelle AMMO1 montrent quant à eux une activité antibactérienne très marquée dans ces conditions de test, avec des zones d’inhibition bien lisibles pour les 3 doses sur toutes les souches Gram +, y compris sur *C. striatum* où les zones d’inhibition sont significativement différentes de celles induites par le DMSO seul (**Figure 53**). Des résultats similaires sont obtenus pour les extraits du mélange de 4 drogues végétales (RDV-EH, RDV-A, RDV-D). **Les extraits AMMO1 et RDV montrent donc une forte activité antibactérienne, pour les 3 types d’extraits et sur toutes les souches Gram + testées.**

Les extraits de la gomme sarcocolle traditionnelle (SARC-EH, SARC-A et SARC-D) ne présentent quant à eux aucune activité antibactérienne quel que soit la souche testée. De la même manière, aucun extrait n’a induit de zones d’inhibition sur la souche Gram – *E. coli*, leur activité sur *P. aeruginosa* n’a de fait pas été évaluée.

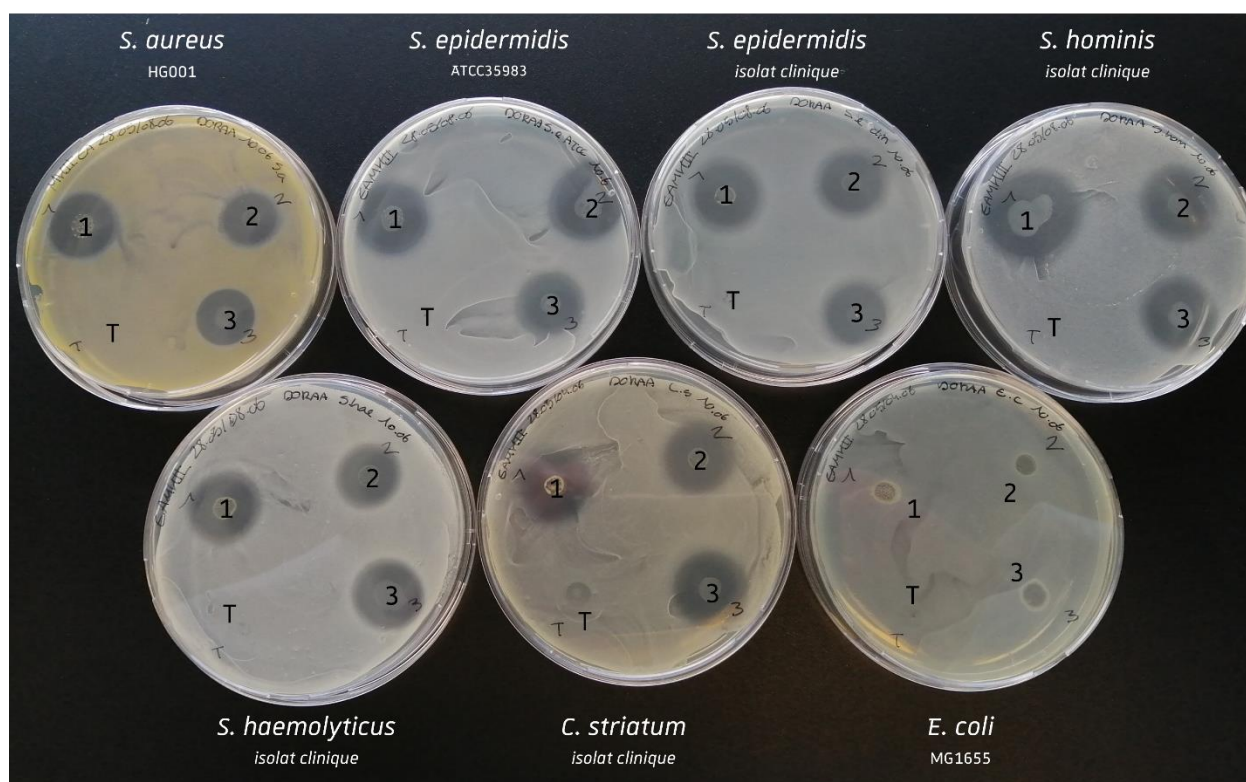


Figure 53 – Zones d’inhibitions obtenues pour les différents dépôts d’extrait à l’acétate d’éthyle de gomme ammoniacale traditionnelle AMM01-A (représentatif de l’activité des autres extraits d’AMM01) sur les 7 souches bactériennes testées

Dépôts (5 µL) des extraits secs résolubilisés dans du DMSO : 1 = 500 µg ; 2 = 250 µg ; 3 = 100 µg ; T = DMSO.

Ce premier criblage par diffusion sur gel d’agar a permis de mettre en évidence une activité antibactérienne pour les différents extraits de suc d’A. ferox (ALOF), de myrrhe commerciale de C. abyssinica (COMA1), de gomme ammoniacale traditionnelle (AMM01) et du mélange des 4 drogues végétales (RDV) sur les différentes souches Gram +, avec des zones d’inhibition particulièrement marquées AMM01 et RDV. Seule la gomme sarcocolle SARC ne présente aucune activité dans les conditions testées.

Il semblerait donc que les différentes drogues végétales composant les remèdes étudiés puissent toutes contribuer, à part la gomme sarcocolle SARC, à un effet inhibiteur sur les bactéries Gram + testées, dont S. aureus. Cependant aucune d’entre elles ne permettent d’inhiber la croissance de la souche Gram –, E. coli, dans les conditions testées.

2.2. Mesure des Concentrations Minimales Inhibitrices CMI par microdilution en bouillon

L'activité antibactérienne a été confirmée et quantifiée en déterminant les CMI par microdilution en bouillon ((**Part.Exp-4.6**) pour les extraits végétaux et l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$. Une gamme de concentration allant de 0,98 µg/mL à 500 µg/mL a été utilisée pour les extraits, tandis qu'une gamme de concentration de 0,0195 mM à 5 mM a été utilisée pour l'acétate de cuivre.

2.2.1. Témoins positifs

Au-delà de la détermination de leur CMI, il est nécessaire d'évaluer si l'activité antibactérienne des extraits et composés testés est significative. Pour cela, on peut comparer ces CMI à une référence, généralement un antibiotique commercial. Dans cette étude nous avons utilisé l'érythromycine **3**, un antibiotique macrolide efficace contre les souches Gram +, notamment *S. aureus*.

Cependant, l'activité antibactérienne d'un composé pur n'est pas comparable à celle de mélanges moléculaires complexes comme des extraits végétaux. En effet, les extraits végétaux sont considérés comme significativement actifs à partir de valeurs CMI inférieures ou égales à 100 µg/mL, contre des valeurs de CMI inférieures ou égales à 25 µM pour des composés purs^{16,63}. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser un extrait végétal connu pour son activité antibactérienne comme extrait de référence : l'extrait méthanolique de cônes femelles de *H. lupulus* L. HUML-MeOH (**Chap.1-4.2**).

Les CMI des deux références utilisées, l'érythromycine et l'extrait HUML-MeOH, ont été déterminées dans nos conditions de test et sont résumées dans le **Tableau 16**. On remarque que l'activité de HUML-MeOH est modérée, avec des CMI généralement > 100 µg/mL. Cette faible activité peut s'expliquer par la variabilité chémotypique du houblon : les cônes récoltés ne contiendraient que peu de composés actifs. L'utilisation d'extrait commerciaux titrés pourrait alors être une référence plus fiable et plus reproductible.

Tableau 16 – Activité antibactérienne des témoins positifs : l'érythromycine ($n = 3$) et l'extrait méthanolique de cônes de houblon *H. lupulus* HUML-MeOH ($n = 2$), exprimée en moyenne des CMI $\pm$ l'écart-type ($\mu\text{g/mL}$)

Souches bactériennes	Erythromycine		HUML-MeOH
	$\mu\text{g/mL}$	mM	$\mu\text{g/mL}$
<i>S. aureus</i> HG001	0,98 $\pm$ 0,0	$1,33 \cdot 10^{-3} \pm 0,0$	78,1 $\pm$ 66,3
<i>S. epidermidis</i> ATCC35983	0,98 $\pm$ 0,0	$1,33 \cdot 10^{-3} \pm 0,0$	187,5 $\pm$ 88,4
<i>S. epidermidis</i> HUS	> 500	$> 681 \cdot 10^{-3}$	93,8 $\pm$ 44,2
<i>S. hominis</i> HUS	0,98 $\pm$ 0,0	$1,33 \cdot 10^{-3} \pm 0,0$	187,5 $\pm$ 88,4
<i>S. haemolyticus</i> HUS	15,62 $\pm$ 13,53	$21,29 \cdot 10^{-3} \pm 18,44 \cdot 10^{-3}$	312,5 $\pm$ 265,2
<i>C. striatum</i> HUS	> 500	$> 681 \cdot 10^{-3}$	187,5 $\pm$ 88,4
<i>E. coli</i> MG1655	62,5 $\pm$ 0,0	$85,16 \cdot 10^{-3} \pm 0,0$	> 250
<i>P. aeruginosa</i> ATCC15692	666,6 $\pm$ 258,2	$908,26 \cdot 10^{-3} \pm 351,80 \cdot 10^{-3}$	-

- : activité non évaluée

2.2.2. Détermination des CMI

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ par microdilution en bouillon a permis de déterminer que le sel de cuivre était actif sur toutes les souches mais de manière peu marquée, avec des CMI bien supérieures au seuil de $25 \mu\text{M}^{16}$ et presque mille fois supérieures à l'érythromycine (**Tableau 16** et **Tableau 17**). Cependant, de tous les ingrédients des remèdes testés, il est le seul à montrer une activité sur la souche Gram -, *E. coli*. Son activité a donc été testée sur la souche Gram - *P. aeruginosa*, pour laquelle il présente une CMI de 10 mM. Les valeurs de CMI de l'acétate de cuivre indiquent une activité antibactérienne modérée sur les souches testées, dans ces conditions de test. Il s'agit cependant de la seule drogue composant les remèdes présentant une activité sur deux bactérie Gram -, *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Concernant les extraits végétaux, les tests par microdilution en bouillon ont confirmé les activités observées sur gélose. Les extraits les plus actifs sur les souches Gram + testées sont les extraits de gomme ammoniac traditionnelle AMM01, avec des CMI inférieures à $100 \mu\text{g/mL}$, comparables aux valeurs de CMI de l'érythromycine (**Tableau 18**). Les extraits de mélange de drogues végétales RDV ont également une activité antibactérienne significative, avec des CMI inférieures à $100 \mu\text{g/mL}$ (**Tableau 18**). Dans ces conditions de tests, les activités antibactériennes des extraits ALOF et COMA1 sont considérées comme modérées sur les souches Gram + testées, tandis que les extraits SARC ne montrent aucune activité antibactérienne. Seules les activités antibactériennes des extraits AMM01 et RDV sont considérées comme particulièrement prometteuses parmi les extraits végétaux.

Tableau 17 – Activité antibactérienne de l'acétate de cuivre par microdilution en bouillon

Souches bactériennes	CMI +/- écart-type	
	µg/mL	mM
<i>S. aureus</i> HG001	1070,3 +/- 339,7	5,9 +/- 1,9
<i>S. epidermidis</i> ATCC35983	908,2 +/- 0,0	5,0 +/- 0,0
<i>S. epidermidis</i> HUS	713,5 +/- 242,7	3,9 +/- 1,3
<i>S. hominis</i> HUS	908,2 +/- 0,0	5,0 +/- 0,0
<i>S. haemolyticus</i> HUS	681,1 +/- 248,7	3,8 +/- 1,4
<i>C. striatum</i> HUS	1271,4 +/- 497,4	7,0 +/- 2,7
<i>E. coli</i> MG1655	908,2 +/- 0,0	7,5 +/- 2,9
<i>P. aeruginosa</i> ATCC15692	1816,3 +/- 0,0	10,0 +/- 0,0

Seuls des extraits AMM01 et RDV montrent une activité antibactérienne marquée sur les bactéries Gram + testées, dans ces conditions expérimentales. L'acétate de cuivre est quant à lui le seul ingrédient avec une activité antibactérienne sur les bactéries Gram – testées, dont *P. aeruginosa*, bien que cette activité soit modérée.

Tableau 18 – Activité antibactérienne des extraits des différentes drogues végétales, exprimée en moyenne des CMI +/- l'écart-type ($\mu\text{g/mL}$)

Souches bact.	Extraits	Suc commercial d'A. ferox ALOF		Myrrhe commerciale de <i>C. abyssinica</i> COMA1		Myrrhe traditionnelle MYRR1	
		EtOH70%	EtOAc	EtOH70%	EtOAc	EtOH70%	EtOAc
<i>S. aureus</i> HG001		> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
<i>S. epidermidis</i> ATCC35983		625 +/- 0,0	416,7 +/- 180,4	1145,8 +/- 730,7	> 500	> 500	> 500
<i>S. epidermidis</i> HUS		500 +/- 171,2	312,5 +/- 0,0	375,0 +/- 237,0	> 500	> 500	> 500
<i>S. hominis</i> HUS		677,1 +/- 307,2	260,4 +/- 80,7	> 500	> 500	> 500	> 500
<i>S. haemolyticus</i> HUS		> 500	833,3 +/- 360,8	> 500	> 500	> 500	> 500
<i>C. striatum</i> HUS		> 500	833,3 +/- 360,8	93,7 +/- 34,9	140,6 +/- 81,7	125,0 +/- 42,8	614,9 +/- 492,8
<i>E. coli</i> MG1655		> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

Gomme sarcocolle traditionnelle SARC		Gomme ammoniac traditionnelle AMMO1				RDV	
EtOH70%	EtOAc	EtOH70%	EtOAc	DCM	EtOH70%	EtOAc	DCM
> 500	> 500	4,10 +/- 0,43	5,12 +/- 1,85	4,01 +/- 0,32	19,51 +/- 6,77	9,44 +/- 3,13	8,14 +/- 0,79
> 500	> 500	0,98 +/- 0,0	1,95 +/- 1,69	0,98 +/- 0,0	3,21 +/- 2,31	2,44 +/- 1,20	1,79 +/- 1,14
> 500	> 500	1,46 +/- 0,56	3,25 +/- 1,13	1,95 +/- 0,0	10,54 +/- 4,52	8,30 +/- 4,87	6,35 +/- 4,14
> 500	> 500	2,32 +/- 1,37	2,79 +/- 1,43	2,93 +/- 1,26	14,56 +/- 16,37	10,89 +/- 11,0	9,65 +/- 8,90
> 500	> 500	5,72 +/- 1,99	9,48 +/- 4,42	8,51 +/- 3,32	26,73 +/- 16,48	21,79 +/- 15,57	19,51 +/- 6,75
> 500	> 500	2,93 +/- 1,07	6,51 +/- 2,26	3,63 +/- 0,74	24,39 +/- 9,73	17,83 +/- 12,50	11,15 +/- 4,17
> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

2.3. Indices de sélectivité IS

L'indice de sélectivité *in vitro* (*selectivity index* SI en anglais) permet d'estimer si une substance ou un composé est plus actif sur la cible que toxique sur l'organisme ou la cellule hôte en se basant sur des résultats préliminaires obtenus *in vitro*. Il permet d'évaluer le potentiel thérapeutique dès l'étape de criblage. Il s'agit du rapport de la toxicité sur l'activité : plus l'indice sera haut, plus l'activité mesurée est sélective de la bactérie et donc intéressante.

Les indices de sélectivité *in vitro* ont été calculés pour l'acétate de cuivre, les extraits à l'acétate d'éthyle de la gomme ammoniacale traditionnelle AMM01-A et du mélange des 4 drogues végétales RDV-A. La formule suivante a été appliquée : CI_{50}/CMI , avec la CI_{50} la viabilité cellulaire sur des macrophages murins et la CMI l'activité antibactérienne sur les différentes souches (**Part.Exp-4.7**).

Les indices de sélectivité de l'acétate de cuivre $Cu(OAc)_2$ sont inférieurs à 1, indiquant que le composé est plus toxique sur les macrophages murins qu'il n'est actif sur les différentes souches bactériennes testées (**Tableau 19**). À l'inverse, les indices de sélectivité de l'extrait AMM01-A et de l'extrait RDV-A sont tous supérieurs à 10 vis-à-vis les souches Gram +, indiquant que l'extrait est plus actif sur ces bactéries qu'il n'est toxique sur les macrophages ou les fibroblastes murins (**Tableau 19**).

Tableau 19 - Indices de sélectivité IC_{50}/CMI de l'acétate de cuivre $Cu(OAc)_2$, de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la gomme ammoniacale traditionnelle (AMM01-A) et de l'extrait à l'acétate d'éthyle du mélange des 4 drogues végétales (RDV-A), calculés à partir de la toxicité sur les macrophages murins RAW 264.7 ($n = 3$) et sur les fibroblastes murins 3T3 ($n = 2$)

Souches bactériennes	Cu(OAc) ₂	AMM01-A		RDV-A	
	RAW 264.7	RAW 264.7	3T3	RAW 264.7	3T3
<i>S. aureus</i> HG001	0,51	24,41	48,83	52,97	52,97
<i>S. epidermidis</i> ATCC35983	0,6	64,10	128,21	204,92	204,92
<i>S. epidermidis</i> HUS	0,76	38,46	76,92	60,24	60,24
<i>S. hominis</i> HUS	0,6	44,80	89,61	45,91	45,91
<i>S. haemolyticus</i> HUS	0,79	13,19	26,37	22,95	22,95
<i>C. striatum</i> HUS	0,43	19,20	38,40	28,04	28,04
<i>E. coli</i> MG1655	0,40	< 0,25	< 0,5	< 0,25	< 0,25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC15692	0,3	-	-	-	-

Les extraits acétate d'éthyle des drogues végétales les plus actives, à savoir la gomme ammoniacale traditionnelle AMM01 et le mélange des 4 drogues végétales RDV, montrent des indices de sélectivité supérieurs à 10 dans les conditions de tests utilisées, laissant supposer un fort

potentiel thérapeutique. À l'inverse, les indices de sélectivité de l'acétate de cuivre sont inférieurs à 1, indiquant un composé plus toxique qu'actif dans ces conditions expérimentales.

D'après les tests par microdilution en bouillon, une activité antibactérienne des remèdes étudiés sur les souches Gram + serait possible, et principalement due à la gomme ammoniacale. Une activité sur les bactéries Gram – serait aussi permise par l'acétate de cuivre, à des doses cependant élevées et potentiellement toxiques pour les cellules hôtes.

3. Evaluation de l'activité sur la réponse inflammatoire

Les tests d'activités biologiques liées à la réponse inflammatoire ont été réalisés au sein de l'UMR 7199 – Equipe *Biovectorologie* par Geoffrey Bianchi et Camila Cevallos, deux stagiaires en deuxième année de Master sous la tutelle de la Pr. Sylvie Fournel (UMR 7199) et du Dr. Pierre Fechter (UMR 7242), avec l'encadrement de l'ingénieure Cendrine Seguin (UMR 7199). Ces expérimentations ont été réalisées sur des macrophages murins RAW 264.7, pour les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales dans un premier temps.

3.1. Effet pro-inflammatoire

L'inflammation locale fait partie de la réponse immunitaire face à une infection bactérienne : les macrophages produisent et libèrent alors de nombreux médiateurs pro-inflammatoires comme le monoxyde d'azote NO et différentes cytokines dont le TNF- α (**Chap.3.1**). Des substances augmentant la production de ces deux marqueurs de l'inflammation pourraient donc avoir un effet pro-inflammatoire. Afin de vérifier l'effet des ingrédients d'origine végétale des remèdes sur leur synthèse, ces deux molécules ont été dosées dans le surnageant de macrophages murins incubés avec les extraits acétate d'éthyle des différentes drogues végétales. Pour certaines expérimentations, la réponse inflammatoire a été activée chez les macrophages à l'aide de lipopolysaccharide LPS. Ce composé est connu pour activer les macrophages en tant qu'agoniste du *Toll Like Receptor 4* TLR4 (récepteur membranaire des macrophages impliqué dans la reconnaissance des agents pathogènes)²²⁹.

3.1.1. Production de monoxyde d'azote NO (test de Griess)

Des tests préliminaires ont permis d'évaluer la production de monoxyde d'azote NO chez des macrophages incubés en présence d'extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales, selon la méthode de Griess (**Part. Exp-3.3**). Cette méthode consiste à évaluer la production de NO en dosant la quantité d'ions nitrite dans le milieu et à la comparer à celle d'une culture de macrophages NT (incubés uniquement dans du milieu PBS) et d'une culture de macrophages activés au LPS.

Les différents extraits à l'acétate d'éthyle n'augmentent pas la quantité d'ions nitrites dans le surnageant des macrophages murins en comparaison aux macrophages témoins activés au LPS 50 ng/mL, et ce même aux concentrations les plus élevées (500 μ g/mL) (**Figure 54**).

Ni les extraits acétate d'éthyle à 500 µg/mL des différentes drogues végétales (ALOF-A, MYRR1-A, SARC-A et AMMO1-A) ni celui du mélange des 4 drogues végétales (RDV-A) ne semblent donc augmenter la production de NO chez les macrophages murins, dans ces conditions expérimentales.

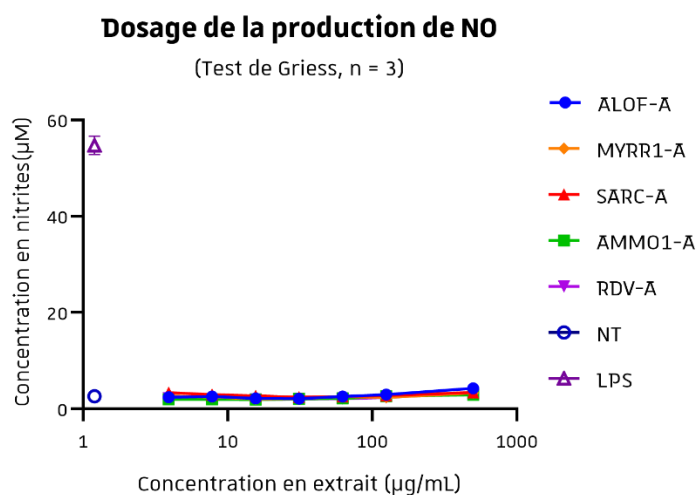


Figure 54 – Dosage en nitrite reflétant la production en NO des macrophages murins en fonction de la concentration en extrait acétate d'éthyle des drogues végétales

NT : macrophages incubés uniquement avec du milieu PBS ; LPS : macrophages incubés avec du LPS

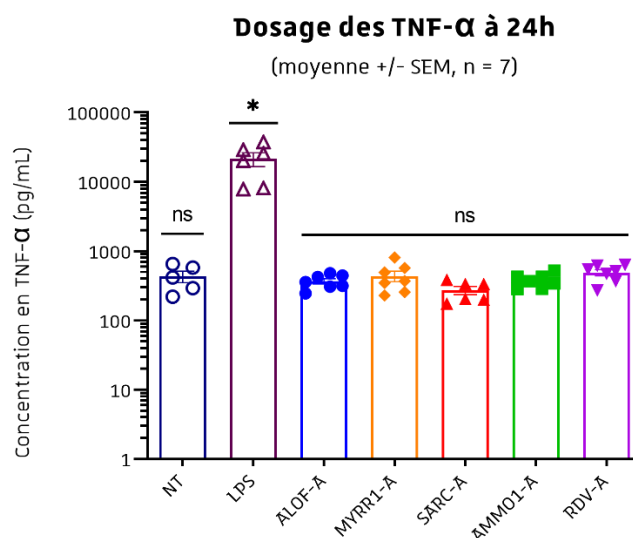
Macrophages incubés en présence des extraits à l'acétate d'éthyle de : ALOF-A suc commercial d'A. ferox ; COMA1-A myrrhe commerciale de *C. abyssinica* ; SARC-A gomme sarcocolle traditionnelle ; AMMO1-A gomme ammoniacale traditionnelle ; RDV-A mélange des 4 drogues précédents

3.1.2. Production de cytokines TNF- α

La production de cytokines pro-inflammatoires TNF- α par les macrophages murins a également été mesurée par test ELISA (**Part. Exp-3.4**). Cette production de TNF- α a été comparée à celle d'une culture de macrophages NT (incubés uniquement dans du milieu PBS) et d'une culture de macrophages activés au LPS. Ces expériences ont été réalisées pendant le changement de myrrhe, les tests n'ont donc pas été réalisés sur l'extrait de la myrrhe commerciale COMA1-A comme précédemment mais sur l'extrait de la myrrhe traditionnelle MYRR1-A

Les extraits acétate d'éthyle des différentes drogues végétales (ou mélange de drogues végétales) à 125 µg/mL n'induisent pas de production significative de TNF- α par les macrophages murins par rapport aux macrophages non-traités NT (incubés uniquement avec du milieu PBS) et en comparaison aux macrophages activés au LPS (**Figure 55**).

Aucun des extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales (ALOF-A, MYRR1-A, SARC-A et AMM01-A) ou du mélange des 4 drogues végétales (RDV-A) n'a provoqué une augmentation de la concentration en TNF- α dans le surnageant des macrophages. Il semblerait donc que leur présence à 125 $\mu\text{g/mL}$ dans le milieu lors de l'incubation des macrophages ne fasse pas augmenter la production de TNF- α par ces derniers, dans ces conditions expérimentales.



Les données obtenues avec chaque extrait ont été comparées aux données NT par test ANOVA univarié ($\alpha = 0,05$)

Figure 55 - Dosage des TNF- α produits par des macrophages murins en présence des extraits à l'acétate d'éthyle (A) des drogues végétales à 125 $\mu\text{g/mL}$ (échelle logarithmique)

NT : macrophages incubés uniquement avec du milieu PBS ; LPS : macrophages incubés avec du LPS

Macrophages incubés en présence des extraits à l'acétate d'éthyle de : **ALOF-A** suc commercial d'*A. ferox* ; **MYRR1-A** myrrhe traditionnelle ; **SARC-A** gomme sarcocolle traditionnelle ; **AMM01-A** gomme ammoniac traditionnelle ; **RDV-A** mélange des 4 drogues précédentes

D'après les deux tests réalisés, aucun des extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétale (ALOF-A, MYRR1-A, SARC-A et AMM01-A) ou du mélange des 4 drogues végétales (RDV-A) ne semble augmenter la production des marqueurs pro-inflammatoires choisis chez les macrophages murins. Ces premiers tests ne révèlent donc pas d'effet pro-inflammatoire pour ces différents extraits, dans ces conditions expérimentales.

3.2. Effet anti-inflammatoire

La réponse inflammatoire permet de lutter contre l'infection mais a besoin d'être régulée afin d'éviter la destruction des cellules et maintenir une homéostasie normale dans les tissus, notamment lors de la réparation des tissus (**Chap.3.1**). Cette régulation passe, entre autre, par la polarisation M1/M2 des macrophages : les macrophages M1 vont être impliqués dans la réponse pro-inflammatoire tandis que les macrophages M2 vont être impliqués dans la réponse anti-inflammatoire et la réparation des tissus²³⁰. La polarisation des macrophages vers le phénotype M1 est notamment induite par le LPS et va être marquée par la production de médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α et le NO²³⁰.

L'inhibition de la production de ces deux médiateurs a donc été mesurée par test de Griess et test ELISA sur des macrophages murins activés par LPS et incubés en présence des extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales, afin d'évaluer leur impact sur la polarisation des macrophages.

3.2.1. Inhibition de la production de monoxyde d'azote NO (test de Griess)

Des tests préliminaires avec la méthode de Griess ont été réalisés afin d'évaluer la production de monoxyde d'azote NO chez les macrophages activés (**Part. Exp-3.3**). Cette production a été comparée à celle d'une culture de macrophages NT (incubés uniquement dans du milieu PBS) et d'une culture de macrophages activés au LPS.

Les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales et mélange de drogues végétales permettent une diminution dose-dépendante de la quantité d'ions nitrites dosés dans le surnageant des macrophages murins (**Figure 56** p 112).

Les extraits à l'acétate d'éthyle des différents drogues végétales (ALOF-A, MYRR1-A, SARC-A et AMMO1-A) ou du mélange des 4 drogues végétales (RDV-A) diminuent la quantité d'ions nitrites dans le surnageant des macrophages. Il semblerait donc que la présence de ces extraits dans le milieu lors de l'incubation des macrophages activés inhibe la production de NO chez ces derniers, dans ces conditions expérimentales.

3.2.2. Inhibition de la production de cytokines TNF- α

La production de cytokines pro-inflammatoires TNF- α par les macrophages murins activés a également été mesurée par test ELISA (**Part. Exp-3.4**). Cette production a été comparée à celle d'une culture de macrophages NT (incubés uniquement dans du milieu PBS) et d'une culture de

macrophages activés au LPS. Ces expériences ont été réalisées après le changement de myrrhe, les tests n'ont donc pas été réalisés sur l'extrait de la myrrhe commerciale COMA1-A comme précédemment mais sur l'extrait de la myrrhe traditionnel MYRR1-A.

Les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales (ou mélange de drogues végétales) à **125 µg/mL** ne font pas baisser la concentration en TNF-α dans le surnageant des macrophages murins de manière significative par rapport aux macrophages activés (incubés uniquement avec du LPS et sans extraits) (**Figure 57-A** page suivante). Cela peut s'expliquer par des expérimentations espacées dans le temps, augmentant la variabilité entre les résultats.

À **62,5 µg/mL**, la diminution de la concentration en TNF-α devient significative chez les macrophages activés incubés les extraits ALOF-A, MYRR1-A et SARC-A, par rapport aux macrophages activés (**Figure 57-B** page suivante). Dans cette expérimentation, c'est l'extrait à l'acétate d'éthyle d'*A. ferox* ALOF-A qui semble avoir le plus fort effet inhibiteur sur la production de TNF-α, bien que le niveau de TNF-α dosé reste significativement plus élevé que chez des macrophages NT.

Les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales (ALOFA, MYRR1-A, SARC-A et AMMO1-A) ou du mélange des 4 drogues végétales (RDV-A) ont tous provoqué une baisse de la concentration en TNF-α dans le surnageant de macrophages activés au LPS. Cette diminution est significative par rapport aux macrophages activés témoins (incubés avec du LPS mais sans extrait) uniquement pour les extraits ALOF-A, MYRR1-A et SARC-A. Il semblerait donc que la présence de ces extraits dans le milieu lors de l'incubation des macrophages inhibent partiellement la production de TNF-α des macrophages murins, dans ces conditions expérimentales.

Tous les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales (ALOFA, MYRR1-A, SARC-A et AMMO1-A) ou du mélange des 4 drogues végétales (RDV-A) provoquent une baisse de la production de marqueurs d'inflammation par les macrophages, bien que cette baisse ne soit pas toujours significative dans ces conditions expérimentales. Ces résultats suggèrent un léger effet anti-inflammatoire sur les macrophages qui pourrait être lié à leur polarisation.

Cette activité relativement faible des extraits peut s'expliquer par la cinétique de l'expérimentation. En effet, la polarisation des macrophages par le LPS dépend du temps d'exposition²³⁰ : dans les conditions expérimentations utilisées, il a été observé que les macrophages murins activés se différencient en type M2 au bout de 3 jours d'incubation avec le LPS. Il serait donc intéressant de mesurer la production des médiateurs pro-inflammatoire à différents temps. La production de médiateurs anti-inflammatoires pourrait également être mesurée chez ces mêmes macrophages, comme la cytokine IL-10 qui est fortement produite chez les macrophages ayant un phénotype M2²³⁰.

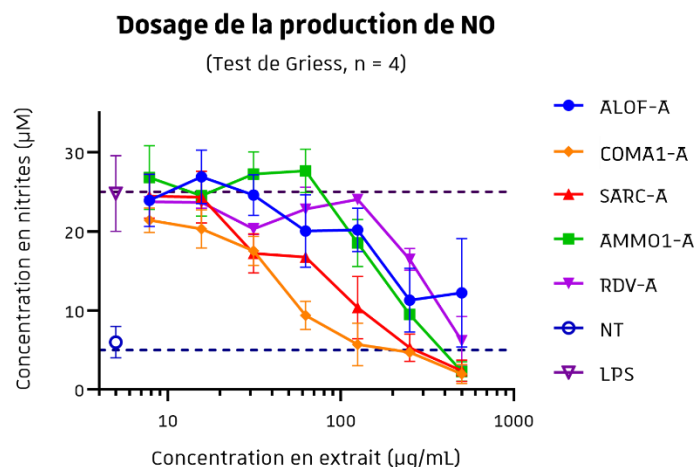
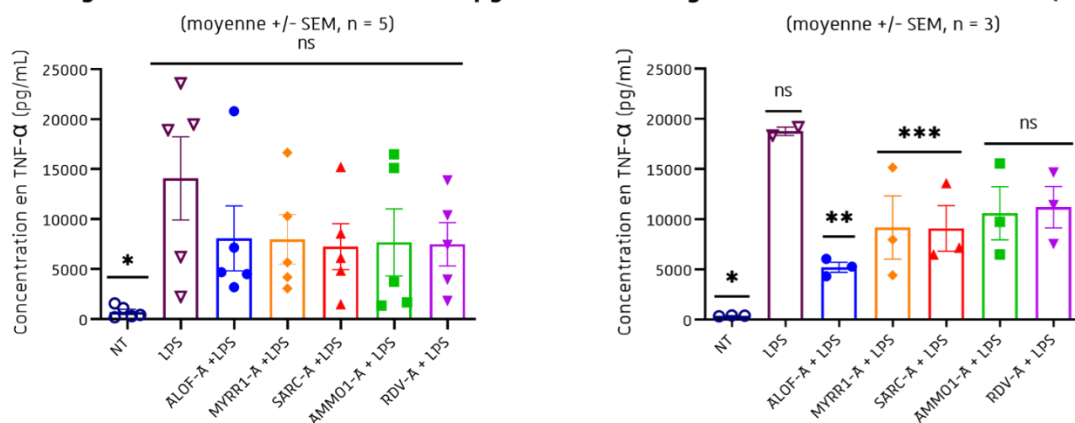


Figure 56 – Dosage en nitrites (μM) dans le surnageant des macrophages murins en fonction de la concentration en extrait à l'acétate d'éthyle (A) des drogues végétales

NT : macrophages incubés uniquement avec du milieu PBS ; LPS : macrophages incubés avec du LPS

Macrophages incubés en présence des extraits à l'acétate d'éthyle de : ALOF-A suc commercial d'A. ferox ; COMA1-A myrrhe traditionnelle ; SARC-A gomme sarcocolle traditionnelle ; AMMO1-A gomme ammoniacale traditionnelle ; RDV-A mélange des 4 drogues précédentes

A. Dosage du TNF- α à 24h : extraits à 125 $\mu\text{g/mL}$ B. Dosage du TNF- α à 24h : extraits à 62,5 $\mu\text{g/mL}$



Les données obtenues avec chaque extrait ont été comparées à celles obtenues avec le LPS par test ANOVA univarié ($\alpha = 0,05$)

Figure 57 – Dosage des TNF- α produits par des macrophages murins activés par LPS, en présence des extraits à l'acétate d'éthyle des drogues végétales : A. à 125 $\mu\text{g/mL}$; B. à 62,5 $\mu\text{g/mL}$

Macrophages incubés en présence des extraits à l'acétate d'éthyle de : ALOF-A suc commercial d'A. ferox ; MYRR1-A myrrhe traditionnelle ; SARC-A gomme sarcocolle traditionnelle ; AMMO1-A gomme ammoniacale traditionnelle ; RDV-A mélange des 4 drogues précédentes

NT : macrophages incubés uniquement avec du milieu PBS ; LPS : macrophages incubés uniquement avec du milieu PBS et du LPS

4. Criblage de l'activité cicatrisante (*scratch test*)

Les *scratch tests* ont été réalisés au sein de l'UMR 7199 – Equipe *Biovectorologie* par l'ingénieure Cendrine Seguin. Les tests ont été réalisés sur des fibroblastes murins 3T3 afin de déterminer l'effet cicatrisant *in vitro* des extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues. Ces expériences ont été réalisées après le changement de myrrhe, les tests n'ont donc pas été réalisés sur l'extrait de la myrrhe commerciale COMA1-A comme précédemment mais sur l'extrait de la myrrhe traditionnel MYRR1-A.

Lors de la réponse inflammatoire face à une infection, les différentes étapes sont la destruction et/ou le confinement du corps étranger suivi de la réparation des tissus endommagés (**Chap.1-3**). Cette étape de reconstruction cellulaire se fait notamment par la migration des fibroblastes⁴³, des cellules composant majoritairement les tissus conjonctifs et retrouvés dans le derme et l'hypoderme. La polarisation des macrophages en type M2 est également impliquée dans la réparation des tissus, notamment à travers la sécrétion de cytokines impliquées dans la différenciation des fibroblastes^{230,231}.

Des coupures artificielles ont été faites dans un tapis de fibroblastes afin de mimer une coupure dans la peau (**Figure 58**) et ces cultures fibroblastiques ont ensuite été incubées avec du surnageant provenant de culture de macrophages murins, eux-mêmes incubés avec les extraits pendant 3 jours. Deux conditions ont été testées : surnageant de macrophages activés au LPS (3 jours donc phénotype M2 : contient potentiellement des composés favorisant la réparation tissulaire) et surnageant de macrophages non-activés. La taille en pixels de l'espace entre les 2 bords a été mesurée avant et après ces 24h d'incubation, afin de suivre l'évolution de la migration des fibroblastes.

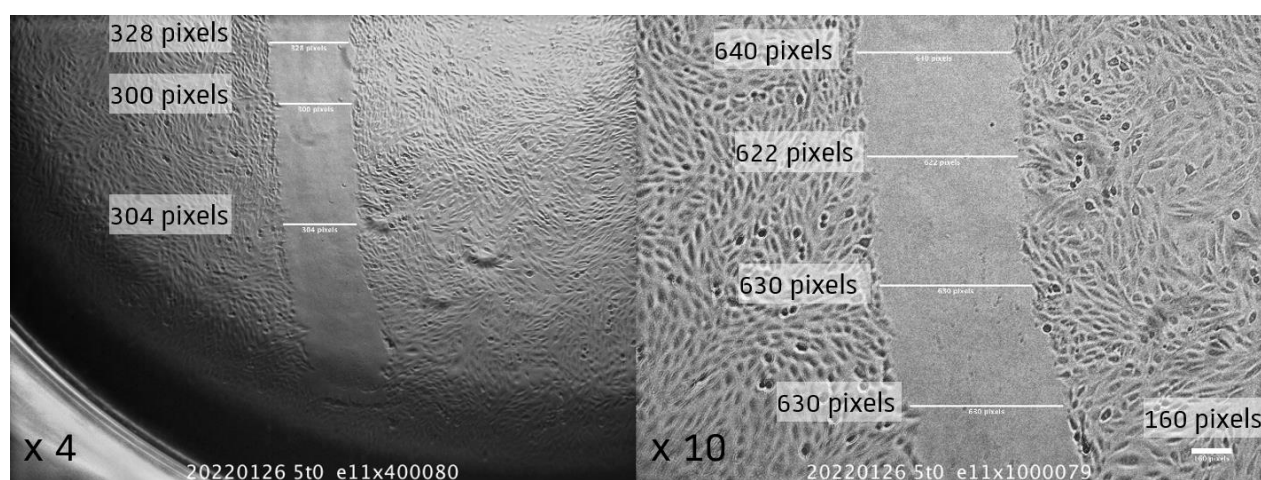


Figure 58 – Photographies au microscope optique des tapis fibroblastiques scindés en 2, avec la mesure en pixels de la coupure aux grossissements x4 et x10

4.1. Migration spontanée des fibroblastes

Les fibroblastes migrent les uns vers les autres spontanément en condition de culture NT, uniquement en présence de milieu PBS. Néanmoins, cette migration est assez importante, avec une diminution de **51 %** de la largeur de la coupure.

Il se pourrait que la migration ait été stimulée par la mort cellulaire causée lors de la coupure mécanique du tapis cellulaire, pouvant ainsi masquer l'effet des extraits testés. Pour répondre à cette problématique, des inserts seront utilisés à l'avenir pour permettre une séparation entre deux tapis cellulaires sans causer de dommages physiques.

4.2. Migration des fibroblastes sans LPS

Dans un premier temps, le scratch test a été réalisé avec des surnageants de macrophages n'ayant pas été activés par LPS, incubés uniquement avec du milieu et les différents extraits à l'acétate d'éthyle. Les tailles des coupures sont résumées dans la **Figure 59** et ont été comparées à la taille des coupures avant incubation avec les extraits à $t = 0$ et à la taille des coupures pour des fibroblastes non-traités NT (à $t = 24$ h).

Seules les fibroblastes incubés en présence des extraits ALOF-A et MYRR1-A à 125 $\mu\text{g/mL}$ montrent une diminution significative de la taille de la coupure par rapport aux coupures à $t = 0$, sans que cette baisse soit significativement différente de la taille de la coupure sur les fibroblastes NT. Ces extraits ne semblent donc pas stimuler chez les macrophages la synthèse de composés favorisant la migration des fibroblastes, dans ces conditions expérimentales. Pour les autres extraits, aucune différence significative n'est observée par rapport aux témoins $t = 0$ et NT : la migration des fibroblastes n'est donc pas stimulée et pour certains réplicats elle est même inférieure à celle des fibroblastes NT.

Les différents extraits ne semblent donc pas déclencher chez les macrophages incubés en leur présence la synthèse de composés favorisant la migration des fibroblastes, dans ces conditions expérimentales. Néanmoins l'activité cicatrisante a pu être masquée par la migration spontanée des fibroblastes due à la mort cellulaire causée par la coupure. Un nouveau protocole ne déclenchant pas de mort cellulaire et davantage de réplicats seront réalisés afin de permettre une meilleure évaluation du potentiel effet cicatrisant de ces extraits. L'effet des extraits directement incubés avec les fibroblastes sera également évalué.

Les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales (ALOF-A, MYRR1-A, SARC-A et AMMO1-A) ou mélange (RDV-A) ne semblent donc pas induire chez les macrophages la synthèse de composés pro-migration des fibroblastes.

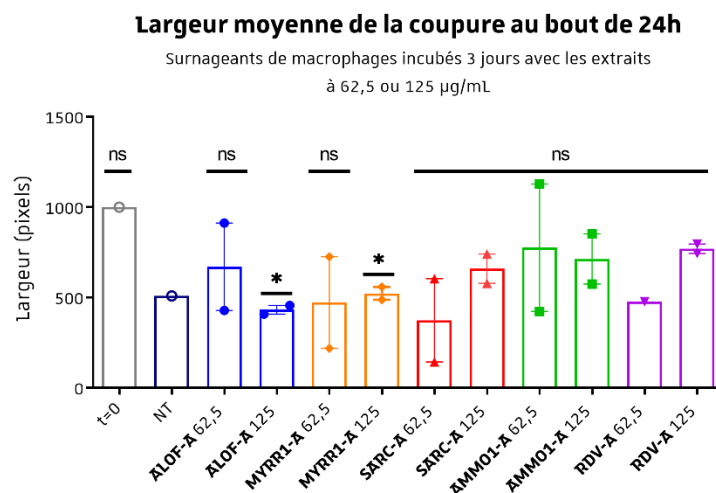


Figure 59 - Moyenne en pixel de la **taille de la coupure** entre des fibroblastes murins, incubés 24h avec du surnageant de macrophages ayant été cultivés 3 jours avec les extraits à l'acétate d'éthyle des drogues végétales, à 62,5 µg/mL (n = 2) ou 125 µg/mL (n = 2)

Fibroblastes incubés en présence du surnageant de macrophages ayant été incubés 24 h avec les extraits à l'acétate d'éthyle de : **ALOF-A** suc commercial d'*A. ferox* ; **MYRR1-A** myrrhe traditionnelle ; **SARC-A** gomme sarcocolle traditionnelle ; **AMMO1-A** gomme ammoniacale traditionnelle ; **RDV-A** mélange des 4 drogues précédents

NT : fibroblastes incubés uniquement avec du milieu PBS ; t = 0 : fibroblastes avant incubation avec les surnageants

4.3. Migration des fibroblastes avec LPS

Au bout de 3 jours, le LPS induit chez les macrophages une différenciation en type M2, dans ces conditions expérimentales. Leur surnageant devrait alors contenir des composés favorisant la réparation tissulaire et potentiellement la migration des fibroblastes.

Malheureusement, le surnageant des macrophages murins activés au LPS modifie drastiquement la morphologie des fibroblastes, rendant les « bords » de la coupure moins nets et gênant ainsi la mesure de la distance les séparant (**Figure 60**).

Cette difficulté de lecture a empêché d'évaluer correctement la migration des fibroblastes en conditions d'inflammation au travers des surnageants de macrophages exposés au LPS.

La différenciation des macrophages en type M2 avec le LPS ne semble donc pas adapté aux *scratch tests*, le LPS impactant également les fibroblastes.

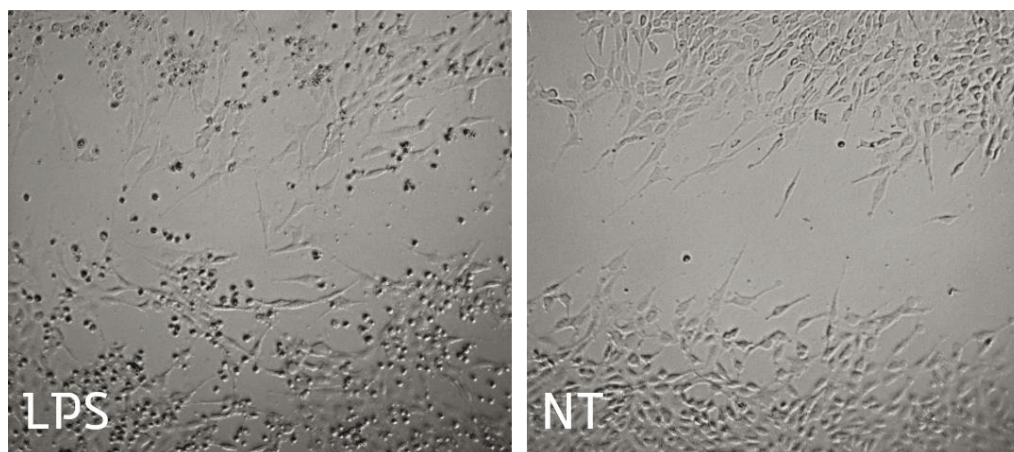


Figure 60 - Photographies sur microscope optique des tapis fibroblastiques scindés, après incubation avec le surnageant des macrophages, eux-mêmes incubés 3 jours avec du LPS (gauche) ou sans LPS (droite)

5. Conclusion sur les activités biologiques des différents ingrédients

Le criblage des différentes drogues des remèdes étudiés a été réalisé au travers de leurs extraits pour les drogues végétales et de l'acétate de cuivre pour le vert-de-gris, sur 3 activités biologiques considérées comme impliquées dans une infection cutanée de type abcès. Ce criblage a permis d'avoir une première estimation du potentiel effet thérapeutique de ces remèdes et des ingrédients les constituant.

Le criblage sur bactéries a permis de déterminer que 2 drogues pouvaient apporter une activité antibactérienne intéressante : les extraits de gomme ammoniacque traditionnelle AMMO1 sur les souches Gram + et l'acétate de cuivre sur les souches Gram -. De plus, l'extrait à l'acétate d'éthyle de la gomme ammoniacque AMMO1 présente des indices de sélectivité satisfaisants pour toutes les souches Gram + testées (toxicité évaluée sur des macrophages et des fibroblastes murins) malgré la toxicité reconnue de son composé majoritaire, le férulénol⁵⁶. Ces indices devront cependant être déterminés par rapport à des cellules humaines, idéalement des cellules de la peau comme des fibroblastes ou des kératinocytes. Ces résultats nous ont néanmoins paru assez encourageants pour effectuer un fractionnement bioguidé sur les extraits d'AMMO1, dans le but d'identifier et isoler les composés responsables de l'activité antibactérienne. Ces expérimentations sont détaillées dans le **Chapitre 4** – Fractionnement bioguidé par l'activité antibactérienne de la gomme ammoniacque traditionnelle. Concernant l'acétate de cuivre, l'activité antibactérienne est inférieure à celle des antibiotiques de référence utilisés et les indices thérapeutiques montrent que les composés sont plus toxiques qu'actifs, bien que cela doit être confirmé sur cellules humaines. Néanmoins, le sel de cuivre reste un élément du remède intéressant car il est le seul ingrédient à montrer une activité sur les bactéries Gram -, bien plus résistantes et problématiques que les bactéries Gram +. Par ailleurs, une application topique permet généralement d'utiliser une dose locale élevée tout en limitant la toxicité systémique⁷⁸ : la formulation traditionnelle pourrait ainsi permettre d'exploiter l'effet antibactérien du sel de cuivre tout en limitant sa toxicité aux cellules localisées au niveau de l'abcès.

Le criblage sur la réponse inflammatoire n'a montré aucun effet pro-inflammatoire des extraits sur les macrophages murins, tandis qu'un effet anti-inflammatoire (baisse de production de NO et de TNF- α) est observé en particulier pour les extraits à l'acétate d'éthyle du suc d'*A. ferox* ALOF-A, de la myrrhe traditionnelle MYRR1-A et de la gomme sarcocolle traditionnelle SARC-A. Cette activité sera confirmée par la mesure de médiateurs anti-inflammatoires comme la cytokine IL-10 sur des macrophages de phénotype M2.

Quant à l'activité cicatrisante, les premiers tests n'ont pas mis en évidence une amélioration de la migration des fibroblastes due aux extraits végétaux. Leur effet ayant été testé au travers du

surnageant de macrophages incubés avec les extraits, l'effet direct des extraits sur les fibroblastes doit encore être évalué. Par ailleurs, un autre protocole va être mis en place afin de s'affranchir de la migration induite par la mort cellulaire, afin d'avoir une meilleure visibilité de la migration induite par les extraits.

Les 5 ingrédients, végétaux comme métallique, semblent donc présenter une complémentarité d'activités biologiques (et de spectre bactérien pour le sel de cuivre) face à un abcès cutané infectieux, justifiant leur combinaison.

1. Etat de l'art de l'activité antibactérienne de
F. communis

2. Fractionnement bioguidé sur les extraits
AMM01

3. Détermination structurale des composés
isolés et leur identification

Chapitre 4

Fractionnement bioguidé
par l'activité antibactérienne
de la gomme ammoniacque
traditionnelle

p 119 à p 156



Chapitre 4 – Fractionnement bioguidé par l'activité antibactérienne de la gomme ammoniacque traditionnelle

Les criblages biologiques du chapitre précédent ont révélé une activité antibactérienne remarquable pour les extraits de la gomme ammoniacque traditionnelle AMM01, avec des CMI en dessous de 10 µg/mL sur les différentes bactéries Gram + testées. L'espèce *F. communis*, dont nous supposons notre gomme-résine être extraite, a déjà été étudiée pour son activité antibactérienne sur différentes souches dont *S. aureus* et les composés responsables de cette activité ont été identifiés comme étant des esters de daucanes, des coumarines sesquiterpéniques et des chromanes sesquiterpéniques²¹⁹. Cependant, elle a également été étudiée pour sa toxicité sur les mammifères, provoquée par certains des composés antibactériens évoqués précédemment.

Nous avons donc décidé de nous concentrer sur cette gomme ammoniacque AMM01 et d'entreprendre un **fractionnement bioguidé** de ses extraits afin de déterminer les **composés responsables de cette activité antibactérienne** puis d'établir un premier rapport entre leur toxicité et leur activité au travers d'un **indice thérapeutique *in vitro***.

Nous avons donc, dans un premier temps, fractionné les extraits de la gomme ammoniacque AMM01 par LC-Flash et testé l'activité antibactérienne *in vitro* des fractions obtenues par microdilution en bouillon.

Nous avons ensuite isolé les composés principaux des fractions actives à l'aide de différentes méthodes séparatives (LC-Flash et HPLC semi-préparative), afin de résoudre leur structure par spectrométrie HRMS et RMN (1D et 2D). Cette identification a d'ailleurs permis de confirmer l'identité des composés majoritaires évoqués comme marqueurs botaniques dans le **Chap.2-4.5.3**. Elle a également mis en lumière une espèce chimique n'ayant pas encore été décrite à notre connaissance, dérivée d'une des familles bioactives chez les *Ferula* à savoir les 4-hydroxycoumarines sesquiterpéniques.

Enfin, nous avons commencé à isoler ces composés en quantité suffisante pour confirmer leur activité antibactérienne *in vitro* par microdilution en bouillon, ainsi que déterminer leur cytotoxicité *in vitro* sur différentes lignées cellulaires. Lorsque ces deux activités biologiques auront été mesurée, des premiers indices de sélectivité *in vitro* pourront être déterminés afin d'évaluer la sélectivité d'activité de ces composés entre des cellules eucaryotes et des bactéries.

1. Fractionnement bioguidé sur les extraits AMM01

Nous avons vu dans le **Chapitre 3** – Etude des activités biologiques des différents ingrédients que les différents extraits de la gomme ammoniacale traditionnelle AMM01 ont montré des profils HPLC-DAD et HPLC-HRMS quasiment identiques ainsi que des activités antibactériennes *in vitro* similaires. Le fractionnement bioguidé a donc été réalisé indifféremment à partir des 3 extraits.

Pour cela, différentes méthodes de séparation ont été utilisées, de plus en plus résolutive : partition liquide/liquide, colonne ouverte, LC-Flash et HPLC semi-préparative. Les fractions obtenues ont à chaque fois été testées par microdilution en bouillon, sur les mêmes souches qu'utilisées pour le criblage.

1.1. Fractionnement par partition liquide/liquide

Une première tentative de fractionnement a été réalisée par partition liquide/liquide (**Part.Exp-5.1**) sur l'extrait hydroalcoolique de la gomme ammoniacale AMM01-EH, mais ce dernier s'est révélé complètement insoluble dans l'eau (**Figure 61-A.**) et très soluble dans les solvants apolaires utilisés en début de partition, en particulier le dichlorométhane (**Figure 61-B.**).

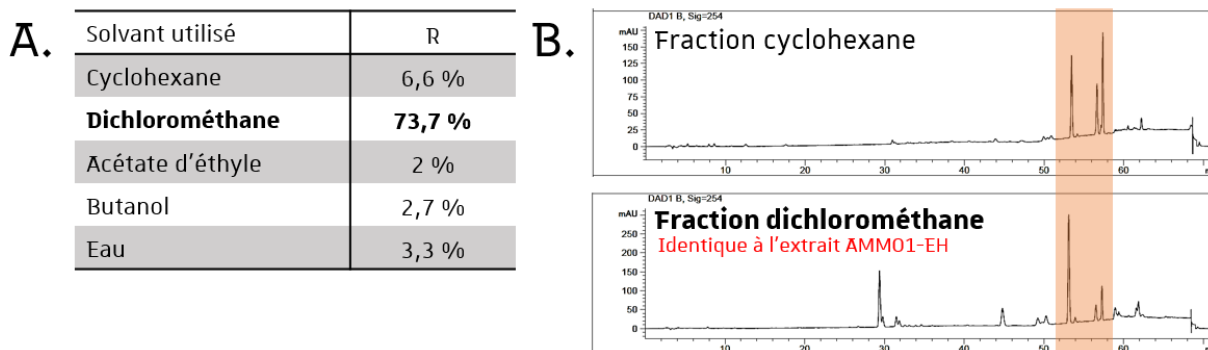


Figure 61 – Fractionnement par **partition liquide/liquide** sur l'extrait hydroalcoolique de la gomme ammoniacale traditionnelle AMM01-EH : **A.** Rendement R de chaque fraction ; **B.** Profils HPLC-DAD des fractions cyclohexane et dichlorométhane, les signaux communs surlignés

En effet, le dichlorométhane a solubilisé la quasi-entièreté de l'extrait, leur profil HPLC-DAD étant d'ailleurs identiques. Les fractions plus polaires à l'acétate d'éthyle et au butanol ont également montré des profils HPLC-DAD similaires, tandis que la fraction aqueuse ne comportait que peu de composés UV-visibles. Seule la fraction cyclohexane a permis d'isoler une partie des composés UV-visibles de l'extrait AMM01-EH (**Figure 61-C.**).

Les différentes fractions ont été testées par microdilution en bouillon afin de déterminer les CMI et les comparer à celle de l'extrait parent, AMM01-EH (**Tableau 20**). Les fractions avec les CMI les plus similaires à celle de l'extrait **AMM01-EH** sur les souches Gram + sont la fraction **dichlorométhane**, ainsi que la fraction **cyclohexane**. Aucune fraction n'a montré d'activité sur la bactérie Gram -, *E. coli*. Une partie des composés actifs responsables de l'activité de l'extrait AMM01-EH se trouve donc dans la fraction la plus apolaire (fraction cyclohexane).

Tableau 20 – Activité antibactérienne des fractions obtenues par partition liquide/liquide de l'extrait hydroalcoolique de gomme ammoniacale traditionnelle **AMM01-EH**, exprimée en moyenne des CMI ($\mu\text{g/mL}$) +/- l'écart-type ($n = 3$)

Souches	Fractions partition L/L de l'extrait AMM01-EH					
	AMM01-EH	Cyclohexane	DCM	EtOAc	Butanol	Eau
<i>S. aureus</i> HG001	4,10 +/- 0,43	2,6 +/- 1,13	3,91 +/- 0,00	7,81 +/- 0,00	15,62 +/- 0,00	> 500
<i>S. epidermidis</i> ATCC35983	0,98 +/- 0,00	1,14 +/- 0,75	1,13 +/- 0,75	1,30 +/- 0,56	9,12 +/- 5,97	> 500
<i>S. epidermidis</i> clinique	1,46 +/- 0,56	3,26 +/- 1,13	2,60 +/- 1,13	3,91 +/- 0,00	20,83 +/- 9,02	> 500
<i>S. hominis</i> clinique	2,32 +/- 1,37	2,60 +/- 1,13	2,60 +/- 1,13	3,91 +/- 0,00	15,62 +/- 0,00	> 500
<i>S. haemolyticus</i> clinique	5,72 +/- 1,99	3,91 +/- 0,00	3,91 +/- 0,00	7,81 +/- 0,00	31,25 +/- 0,00	> 500
<i>C. striatum</i> clinique	2,93 +/- 1,07	3,91 +/- 0,00	3,91 +/- 0,00	7,81 +/- 0,00	23,44 +/- 11,05	> 500
<i>E. coli</i> MG1655	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

Cependant, cette première séparation n'ayant permis d'obtenir qu'une seule fraction comportant une partie des composés majoritaires, on ne peut exclure la présence de composé actifs en dehors de celle-ci. Un second fractionnement a été réalisé sur LC-Flash afin d'obtenir au moins deux fractions différentes de l'extrait.

1.2. Fractionnement par LC-Flash : fractions **F1** et **F2**

Au vu du premier fractionnement, un deuxième essai a été fait en utilisant cette fois-ci la chromatographie en phase liquide d'adsorption comme méthode de séparation. Pour cela, une LC-Flash a été utilisée sur des colonnes préremplies commerciales de silice, avec un gradient cyclohexane/EtOAc 80/20 (v/v) à 0/100 (v/v) puis un gradient EtOAc/MeOH 100/0 (v/v) à 90/10 (v/v) (**Part.Exp-5.4**).

Cette séparation a permis l'obtention de deux fractions « majoritaires » (représentant la quasi-totalité de la masse d'extrait de départ) et 3 fractions « minoritaires » (représentant une

petite proportion de la masse d'extrait de départ) (**Figure 62**). Les fractions majoritaires **F1** et **F2** regroupaient à elles deux tous les composés UV-visibles majoritaires de manière complémentaire, les fractions F3, F4 et F5 ne présentant que quelques signaux de composés minoritaires (**Figure 63** page suivante).

Les différentes fractions ont été testées par microdilution en bouillon afin de déterminer les CMI et les comparer à celle de l'extrait parent, AMMO1-EH (**Tableau 21** page suivante). La souche *C. striatum* ne s'étant pas développée correctement lors de ces expérimentations, les fractions n'ont pas pu être testées sur cette souche. Seules les fractions **F1** et **F2** montrent une activité antibactérienne sur les souches Gram + testées. Aucune fraction n'a montré d'activité sur la bactérie Gram –, *E. coli*.

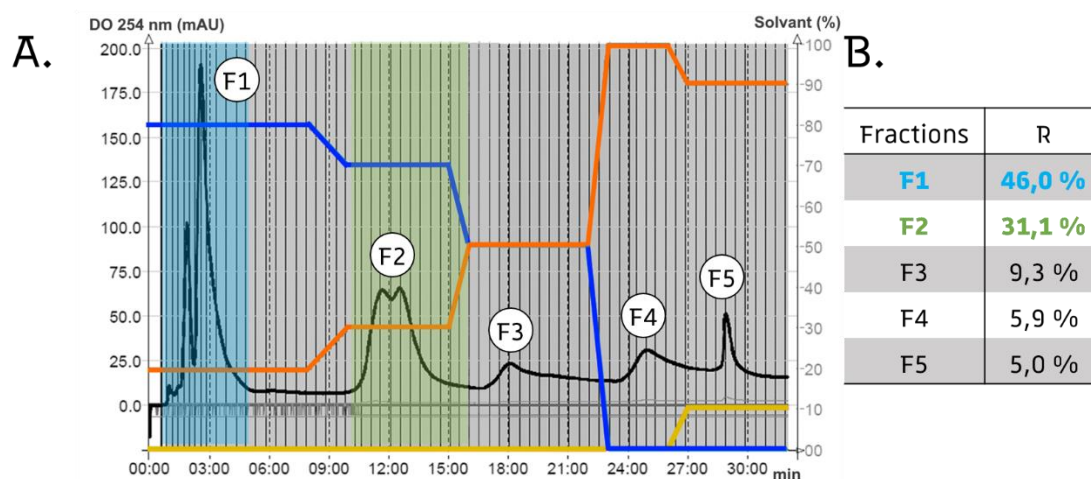


Figure 62 – Fractionnement par **LC-Flash** sur l'extrait hydroalcoolique de la gomme ammoniacque traditionnelle AMMO1-EH : **A.** Chromatogramme à **254 nm** avec le système d'élution, les 5 fractions dont les fractions **F1** et **F2** surlignées (méthode **FLASH_AMMO_12G** avec **Cyclohexane/EtOAc/MeOH**) ; **B.** Rendement de chaque fraction

La fraction **F1** a des CMI proches de celles de l'extrait parent **AMMO1-EH** (**Tableau 21** page suivante) et comporte les mêmes composés UV-visibles que la fraction cyclohexane obtenue précédemment par partition liquide/liquide, également antibactérienne sur les souches Gram + testées (**Figure 61** et **Figure 63**). La fraction **F2** a des CMI légèrement plus élevées que celles de l'extrait parent, en particulier sur *S. epidermidis* ATCC25983, mais reste néanmoins particulièrement active sur les bactéries Gram + (**Tableau 21** page suivante). Les deux fractions **F1** et **F2** représentent à elle deux les composés majoritaires de l'extrait AMMO1-EH et sont toutes les deux actives sur les bactéries Gram + testées, avec des CMI proches de celle de l'extrait.

L'extrait de gomme ammoniacque traditionnelle AMMO1 semble donc comporter plusieurs composés actifs, répartis dans les 2 fractions.

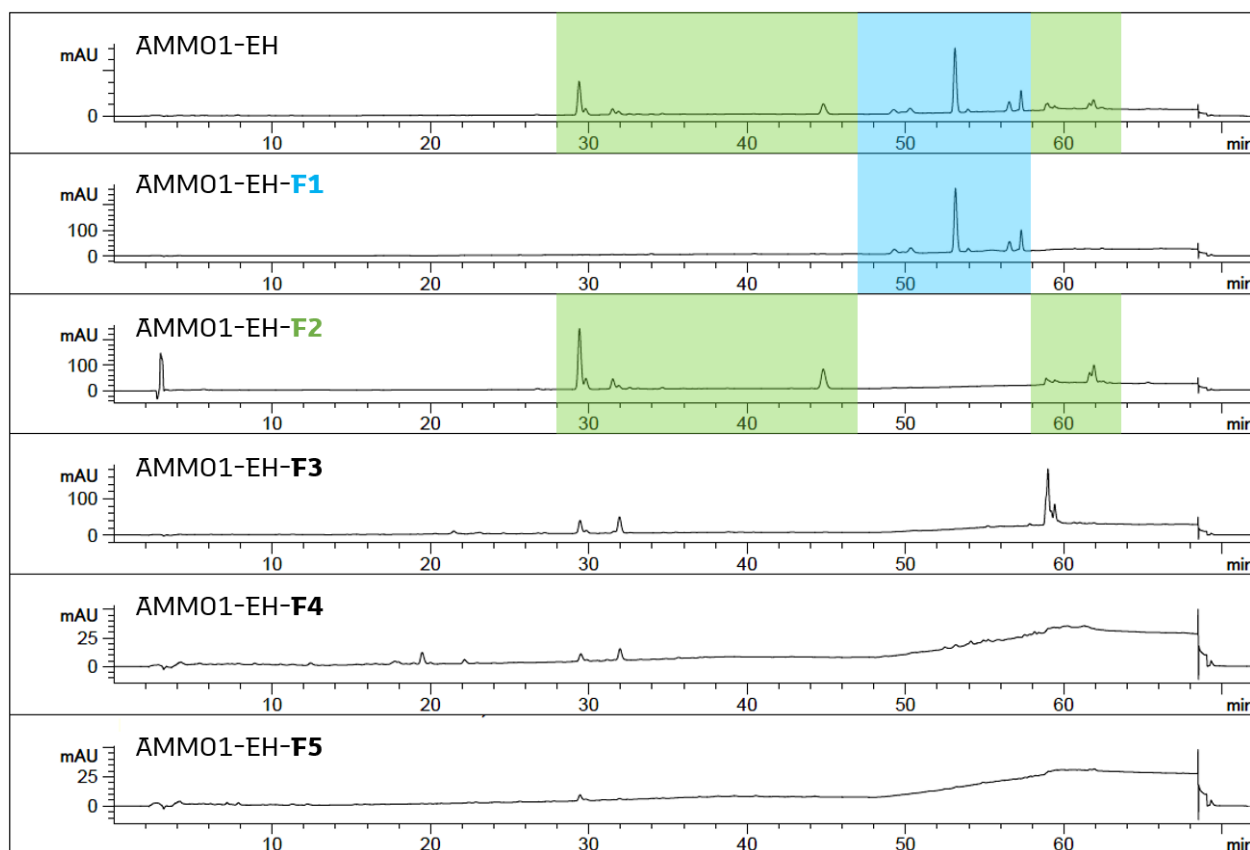


Figure 63 – Superposition des chromatogrammes HPLC-DAD à 254 nm de l'extrait AMMO1-EH et de ses fractions obtenues par **séparation sur LC-Flash** (FLASH_AMMO-12G) avec les signaux des fractions **F1** et **F2** surlignés (méthode **DOREMA**)

Tableau 21 – Activité antibactérienne des fractions obtenues par LC-Flash (FLASH_AMMO-12G) de l'extrait hydroalcoolique de gomme ammoniac traditionnelle **AMMO1-EH**, exprimée en moyenne des CMI ($\mu\text{g/mL}$) +/- l'écart-type ($n = 2$)

Souches	Fractions FLASH de l'extrait AMMO1-EH					
	AMMO1-EH	F1	F2	F3	F4	F5
<i>S. aureus</i> HG001	4,10 +/- 0,43	5,86 +/- 2,76	3,91 +/- 0,00	> 62,5	> 62,5	> 62,5
<i>S. epidermidis</i> ATCC35983	0,98 +/- 0,00	1,04 +/- 1,29	11,72 +/- 5,52	> 62,5	> 62,5	> 62,5
<i>S. epidermidis</i> clinique	1,46 +/- 0,56	2,93 +/- 1,38	3,91 +/- 0,00	> 62,5	> 62,5	> 62,5
<i>S. hominis</i> clinique	2,32 +/- 1,37	1,95 +/- 0,00	7,81 +/- 0,00	> 62,5	> 62,5	> 62,5
<i>S. haemolyticus</i> clinique	5,72 +/- 1,99	3,91 +/- 0,00	7,81 +/- 0,00	> 62,5	> 62,5	> 62,5
<i>E. coli</i> MG1655	> 500	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5

1.2.1. Isolement du composé majoritaire de **F1**

La fraction **F1** comporte un composé majoritaire, visible en UV à 254 nm (**Figure 64**, **F1-C**) et en MS/ESI. Nous avons identifié putativement ce composé comme étant du **féculénol 36** dans le **Chap.2-4.5.3**. Ce composé est décrit dans la littérature comme ayant une activité antibactérienne, notamment sur *S. aureus*¹⁷⁷. Nous avons donc entrepris de l'isoler afin de confirmer son identité et de le tester sur notre sélection de souches bactériennes, dans nos conditions expérimentales.

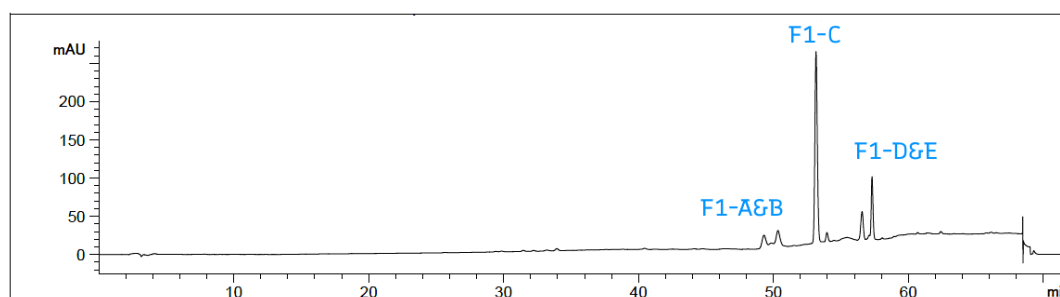


Figure 64 – Profil de la fraction **F1** en HPLC-DAD à 254 nm (méthode **DOREMA**)

Un premier essai a été réalisé par LC-Flash sur une colonne de silice préremplie commerciale avec un système cyclohexane/EtOAc (méthode **FLASH_AMMO_F1**). Cette séparation a permis d'obtenir une fraction enrichie en composé **F1-C** (**Figure 65** page suivante). Le composé majoritaire a ensuite été isolé à partir de cette fraction enrichie à l'aide d'une purification sur HPLC semi-préparative avec une phase de silice greffée C₁₈ (méthode **PLC_AMMO_F1**). Cette purification a permis d'obtenir le composé majoritaire assez pur pour permettre la résolution de sa structure et ainsi confirmer s'il s'agit ou non du **féculénol 36** (**Figure 66** page suivante).

L'isolement d'une quantité suffisante pour permettre des tests antibactériens *in vitro* a été possible grâce à Megi Gjokolaj, stagiaire en deuxième année de Master, avec 21,3 mg purs à 91,5 % sur la base de l'absorbance en UV à 254 nm.

Les activités antibactérienne et cytotoxique de ce composé seront donc testées très prochainement, en parallèle des molécules potentiellement actives de la fraction **F2** lorsque ces dernières auront été isolées en quantité suffisante, afin de permettre une comparaison stricte entre elles.

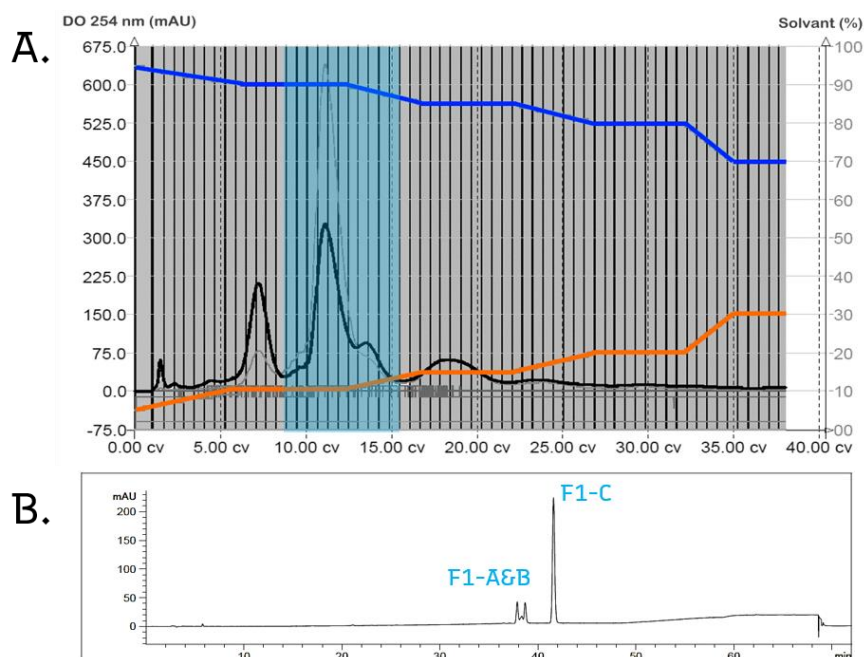


Figure 65 – Séparation par **LC-Flash** de la fraction **F1**: **A.** Chromatogramme **LC-Flash UV 254 nm** avec le système d'élution et la sous-fraction contenant le composé majoritaire surlignée (méthode **FLASH_AMMO_F1** avec **Cyclohexane/EtOAc**) ; **B.** Chromatogramme **HPLC-DAD 254 nm** de la sous-fraction contenant le composé majoritaire **F1-C** (méthode **DOREMA**)

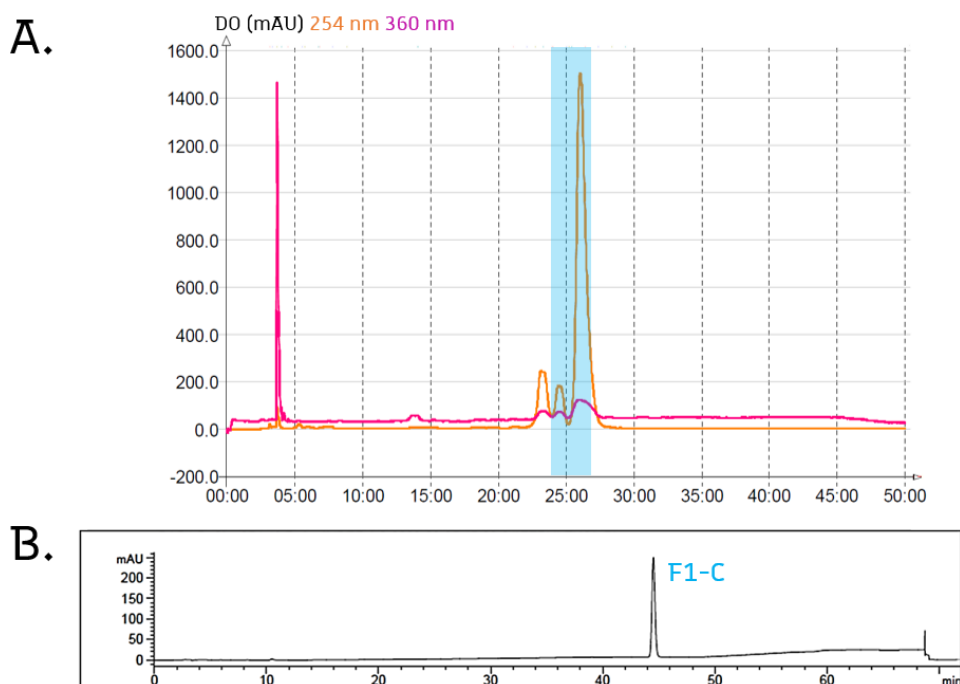


Figure 66 – Purification par HPLC semi-préparative du composé majoritaire de la fraction **F1**: **A.** Chromatogramme **HPLC semi-préparative UV** avec le système d'élution et le composé majoritaire **F1-C** surligné (méthode **PLC_AMMO_F1**) ; **B.** Chromatogramme **HPLC-DAD 254 nm** du composé majoritaire **F1-C** isolé (méthode **DOREMA**)

1.2.2. Isolement des composés majoritaires de **F2**

La fraction **F2** comporte un composé majoritaire en UV à 254 nm (**Figure 67, F2-A**) et en MS/ESI, que nous avons identifié putativement dans le chapitre 2 comme étant de l'**ω-hydroxyféruléol 43**, un dérivé du féruléol **36** avec une activité antibactérienne décrit dans la littérature (**Chap.2-4.5.3** Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Nous avons donc entrepris de l'isoler afin de confirmer son identité et de le tester sur notre sélection de souches bactériennes, dans nos conditions expérimentales.

Cette fraction **F2** contient également d'autres composés donnant des signaux intenses en UV 254 nm et en MS/ESI, dont le composé sortant entre 36 et 37 minutes en HPLC-HRMS et vers 45 minutes en HPLC-DAD (variable selon les analyses dû à des fuites dans le système). Ce dernier est le seul composé des 3 extraits AMMO1 à fortement absorber à 360 nm (**Figure 67, F2-E**). La prédiction de sa formule brute (HRMS) n'a pas permis d'émettre d'hypothèse sur son identité, une telle formule n'étant pas décrite chez les férules : nous avons donc également entrepris d'isoler ce composé afin de déterminer sa structure et tester son activité antibactérienne, notamment sur *S. aureus*.

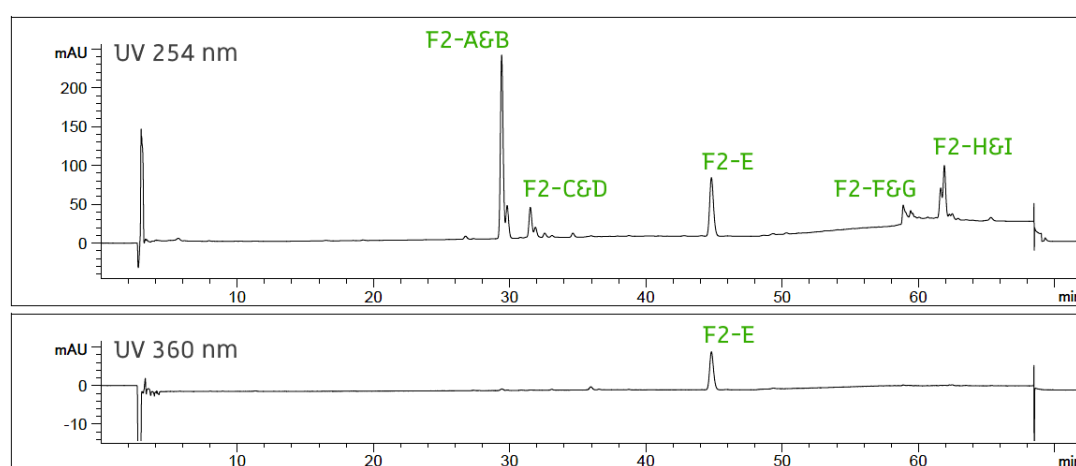


Figure 67 – Profil de la fraction **F2** en HPLC-DAD à 254 nm et 360 nm (méthode **DOREMA**)

Une première séparation a été faite sur colonne ouverte de silice, avec un système DCM/EtOAc 95/5 jusqu'à 90/10 (v/v). Les composés **F2-A** et **F2-E** sont facilement différenciables par CCM avec une irradiation à 365 nm, ces deux composés fluoresçant fortement par rapport aux autres composés mais à des longueurs d'onde différentes, le premier en bleu le second en blanc (**Figure 68** page suivante). Néanmoins, aucune séparation satisfaisante n'a pu être obtenue sur silice, que ce soit sur colonne ouverte (**Figure 68** page suivante) ou par LC-Flash (non illustré ici).

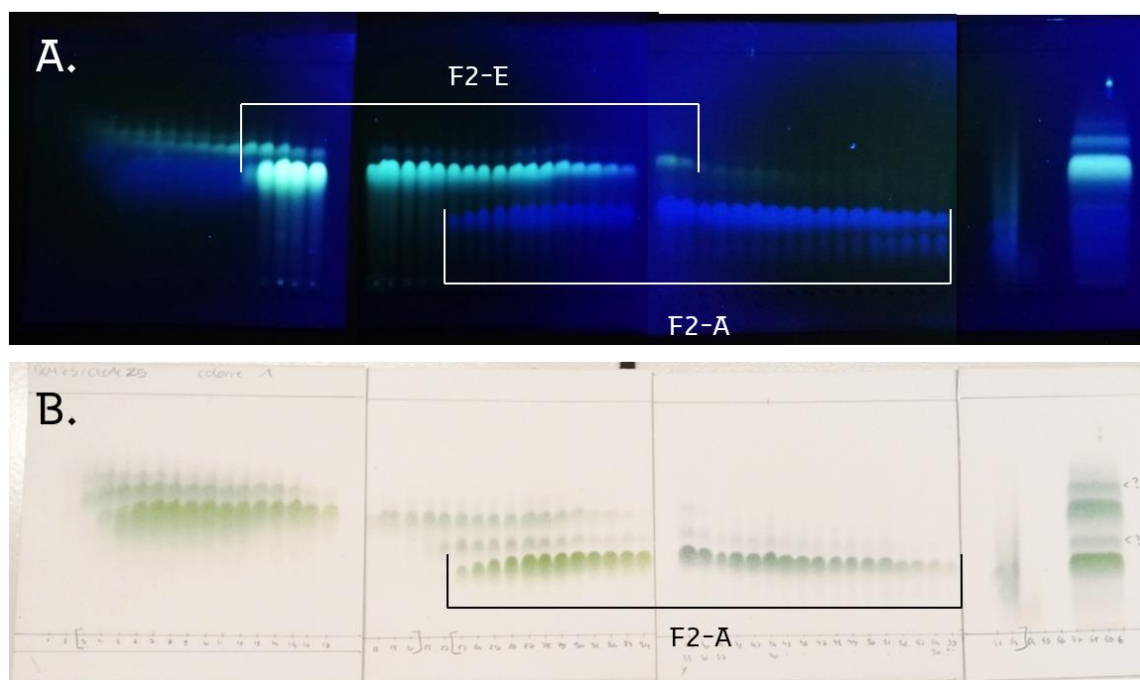


Figure 68 – Suivi par CCM de la séparation de la fraction **F2** sur colonne ouverte par palier isocratique avec un système DCM/EtOAc 95/5 (v/v) jusqu'à 90/10 (v/v) [conditions d'élution CCM : DCM/EtOAc 75/25 (v/v)]• : **A.** sous UV 365 nm ; **B.** après révélation à la **vanilline sulfurique**

Une seconde séparation a été faite sur HPLC semi-préparative, cette fois-ci sur une phase de silice greffée C₁₈ (méthode **PLC_AMMO_F2**). Cette purification a permis d'obtenir le composé majoritaire **F2-A** ainsi que le composé **F2-E** assez purs pour permettre la détermination de leur structure (**Figure 69** page suivante). Cette détermination structurale va permettre de confirmer s'il s'agit ou non de l'**ω-hydroxyférulénol 43** pour le composé **F2-A** et d'identifier le composé **F2-E**.

L'isolement d'une quantité suffisante pour permettre des tests antibactériens *in vitro* a été initié par Megi Gjokolaj, stagiaire en deuxième année de Master, et est continué par Capucine Braillon, doctorante en première année dans l'UMR 7200 sous la direction de Catherine Vonthron-Senecheau et l'encadrement de Sergio Ortiz.

Les activités antibactérienne et cytotoxique de ces composés seront testées très prochainement, en même temps que celles du composé F1-C isolé de la fraction précédente.

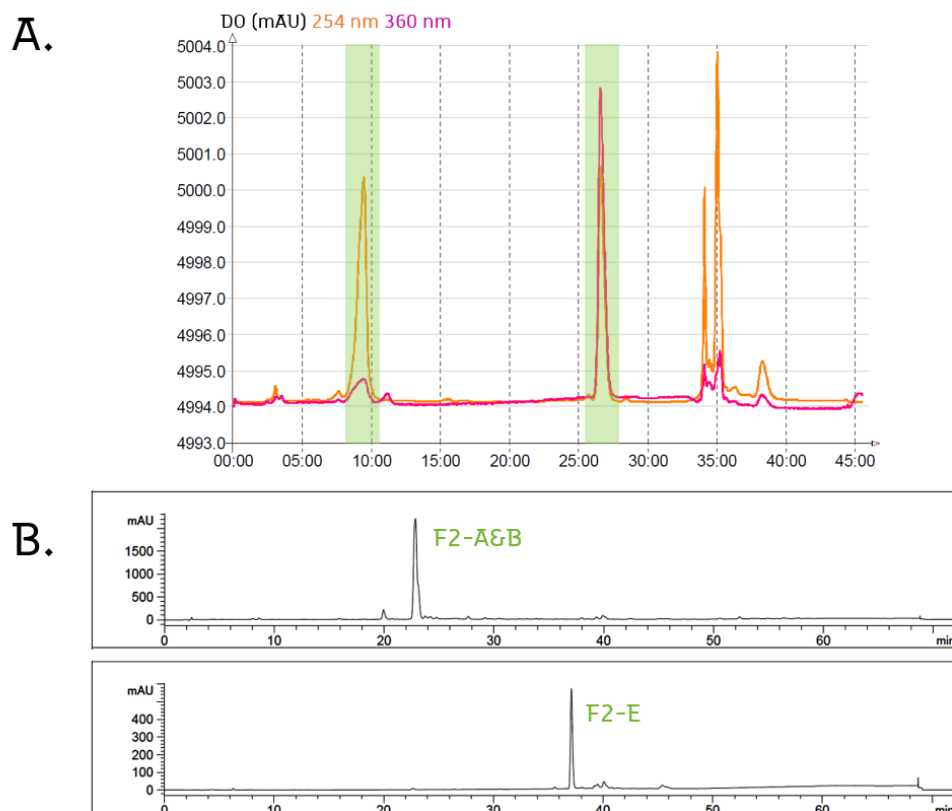


Figure 69 – Purification par HPLC semi-préparative des composés **F2-A** et **F2-E** de la fraction **F2** : **A.** Chromatogramme **HPLC semi-préparative UV** avec les composés **F2-A** et **F2-E** surlignés (méthode **PLC_AMMO_F2**) ; **B.** Chromatogramme **HPLC-DAD 254 nm** des composés **F2-A** et **F2-E** isolés (méthode **DOREMA**)

2. Détermination structurale des composés isolés et identification

La détermination structurale des 3 composés majoritaires isolés de la gomme ammoniacque a été réalisée sur la base des données de spectrométrie HRMS et de spectrométrie RMN 1D (RMN du proton ^1H et RMN du carbone ^{13}C) et RMN 2D (RMN de corrélation $^1\text{J } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC, RMN de corrélation $^3\text{J } ^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY et RMN de corrélation $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC).

Ces trois composés se sont révélés être trois dérivés d'une même structure. La résolution de cette structure principale sera donc détaillée avec le premier composé puis nous nous concentrerons sur les différences des deux autres dérivés. Lorsque les composés sont déjà décrits, les données RMN seront comparées avec celles décrites dans la littérature scientifique.

2.1. Le composé **F1-C** : le féruléol ?

Le composé **F1-C** est sous la forme d'une huile translucide. L'analyse des extraits de gomme ammoniacque en masse haute résolution avec une ionisation par électrospray montre un ion protoné $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 367,2306 en mode d'ionisation positive (ESI+) et déprotoné $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 365,2136 en mode d'ionisation négative (ESI-), permettant la prédiction de la formule brute comme étant $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_3$ (**Tableau 12**). Nous avons supposé dans le **Chap.2-4.5.3** qu'il s'agissait du **féruléol 36**, une coumarine sesquiterpénique retrouvée chez *F. communis*.

Nous allons ici vérifier cette hypothèse en déterminant la structure du composé F1-C sur la base de sa formule brute et d'analyses RMN 1D et 2D. Cette résolution structurale peut se découper en 2 parties, la première portant sur la **chaîne sesquiterpénique** et la seconde sur le **noyau 4-hydroxycoumarine**.

2.1.1. La chaîne sesquiterpénique

Le spectre RMN ^1H indique la présence de **8 protons de type $-\text{CH}_2$** (alcane non-substitués) aux δ_{H} 2,08 (2H, m, **H-5'**), 1,99 (2H, m, **H-4'**), 1,93 (2H, m, **H-9'**) et 1,85 (2H, m, **H-8'**), reconnaissables à leur déplacement chimique entre 0 et 2 ppm (**Figure 70**). En plus de ces 8 protons, on peut identifier **4 groupements méthyles** aux δ_{H} 1,79 (3H, s, **H-13'**), 1,61 (3H, s, **H-15'**), 1,54 (3H, s, **H-14'**) et 1,51 (3H, s, **H-12'**), reconnaissables à leur intégration de 3 protons (**Figure 70**).

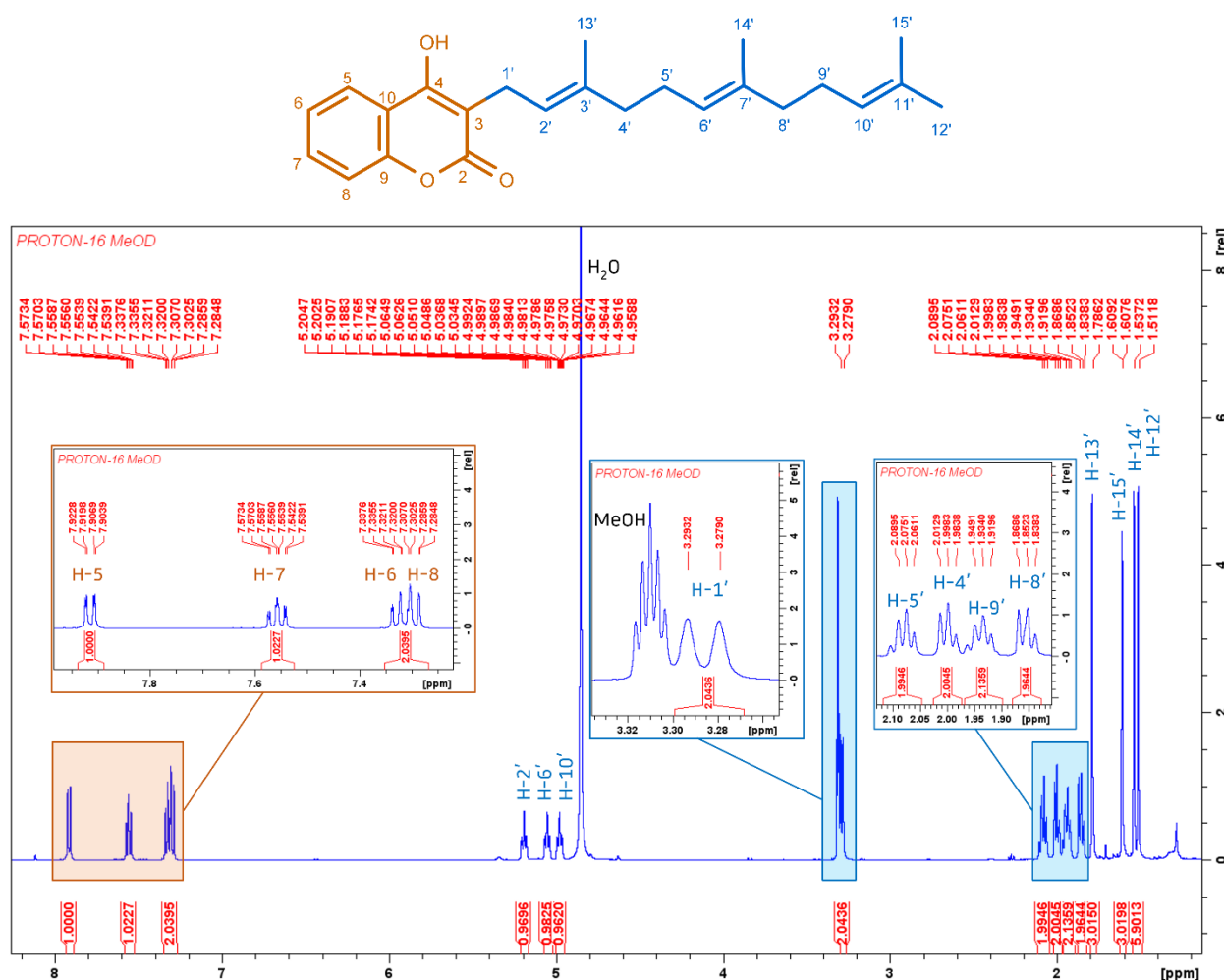


Figure 70 – Structure numérotée du féruléol **36** et spectre de RMN ^1H du composé F1-C (500 MHz, CD_3OD , 16 scans)

Le spectre RMN ^1H montre également des signaux correspondant à **3 protons éthyléniques** aux δ_{H} 5,19 (1H, tq, $J = 6,9$ et $1,3$ Hz, **H-2'**), 5,05 (1H, tq, $J = 6,9$ et $1,5$ Hz, **H-6'**) et 4,97 (1H, quint, $J = 6,9$ et $1,5$ Hz, **H-10'**), reconnaissables à leur déplacement chimique entre 4 et 7,5 ppm ainsi que leur constante de couplage principale autour de 7 Hz (**Figure 70**).

Le spectre RMN ^{13}C confirme la présence de **8 carbones acycliques** avec des déplacements chimiques en dessous de 40 ppm : δ_{C} 40,78 (**C-8'**), 40,77 (**C-4'**), 27,76 (**C-9'**), 27,29 (**C-5'**), 25,84 (**C-15'**), 23,66 (**C-1'**), 17,66 (**C-12'**), 16,42 (**C-13'**) et 16,10 (**C-14'**) (**Figure 71**). L'analyse RMN 2D HSQC permet d'attribuer ces carbones aux différents protons de type alcane $-\text{CH}_2$ ou aux protons des groupements méthyles $-\text{CH}_3$, confirmant ainsi leur nature acyclique (**Figure 72**).

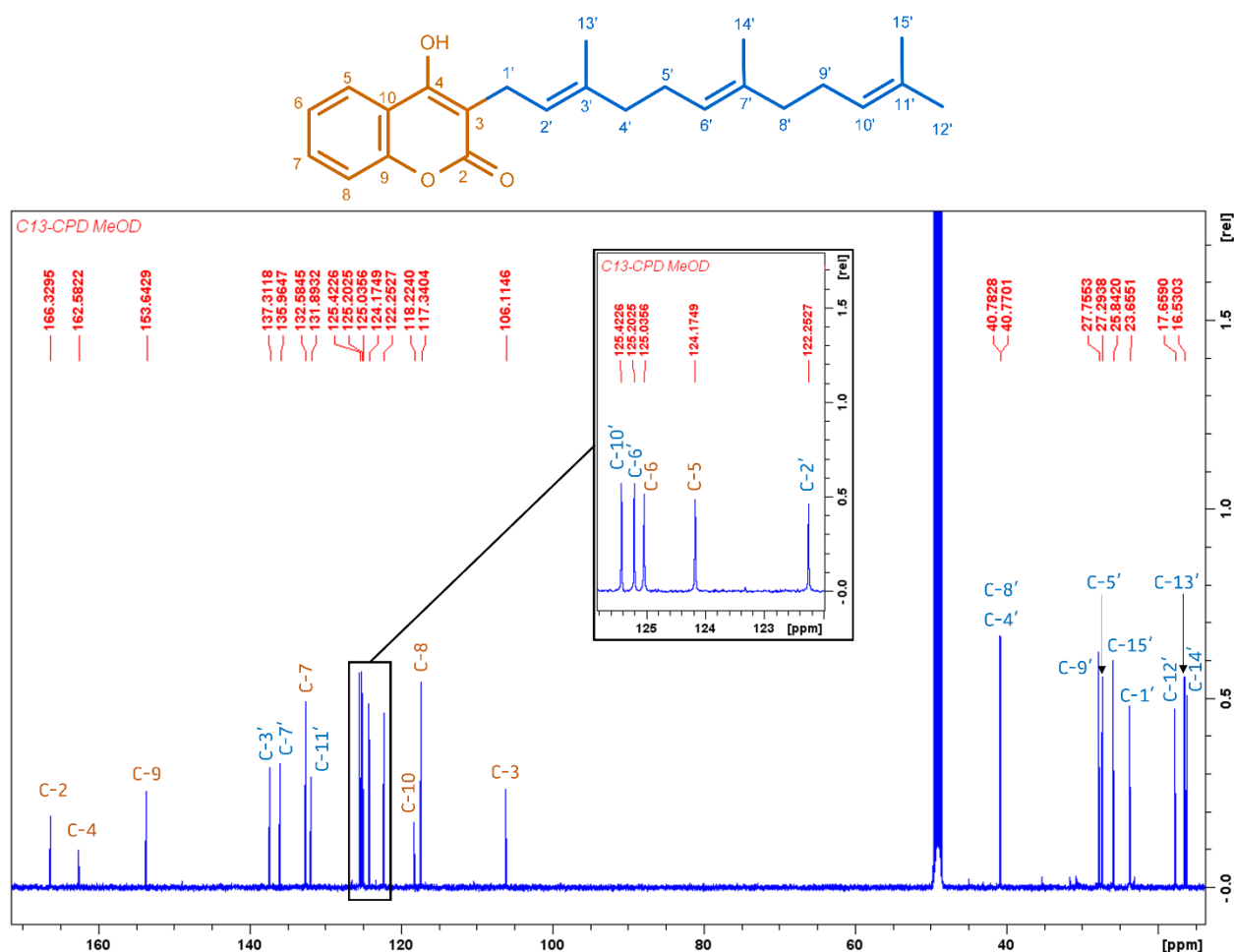


Figure 71 – Structure numérotée du féruléol **36** et spectre de RMN ^{13}C du composé F1-C (500 MHz, CD_3OD , 4096 scans)

Le spectre ^{13}C confirme également la présence de plusieurs carbones relativement déblindés, aux déplacements chimiques typique des carbones éthyléniques ou aromatiques entre 100 et 150 ppm (**Figure 71**). Grâce à l'analyse RMN 2D HSQC, **3 carbones éthyléniques** sont attribués aux protons éthyléniques identifiés plus haut : δ_{C} 125,42 (**C-10'**), 125,20 (**C-6'**), et 122,25 (**C-2'**), confirmant ainsi leur nature éthylénique (**Figure 72**).

Les spectres de RMN 2D COSY et HMBC ont permis d'établir les différentes corrélations entre les atomes et ainsi de reconstituer la chaîne sesquiterpénique (**Figure 73**). Les corrélations observées en COSY ont notamment permis de supposer que les alcènes étaient en configuration *trans* (*E*), la constante de couplage observée en RMN ^1H entre le proton éthylénique et le groupe méthyle étant plus proche de la valeur typique de cette configuration, 1,5 Hz, que de la valeur typique d'une configuration *cis* (*Z*), 2 Hz (**Figure 73-A.**). Cette configuration est cohérente avec ce qui est décrit dans la littérature²¹⁴ et pourra être confirmé par RMN NOESY. Quant aux corrélations en HMBC, elles ont permis de positionner les **3 carbones éthyléniques quaternaires** portant les groupements méthyles δ_{C} 137,31 (**C-3'**), 135,96 (**C-7'**) et 131,89 (**C-11'**) (**Figure 73-B.**).

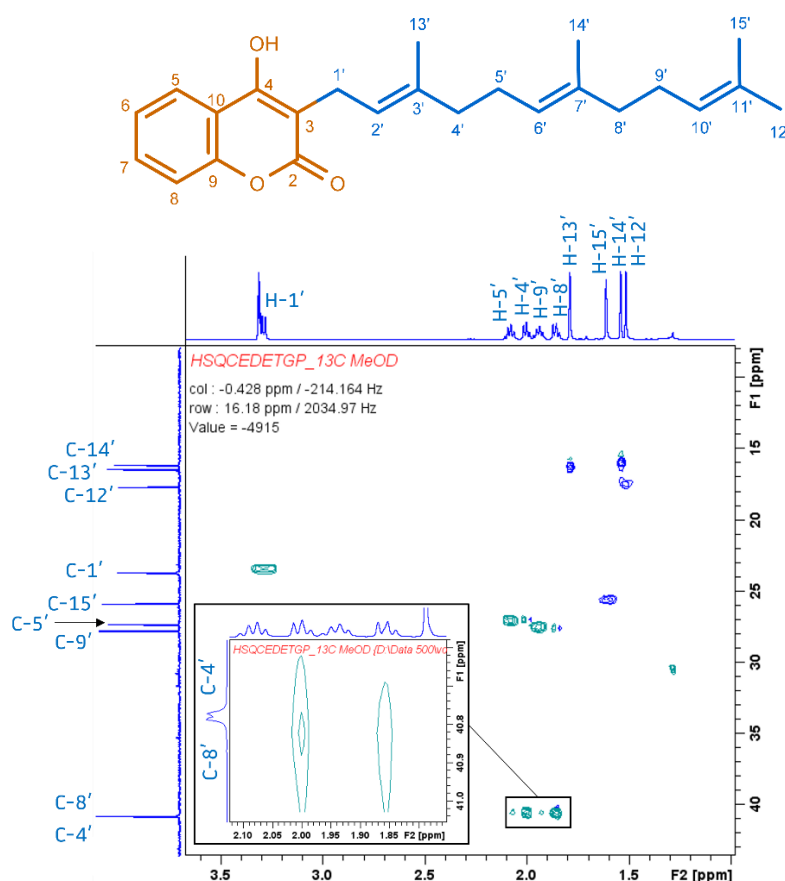


Figure 72 – Structure numérotée du féruléol **36** et spectre de RMN HSQC du composé F1-C (500 MHz, CD_3OD)

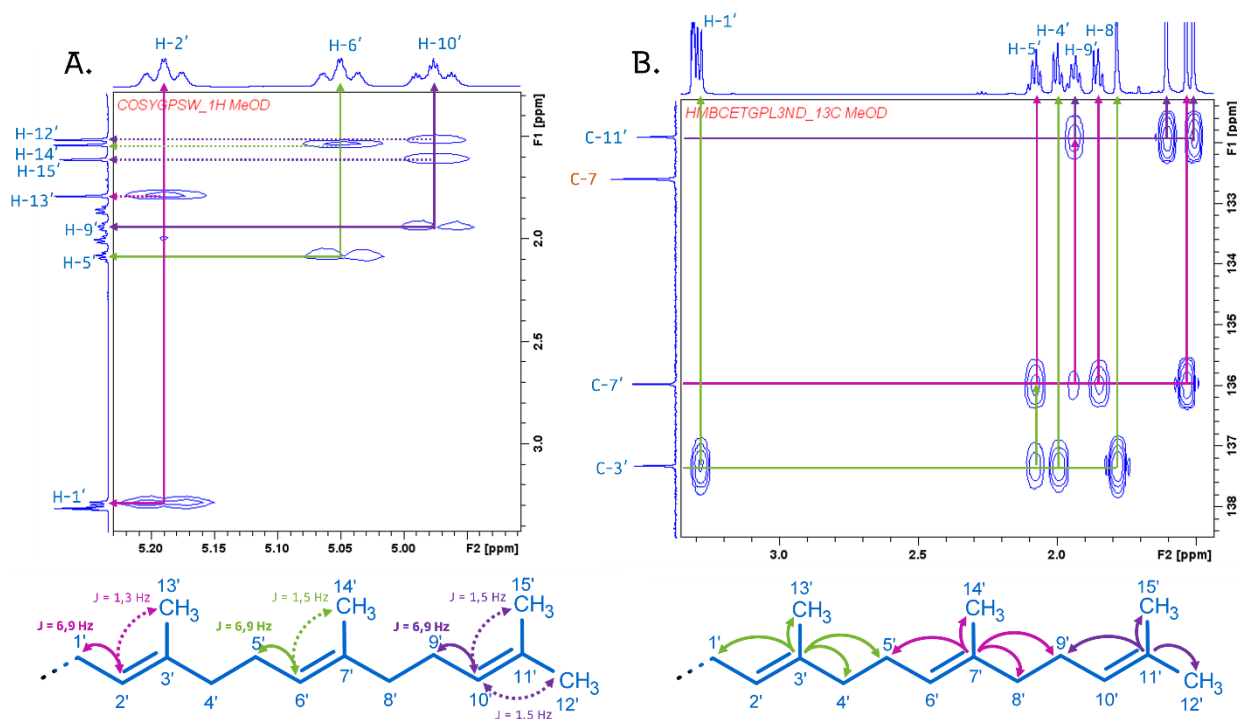


Figure 73 – Hypothèse de structures et corrélations observées pour la partie sesquiterpénique du composé F1-C en : **A.** COSY pour les protons éthyléniques ; **B.** HMBC pour les carbones « quaternaires »

2.1.2. Le noyau 4-hydroxycoumarine

Le spectre RMN ^1H indique la présence de **4 protons de type aromatique** aux δ_{H} 7,91 (1H, dd, $J = 8,1$ et $1,5$ Hz, **H-5**), 7,56 (1H, td, $J = 7,9$ et $1,6$ Hz, **H-7**), 7,32 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, **H-6**) et 7,29 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, **H-8**), reconnaissables à leur déplacement chimique entre 7 et 8 ppm (**Figure 70**).

Comme évoqué dans la partie sesquiterpénique, le spectre RMN ^{13}C présente plusieurs carbones assez déblindés, aux déplacements chimiques typique des carbones éthyléniques ou aromatiques entre 100 et 150 ppm (**Figure 71**). Parmi ces carbones, la RMN 2D HSQC permet de confirmer **4 carbones aromatiques** en les attribuant aux protons aromatiques identifiés plus haut : δ_{C} 132,58 (**C-7**), 125,04 (**C-6**), 124,17 (**C-5**), et 117,34 (**C-8**), permettant notamment de différencier le H-6 du H-8 (**Figure 74**).

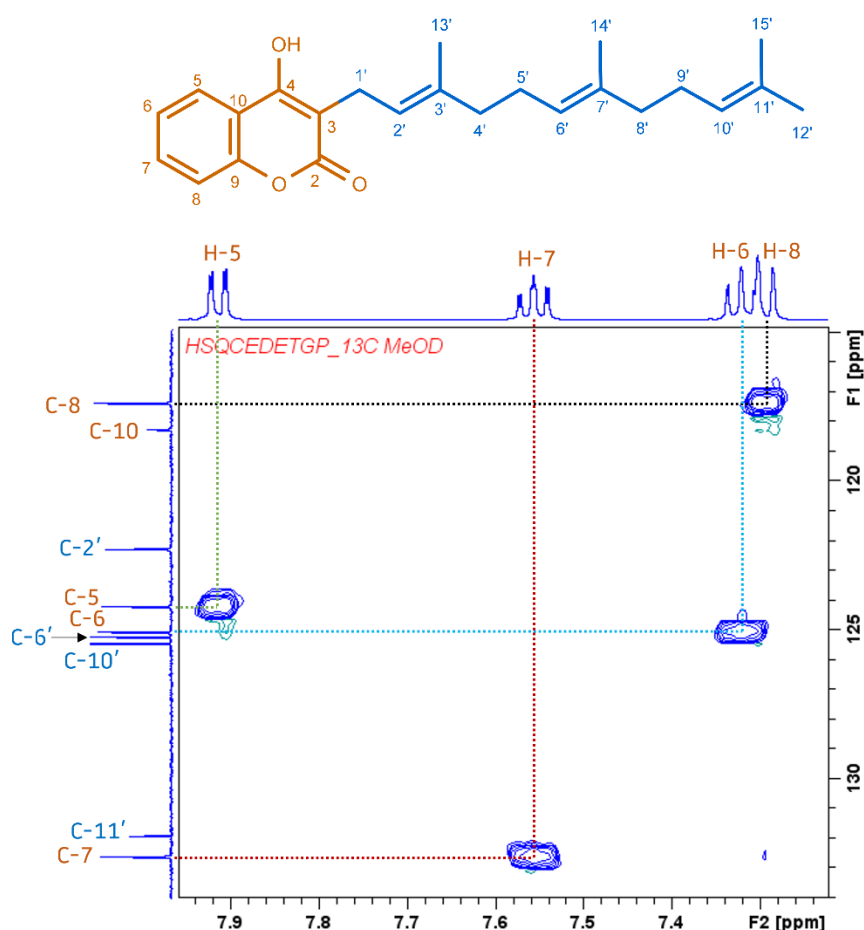


Figure 74 - Corrélations observées en HSQC pour les carbones et protons aromatiques du noyau 4-hydroxycoumarine du composé F1-C

Le spectre ^{13}C (**Figure 71**) présente également la présence de **3 carbones très déblindés**, aux déplacements chimiques entre 150 et 170 ppm pouvant correspondre à des acides carboxyliques ou

des esters, mais un peu trop bas pour être des aldéhydes ou des cétones (déplacements chimiques généralement entre 175 et 220 ppm) : δ_c 166,33 (**C-2**), 162,58 (**C-4**) et 153,64 (**C-9**).

Enfin, il présente **2 derniers carbones assez déblindés** avec des déplacements chimiques entre 100 et 120 ppm, soit légèrement en-dessous des déplacements chimiques attendus pour un cycle aromatique (déplacements chimiques généralement entre de 120 et 150 ppm) : δ_c 118,22 (**C-10**) et 106,11 (**C-3**) (**Figure 71**). D'après l'analyse RMN 2D HSQC, tous ces carbones sont quaternaires et ne sont liés à aucun hydrogène.

L'analyse en RMN 2D COSY a permis de positionner les **protons aromatiques** les uns par rapport aux autres (**Figure 75**), confirmé par les constantes de couplage des protons entre 7 et 9 Hz du spectre RMN ^1H (valeurs typiques d'une corrélation en 3J avec un proton aromatique en position *ortho* : entre 6 et 10 Hz). Le dédoublement des signaux en RMN ^1H a également permis de confirmer ces liaisons, avec des constantes de couplage autour de 1,5 Hz indiquant une corrélation en 3J avec un proton aromatique en position *meta* (valeurs typiques entre 1 et 3 Hz).

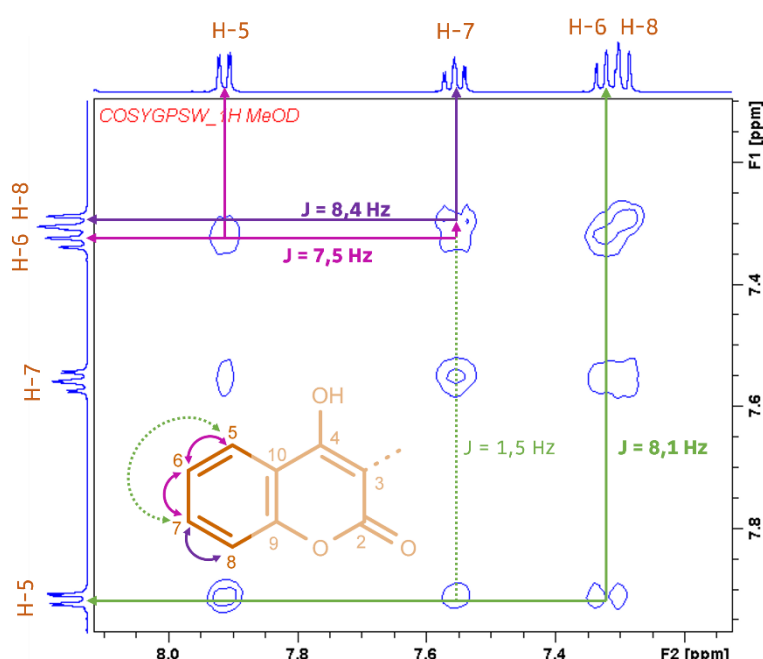


Figure 75 – Hypothèse de structure du noyau 4-hydroxycoumarine du composé F1-C et corrélations observées en **COSY** pour les protons aromatiques

L'analyse en RMN 2D HMBC a permis de confirmer et compléter le cycle aromatique avec deux carbones quaternaires par corrélation 3J et 4J (parfois 2J) avec les protons aromatiques : **C-9** et **C-10** (**Figure 76**). Si le déplacement chimique du **C-9** δ_c 153,64 reste dans la gamme des δ_c attendus (120 – 150 ppm), on remarque qu'il se détache des autres en RMN ^{13}C (**Figure 71**) : cela est dû à son implication dans une liaison avec un atome d'oxygène en plus de ses liaisons aromatiques.

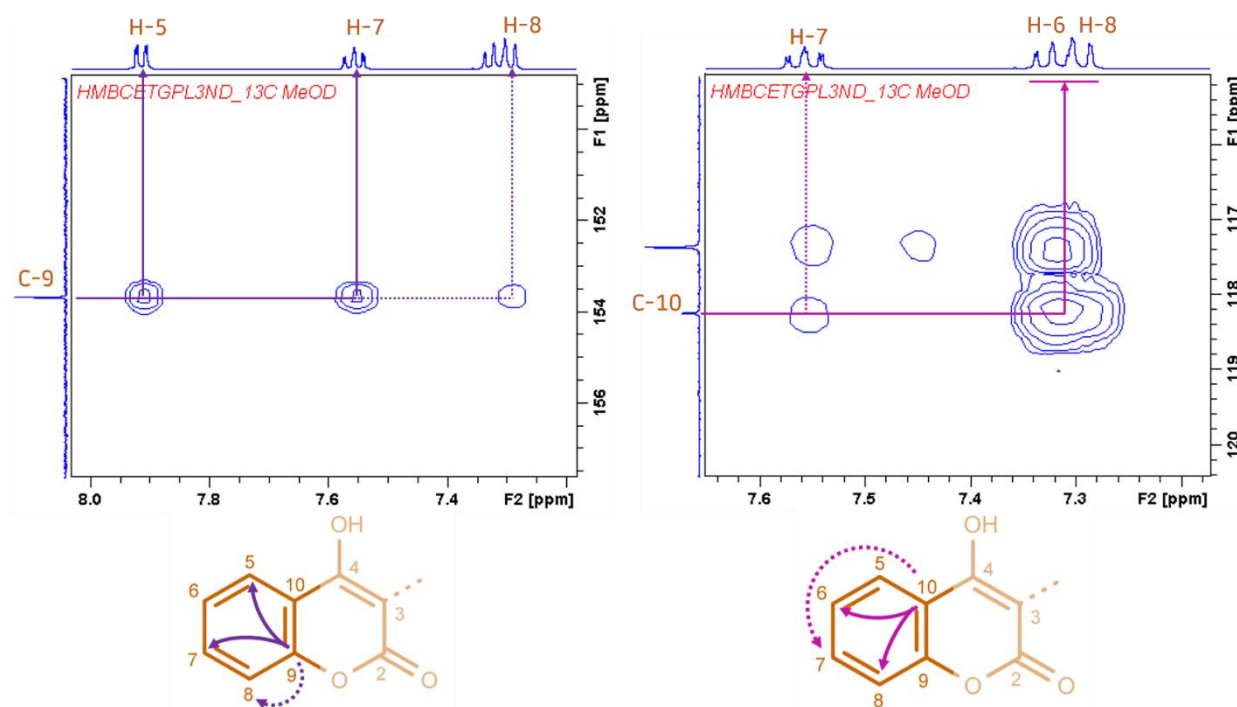


Figure 76 – Hypothèse de structure du noyau 4-hydroxycoumarine du composé F1-C et corrélations observées en **HMBC** pour les carbones aromatiques quaternaires **C-9** et **C-10**

Toujours en RMN 2D HMBC, la corrélation avec les protons aromatiques permet de déduire le reste du noyau 4-hydroxycoumarique et d'y relier la partie sesquiterpénique (**Figure 77**).

En effet, le carbone **C-4** corrèle en 3J avec le proton aromatique **H-5** mais également avec les protons **H-1'** de la chaîne sesquiterpénique (**Figure 77**, en violet). Son déplacement chimique δ_c 162,58, largement supérieur au déplacement chimique attendu d'un alcool (généralement entre 45 et 85 ppm), est dû au fait qu'il se trouve dans le cycle de type lactone du noyau coumarinique. Les protons de la chaîne sesquiterpénique permettent ensuite de compléter le noyau 4-hydroxycoumarine.

Le proton **H-2'** corrèle en 3J avec le carbone **C-3**, permettant de le relier au **H-1'** (**Figure 77**, en vert). Enfin, le proton **H-1'** corrèle en 3J avec le carbone **C-2**, permettant de le relier au **C-3** (**Figure 77**, en rose). Ce carbone est le plus fortement déblindé de la molécule avec un déplacement chimique δ_c 166,33 caractéristique d'un ester α, β insaturé (généralement entre 150 et 170 ppm).

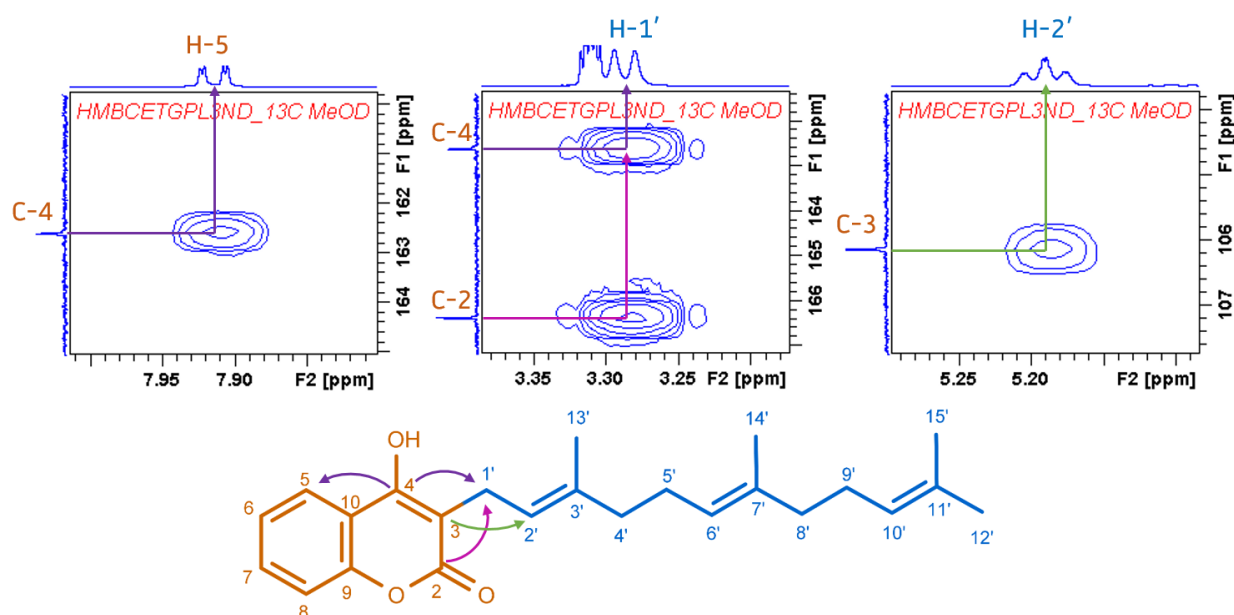


Figure 77 - Hypothèse de structure du composé F1-C et corrélations observées en **HMBC** pour les carbones **C-4**, **C-3** et **C-2** du cycle lactone dans le noyau 4-hydroxycoumarine

La fragmentation observée en HRMS vient également appuyer l'hypothèse de cette structure (**Chap.2-4.5.3**). En effet, on observe en ESI+ un fragment majoritaire de **m/z 175** correspondant au **noyau 4-hydroxycoumarine** tronqué de la chaîne sesquiterpénique par une fragmentation entre la position **1'** et **2'** (**Tableau 12**). Un autre fragment de **m/z 69** est observé, correspondant cette fois-ci à **l'extrémité de la chaîne sesquiterpénique** séparée du reste de la molécule par une fragmentation entre la position **8'** et **9'** (**Tableau 12**). Ces deux fragmentations ont également été observées dans l'étude de Lamnaouer *et al*, 1987²¹⁴.

D'après notre hypothèse de détermination structurale basée sur les analyses HRMS et RMN, le composé F1-C semble bien être du féruléol **36**, comme déjà supposé dans le **Chapitre 2** – Identification des ingrédients des remèdes et étude phytochimique des drogues végétales.

Le féruléol **36** ayant déjà été isolé et caractérisé en RMN en 1987 par Lamnaouer *et al*, 1987²¹⁴ à l'aide d'un spectromètre de 62,5 MHz dans du chloroforme deutéré CDCl₃, nous avons comparé les déplacements chimiques observés en RMN ¹H et ¹³C (**Tableau 22**). Malgré de légères différences pouvant être imparties à la différence de solvant et de puissance des spectromètres utilisés, les signaux sont très proches. Cette comparaison avec les données de la littérature scientifique vient donc appuyer notre hypothèse de structure : le composé F1-C semble bien être du féruléol **36**.

Tableau 22 – Comparaison des déplacements chimiques RMN 1H et 13C entre les travaux de Lamnaouer (1987)²¹⁴ sur le féruléol **36** (62,5 MHz, CDCl₃) et nos données expérimentales (500 MHz, CD₃OD)

N°	RMN ¹³ C		RMN ¹ H	
	Féruléol	F1-C	Féruléol ²¹⁴	F1-C
2	164,1	166,3		
3	103,7	106,1		
4	160,8	162,6		
5	122,7	124,2	7,840 ddd (J = 7,5 ; 1,6 ; 0,7)	7,91 dd (J = 8,1 ; 1,5)
6	123,7	125,0	7,270 ddd (J = 7,5 ; 7,2 ; 1,2)	7,32 t (J = 7,5)
7	131,3	132,6	7,488 ddd (J = 7,2 ; 8,6 ; 1,6)	7,56 td (J = 7,9 ; 1,6)
8	116,2	117,3	7,282 ddd (J = 8,6 ; 1,2 ; 0,7)	7,29 d (J = 8,4)
9	152,2	153,6		
10	116,0	118,2		
1'	23,4	23,7	3,437 d (J = 7,4)	3,28 d (J = 7,1)
2'	120,0	122,3	5,419 tq (J = 7,4 ; 1,3)	5,19 tq (J = 6,9 ; 1,3)
3'	140,7	137,3		
4'	39,9*	40,8	1,9 à 2,2 m	1,99 m
5'	26,0	27,3	1,9 à 2,2 m	2,08 m
6'	123,6	125,2	5,075 br t (J = 1,0)	5,05 tq (J = 6,9 ; 1,5)
7'	135,7	136,0		
8'	39,5*	40,8	1,9 à 2,2 m	1,85 m
9'	26,5	27,8	1,9 à 2,2 m	1,93 m
10'	124,2	125,4	5,075 br t (J = 1,0)	4,97 quint (J = 6,9 ; 1,5)
11'	131,0	131,9		
12'	17,4	17,7	1,661 br d (J = 1,0)*	1,51 s
13'	16,2	16,4	1,828 br d (J = 1,3)	1,79 s
14'	15,9	16,1	1,5976 br d (J = 1,0)	1,54 s
15'	25,4	25,8	1,572 br d (J = 1,0)*	1,61 s

*les déplacements chimiques peuvent être interchangés (dans la même colonne)

2.2. Le composé **F2-A** : l' ω -hydroxyférulénol ?

Le composé **F2-A** est sous la forme d'une huile translucide. L'analyse des extraits de gomme ammoniacale en masse haute résolution avec une ionisation par électrospray montre un protoné $[M+H]^+$ à m/z 383,2228 en mode d'ionisation positive (ESI+) et déprotoné $[M-H]^-$ à m/z 381,2086 en mode d'ionisation négative (ESI-), permettant la prédiction de la formule brute comme étant $C_{24}H_{30}O_4$ (**Tableau 12**). Nous avons supposé dans le **Chapitre 2** – Identification des ingrédients des remèdes et étude phytochimique des drogues végétales qu'il s'agissait de l' ω -hydroxyférulénol **43**, un dérivé hydroxylé du férulénol **36** décrit précédemment dans la section **2.1**, également décrit chez *F. communis*²¹⁴.

Nous allons ici vérifier cette hypothèse en déterminant la structure du composé **F2-A** sur la base de sa formule brute et d'analyses RMN 1D et 2D. Cette résolution structurale peut se découper en 2 parties, le **noyau 4-hydroxycoumarine** et la **chaîne sesquiterpénique** à la différence que cette dernière est **hydroxylée**.

Le noyau 4-hydroxycoumarine et une grande partie de la chaîne sesquiterpénique sont identiques à celui du férulénol **36** (**Tableau 23**). Seul le carbone d'un des méthyles en bout de chaîne disparaît au profit d'un signal à δ_c 69,0 ppm (**C-12'**) (**Tableau 23 données en rouge**), caractéristique d'un carbone portant un groupement hydroxyle (généralement entre 45 et 85 ppm). Le signal correspondant aux protons du méthyle disparaît également, et est remplacé par un signal δ_H 3,88 (2H, s, **H-12'**). L'environnement proche de cet hydroxyle voit également ses signaux influencés en RMN 1H et ^{13}C , notamment le méthyle restant en bout de chaîne (**C-15'**).

La fragmentation observée en HRMS vient appuyer l'hypothèse selon laquelle il s'agit d'un dérivé du férulénol **36** (**Chap.2-4.5.3**) : en ESI+ une fragmentation dans la source est observée avec un ion fils m/z 365,2131 dont la formule brute prédite correspond au férulénol **36** (**Tableau 12**). Lors de la fragmentation MS/MS, le fragment majoritaire de **m/z 175** correspondant au **noyau 4-hydroxycoumarine** est observé comme pour le férulénol **36** (**Tableau 12**).

Ces nombreuses similitudes avec le férulénol **36** à l'exception de l'extrémité de chaîne sesquiterpénique, la formule brute prédite à partir de l'HRMS et la résolution de la structure (non-détaillée ici), suggèrent qu'il s'agit bien d' ω -hydroxyférulénol **43** (**Figure 78**) comme déjà supposé dans le **Chapitre 2** – Identification des ingrédients des remèdes et étude phytochimique des drogues végétales.

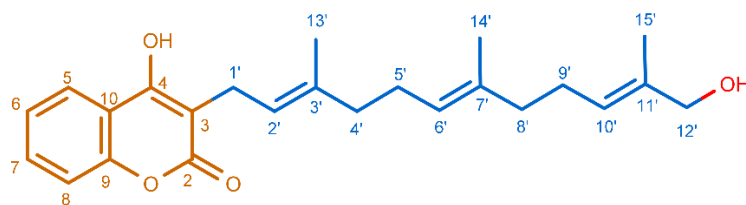


Figure 78 – Hypothèse de structure du composé F2-A : l'ω-hydroxyférulénol **43**

Tableau 23 - Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C entre nos données expérimentales pour le férulénol (F1-C) et l'ω-hydroxyférulénol (F2-A) (500 MHz, CD_3OD), les différences indiquées en **rouge** et **violet**, et les travaux de Lamnaouer (1987)²¹⁴ sur l'ω-hydroxyférulénol **43** (62,5 MHz, CDCl_3)

	RMN ^{13}C		RMN ^1H		
	F1-C	F2-A	F1-C	F2-A	ω-hydroxyférulénol ²¹⁴
2	166,3	169,2			
3	106,1	102,0			
4	162,6	174,6			
5	124,2	125,6	7,91 dd ($J = 8,1 ; 1,5$)	7,98 dd ($J = 8 ; 1,5$)	7,78 dd ($J = 7,9 ; 1,6$)
6	125,0	116,9	7,32 t ($J = 7,5$)	7,17 m	7,27 ddd ($J = 7,9 ; 7,3 ; 1,1$)
7	132,6	131,2	7,56 td ($J = 7,9 ; 1,6$)	7,41 td ($J = 8 ; 1,5$)	7,51 ddd ($J = 7,3 ; 8,3 ; 1,6$)
8	117,3	123,8	7,29 d ($J = 8,4$)	7,17 m	7,30 dd ($J = 8,3 ; 1,1$)
9	153,6	154,6			
10	118,2	123,7			
1'	23,7	23,8	3,28 d ($J = 7,1$)	3,24 d ($J = 6,7$)	3,42 d ($J = 7,0$)
2'	122,3	125,5	5,19 tq ($J = 6,9 ; 1,3$)	5,29 tq ($J = 6,9 ; 1,3$)	5,39 br t ($J = 7,10$)
3'	137,3	134,6			
4'	40,8	41,0	1,99 m	1,90 m	2,0 à 2,2 m
5'	27,3	27,7	2,08 m	2,06 m	2,0 à 2,2 m
6'	125,2	125,9	5,05 tq ($J = 6,9 ; 1,5$)	5,10 td ($J = 7,2 ; 1,4$)	5,07 m
7'	136,0	135,5			
8'	40,8	40,5	1,85 m	1,90 m	2,0 à 2,2 m
9'	27,8	27,3	1,93 m	2,06 m	2,0 à 2,2 m
10'	125,4	126,7	4,97 quint ($J = 6,9 ; 1,5$)	5,33 tq ($J = 7 ; 1,4$)	5,29 br tq ($J = 7,2 ; 1,3$)
11'	131,9	135,7			
12'	17,7	69,0	1,51 s	3,88 s	4,11 br s
13'	16,4	16,5	1,79 s	1,77 s	1,835 br s
14'	16,1	16,1	1,54 s	1,56 s	1,61 br d ($J = 0,9$)
15'	25,8	13,7	1,61 s	1,59 s	1,79 br d ($J = 1,3$)

Dans la littérature, on décrit les signaux RMN ^1H très proches entre le féruléol **36** et l' ω -hydroxyféruléol **43**, à l'exception de la disparition des signaux d'un groupement méthyle et de l'apparition d'un signal δ_{H} 4,11 (2H, br), attribué au CH_2 du groupement $-\text{CH}_2\text{OH}$ en bout de chaîne²¹⁴ (**Tableau 23**). Les résultats de cette comparaison par Lamnaouer *et al* (1987)²¹⁴ sont très similaires à ceux obtenus pour les composés analysés dans nos conditions expérimentales : quelques différences sont observées entre la littérature et nos données mais peuvent être imparties à la différence de solvant et de puissance des spectromètres utilisés. Cette similitude avec ce qui est décrit dans la littérature vient donc appuyer notre hypothèse structurale : le composé F2-A semble donc bien être le dérivé hydroxyle du féruléol **36**, l' ω -hydroxyféruléol **43**.

On remarque que des signaux autres que ceux dans l'environnement proche de l'hydroxyle en bout de chaîne ont également été décalés. En effet, certains signaux du noyau 4-hydroxycoumarine (en particulier le carbone **C-4** portant le groupement hydroxyle) ont subi un décalage en RMN ^1H et ^{13}C , les distinguant de ceux observés pour le féruléol **36** (**Tableau 23 données en violet**). Après avoir re-isolé le composé F2-A et réalisé les mêmes analyses, nous avons observé encore d'autres décalages dans les déplacements chimiques pour des atomes du noyau 4-hydroxycoumarine mais aussi de la chaîne sesquiterpénique. Les déterminations structurales réalisées ont toutefois abouti à la même structure, il ne semble donc pas qu'il s'agisse de différents dérivés.

Ces décalages pourraient s'expliquer par la présence de traces de solvants ou d'acide dans l'échantillon, due à un mauvais conditionnement du composé isolé et à des conditions de purifications différentes (solvants et pH utilisés).

Ils pourraient également s'expliquer par une conformation différente de la molécule, par exemple influencée par la température : la chaîne sesquiterpénique pourrait alors être plus ou moins repliée sur elle-même et permettre à l'hydroxyle terminal d'interagir avec l'un des différents oxygènes du noyau 4-hydroxycoumarine. Une analyse en NOESY permettrait de compléter la détermination structurale et comparer ces composés *a priori* identiques malgré quelques différences sur certains signaux.

Il est également à noter qu'une dégradation du composé a été observée sous certaines conditions, encore non déterminées mais qui pourraient être liées au pH. Les différentes méthodes de purification faisant appel ou non à différents acides, concentrés lors du séchage du composé, pourraient alors causer une modification voire une dégradation partielle du composé et expliquer ces différences en RMN. La stabilité du composé, et de l'ensemble des composés isolés, devra donc être déterminée à différents pH ainsi que dans les différents solvants les plus utilisés.

2.3. Le composé F2-E : une nouvelle coumarine sesquiterpénique, le coumaryl 12-féruléol ?

Le composé F2-E a été isolé sous la forme d'une huile translucide. L'analyse des extraits de gomme ammoniacale en masse haute résolution avec une ionisation par électrospray montre un ion protoné $[M+H]^+$ à m/z 529,2594 en mode d'ionisation positive (ESI+) et déprotoné $[M-H]^-$ à m/z 527,2443 en mode d'ionisation négative (ESI-), permettant la prédiction de la formule brute comme étant $C_{33}H_{36}O_6$ (**Tableau 12**). Aucun composé correspondant à cette formule brute n'a été décrit dans le genre *Ferula* à notre connaissance. Néanmoins, les fragments observés en HRMS nous ont amené à penser qu'il pouvait s'agir d'un autre dérivé du féruléol **36**.

En effet, en ESI + une fragmentation dans la source donne un ion fils à m/z 365,2121 dont la formule brute prédite correspond au féruléol **36** et la fragmentation MS/MS donne un fragment majoritaire à m/z 175,0393, indiquant la présence d'un noyau coumarine (**Tableau 12**). De plus, la plupart des fragments les plus importants en MS/MS sont communs avec la fragmentation de l' ω -hydroxyféruléol **43**, que ce soit en ESI + ou en ESI -.

Nous allons donc vérifier cette hypothèse en déterminant la structure du composé F2-E sur la base de sa formule brute et d'analyses RMN 1D et 2D. Cette résolution structurale peut se découper en 2 parties : la structure initiale comprenant le noyau 4-hydroxycoumarine avec la chaîne sesquiterpénique, et le substitut en bout de chaîne sesquiterpénique.

2.3.1. Le précurseur supposé : le féruléol

Lors de la détermination structurale (non-détaillée ici pour cette partie), nous avons effectivement retrouvé la structure du féruléol **36**, qui plus est avec des déplacements chimiques extrêmement proches de ceux observés pour l' ω -hydroxyféruléol **43** (**Tableau 24**).

Le composé F2-E est donc bien un dérivé du féruléol **36**, avec un substitut rattaché en fin de chaîne sesquiterpénique par une liaison impliquant un atome d'oxygène : le carbone C-12' a un déplacement chimique δ_c 71,1 et les déplacements chimiques des carbones d'un éther sont généralement entre 55 et 85 ppm (**Figure 79** et **Tableau 24**). De plus, seuls les signaux des positions 10', 11', 12' et 15' sont impactés par rapport aux signaux du féruléol **36**, confirmant que la substitution se trouve en bout de chaîne sesquiterpénique (**Tableau 24 données en rouge**). Cette hypothèse est appuyée par le fragment majoritaire MS2 à m/z 381 obtenu en ESI- (**Tableau 12**), correspondant à une fragmentation après l'atome d'oxygène (**Figure 79**).

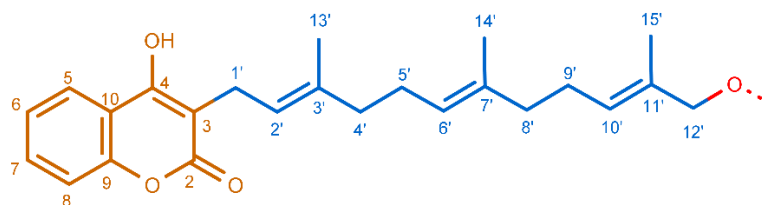


Figure 79 - Hypothèse de structure de la partie correspondant au féruléol dans le composé F2-E

Tableau 24 - Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C entre les données expérimentales de l' ω -hydroxyféruléol (F2-A) et du dérivé du féruléol (F2-E) (500 MHz, CD_3OD), les différences sont indiquées en rouge

	RMN ^{13}C		RMN ^1H	
	F2-A	F2-E	F2-A	F2-E
2	169,2	169,1		
3	102,0	102,1		
4	174,6	174,3		
5	125,6	125,7	7,98 dd ($J = 8 ; 1,5$)	7,99 dd ($J = 8,9 ; 1,7$)
6	116,9	123,8	7,17 m	7,16 m
7	131,2	131,2	7,41 td ($J = 8 ; 1,5$)	7,39 td ($J = 8 ; 1,7$)
8	123,8	116,9	7,17 m	7,16 m
9	154,6	154,5		
10	123,7	123,6		
1'	23,8	23,8	3,24 d ($J = 6,7$)	3,24 d ($J = 6,7$)
2'	125,5	125,5	5,29 tq ($J = 6,9 ; 1,3$)	5,27 td ($J = 6,7 ; 0,96$)
3'	134,6	134,7		
4'	41,0	40,9	1,90 m	1,92 m
5'	27,7	27,7	2,06 m	2,03 m
6'	125,9	126,1	5,10 td ($J = 7,2 ; 1,4$)	5,09 td ($J = 6,9 ; 0,96$)
7'	135,5	135,1		
8'	40,5	40,1	1,90 m	1,95 m
9'	27,3	27,3	2,06 m	2,07 m
10'	126,7	130,3	5,33 tq ($J = 7 ; 1,4$)	5,41 td ($J = 7,1 ; 0,96$)
11'	135,7	131,3		
12'	69,0	71,1	3,88 s	4,52 s
13'	16,5	16,5	1,77 s	1,74 s
14'	16,1	16,1	1,56 s	1,55 s
15'	13,7	14,1	1,59 s	1,63 s

2.3.2. Le substitut en bout de chaîne sesquiterpénique : l'acide *o*-coumarique

La poursuite de la résolution structurale a permis de déterminer que le substitut en bout de chaîne sesquiterpénique était un ester d'acide *o*-coumarique (**Figure 80**).

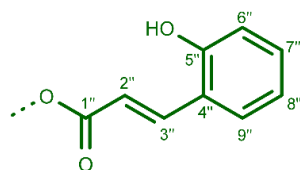


Figure 80 - Hypothèse de structure du substitut en bout de chaîne sesquiterpénique du composé F2-E : l'ester d'acide *o*-coumarique

En RMN ^1H , on observe **6 protons** assez déblindés avec des déplacements chimiques entre 6,5 et 8 ppm pouvant correspondre à des protons **éthyléniques ou aromatiques** : δ_{H} 7,97 (1H, d, $J = 16,6$ Hz, **H-3''**), 7,46 (1H, dd, $J = 8$ et 1,5 Hz, **H-9''**), 7,18 (1H, m, **H-7''**), 6,85 (1H, m, **H-6''**), 6,82 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, **H-8''**) et 6,59 (1H, d, $J = 16,1$ Hz, **H-2''**) (**Figure 81**).

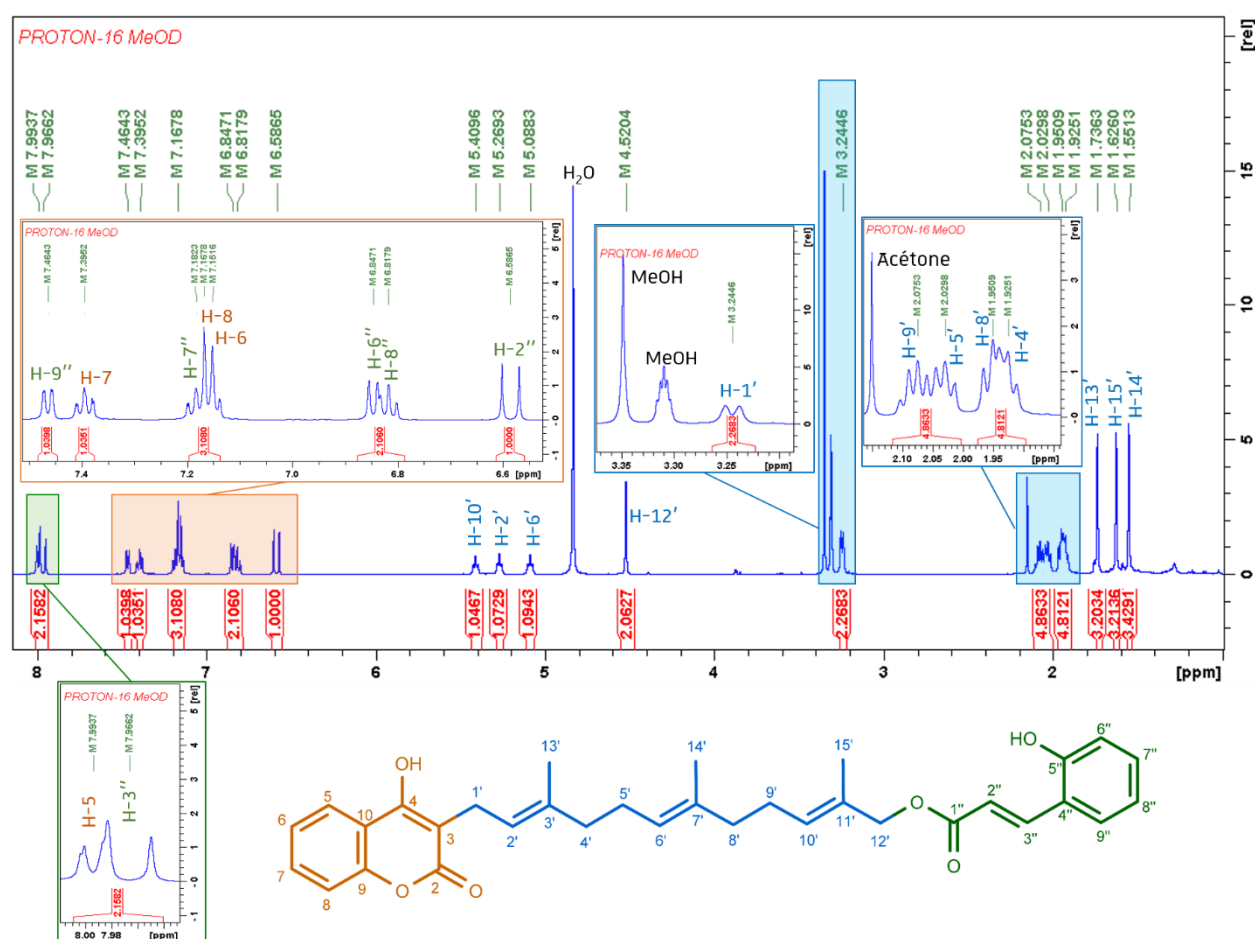


Figure 81 – Spectre de RMN ^1H et hypothèse de structure numérotée du composé F2-E (500 MHz, CD_3OD , 16 scans)

L'analyse en RMN ^{13}C vient confirmer cela en distinguant **7 carbones** pouvant être **aromatiques** comme **éthyléniques** avec des déplacements chimiques entre 110 et 150 ppm : δ_c 142,4 (**C-3''**), 132,6 (**C-7''**), 130,1 (**C-9''**), 122,6 (**C-4''**), 120,7 (**C-8''**), 118,3 (**C-2''**) et 117,1 (**C-6''**) (**Figure 82**). L'analyse RMN 2D HSQC d'attribuer 6 d'entre eux aux protons décrits plus haut, le carbone **C-4''** étant le seul quaternaire. Enfin, **2 carbones quaternaires particulièrement déblindés** sont détectés : δ_c 169,5 (**C-1''**) et 158,3 (**C-5''**).

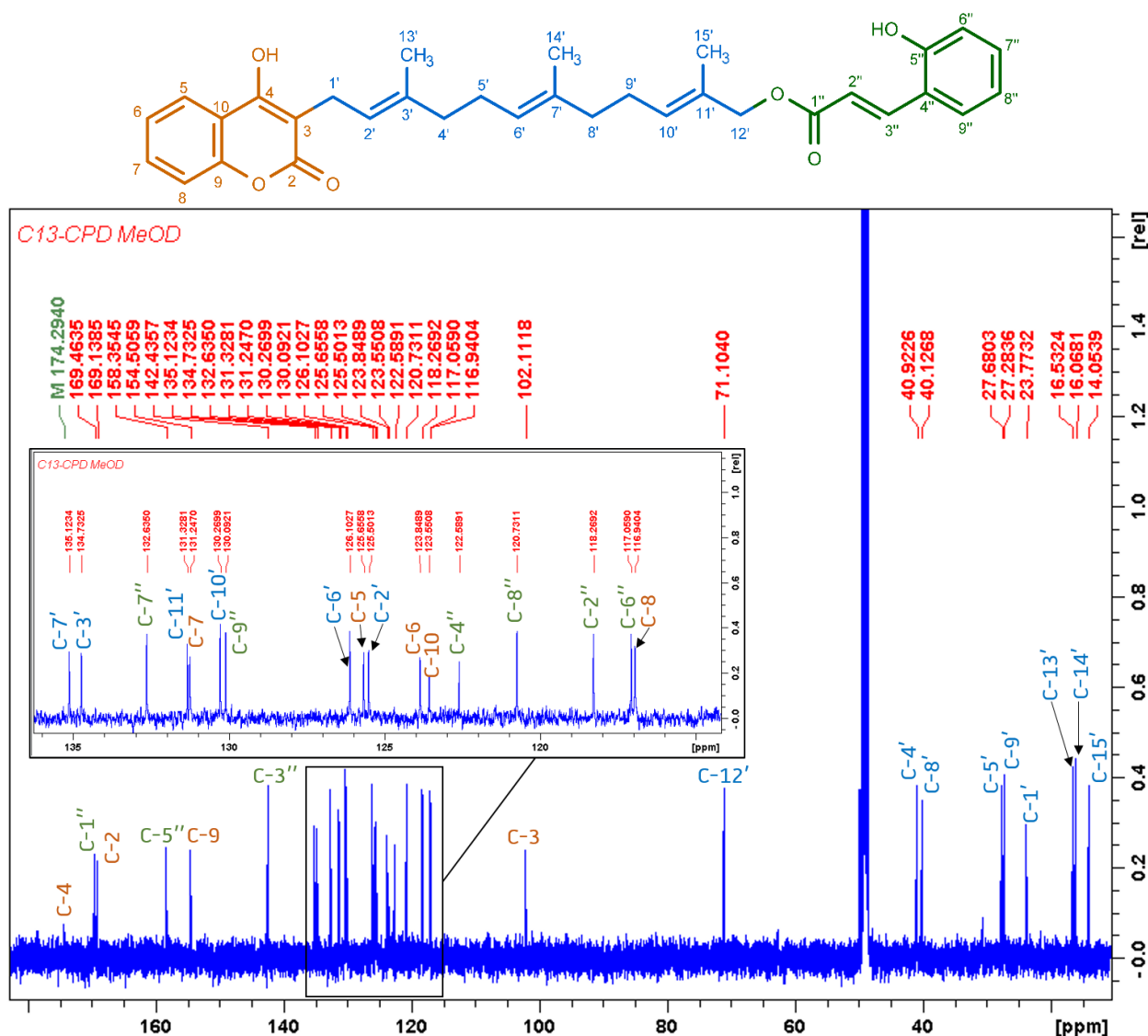


Figure 82 – Hypothèse de structure numérotée du et spectre de RMN ^{13}C du composé F2-E (500 MHz, CD_3OD , 4096 scans)

Les corrélations observées en RMN 2D COSY ainsi que les constantes de couplage en RMN ^1H permettent de distinguer **4 protons aromatiques** et **2 protons éthyléniques** et de les positionner les uns par rapport aux autres (**Figure 83**).

Les protons aromatiques ont des constantes de couplage autour de 8 Hz typiques d'une corrélation en 3J avec un proton aromatique en position *ortho* (valeur attendue entre 6 et 10 Hz) (**Figure 83** données en **violet** et **rose**). Le dédoublement du proton H-9'' en RMN 1H a permis de confirmer ces liaisons, avec une constante de couplage de 1,5 Hz avec le H-7'' : cette valeur de constante de couplage indique une corrélation en 3J entre des protons aromatiques en position *meta* l'un par rapport à l'autre (valeur attendue entre 1 et 3 Hz) (**Figure 83** données en **violet**).

Les deux protons éthyléniques ont quant à eux une constante de couplage de 16,1 Hz, typique d'une liaison éthylénique en conformation *E* (valeur attendue entre 12 et 18 Hz) (**Figure 83** données en **vert**).

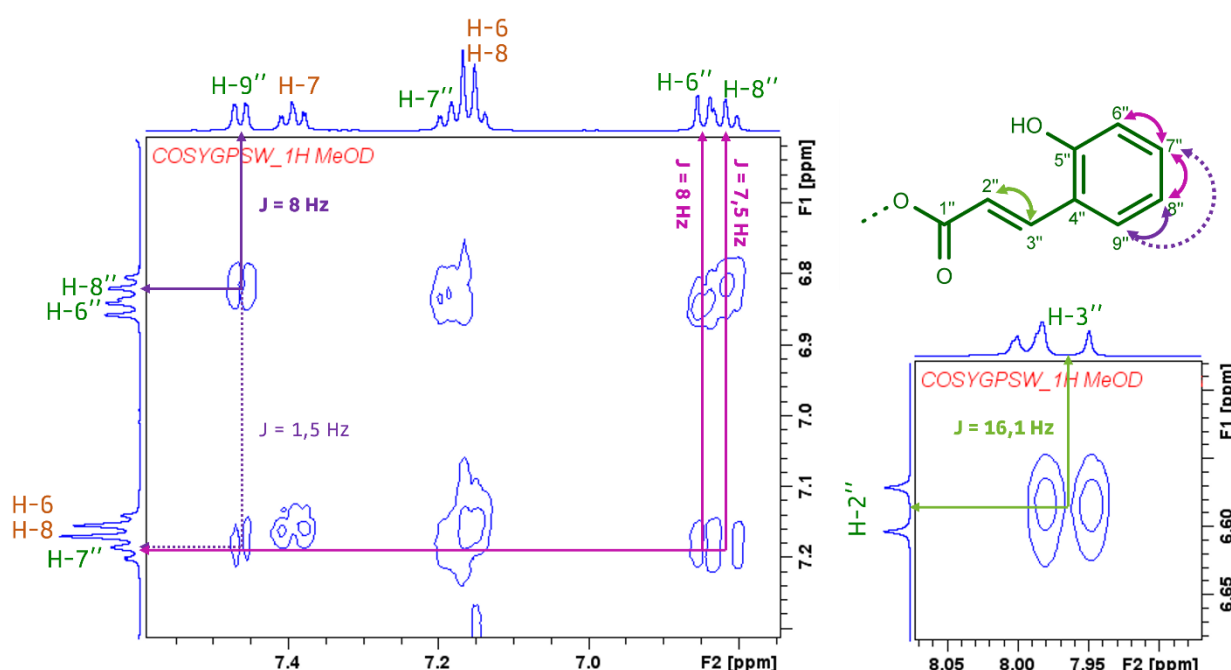


Figure 83 - Hypothèse de structure de l'ester d'acide o-coumarique du composé F2-E et corrélations observées en COSY pour les protons aromatiques en **rose** et **violet** et le proton éthylénique en **vert**

Les corrélations observées en RMN 2D HMBC viennent confirmer les positions ces carbones aromatiques mais permettent également de compléter le cycle et de le relier aux 2 protons éthyléniques (**Figure 84**).

En effet le **C-4''** corrèle avec les protons aromatiques **H-8''** et **H-6''** mais également avec le proton éthyléniques **H-2''** (**Figure 84** données en **violet**). Quant au carbone **C-5''**, il corrèle avec les protons aromatiques **H-7''** et **H-9''** ainsi qu'avec le proton éthylénique H-3'' (**Figure 84** données en **rose**).

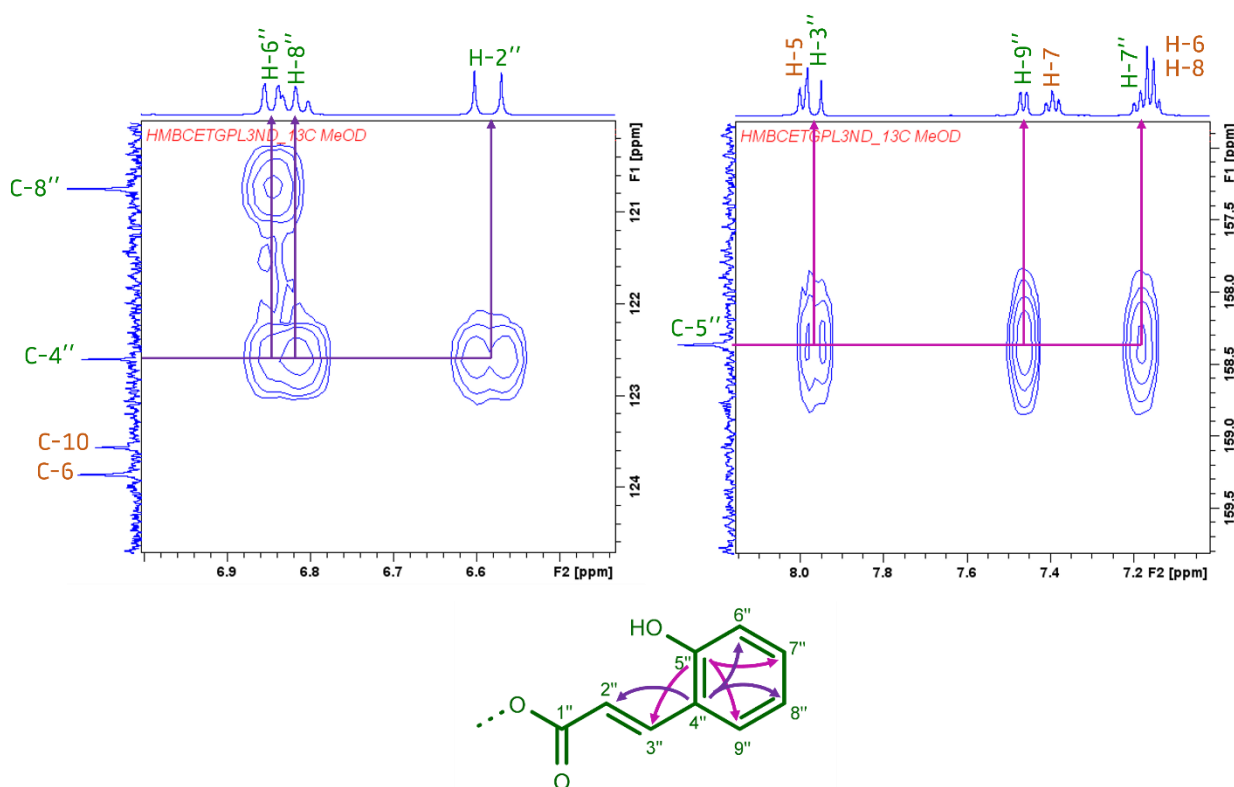


Figure 84 - Hypothèse de structure de l'ester d'acide *o*-coumarique du composé F2-E et corrélations observées en **HMBC** pour les protons aromatiques **C-4''** et **C-5''**

Enfin, les signaux observés en RMN HMBC permettent de relier le carbone de l'ester **C-1''** au carbone **C-2''** au travers de la corrélation en 3J avec le proton **H-3''** et la corrélation en 2J avec le proton **H-2''** (**Figure 85**). Le spectre RMN HMBC permet également de relier l'ester d'acide *o*-coumarique au reste de la molécule et plus précisément en bout de chaîne sesquiterpénique, avec une corrélation 3J entre le **C-1''** et les **H-12'** (**Figure 85**).

Le composé F2-E semble donc bien être un dérivé du féruléol **36**, avec un ester d'acide *o*-coumarique en bout de chaîne sesquiterpénique, pouvant alors être nommé coumaryl 12-féruléol.

L'acide *o*-coumarique ayant déjà été caractérisé en RMN dans le méthanol deutéré par Pham *et al* en 2018²³², nous avons comparé les déplacements chimiques observés en RMN 1H et ^{13}C (**Tableau 25**). Les signaux sont très proches sauf concernant le carbone C-1'' : le déplacement chimique a certainement été décalé du fait qu'il s'agisse d'un ester d'acide et non pas d'un acide carboxylique. Cette comparaison vient appuyer notre hypothèse de structure : le composé F2-E semble donc bien être un dérivé du féruléol **36** avec un ester d'acide *o*-coumarique comme substitut en bout de chaîne sesquiterpénique.

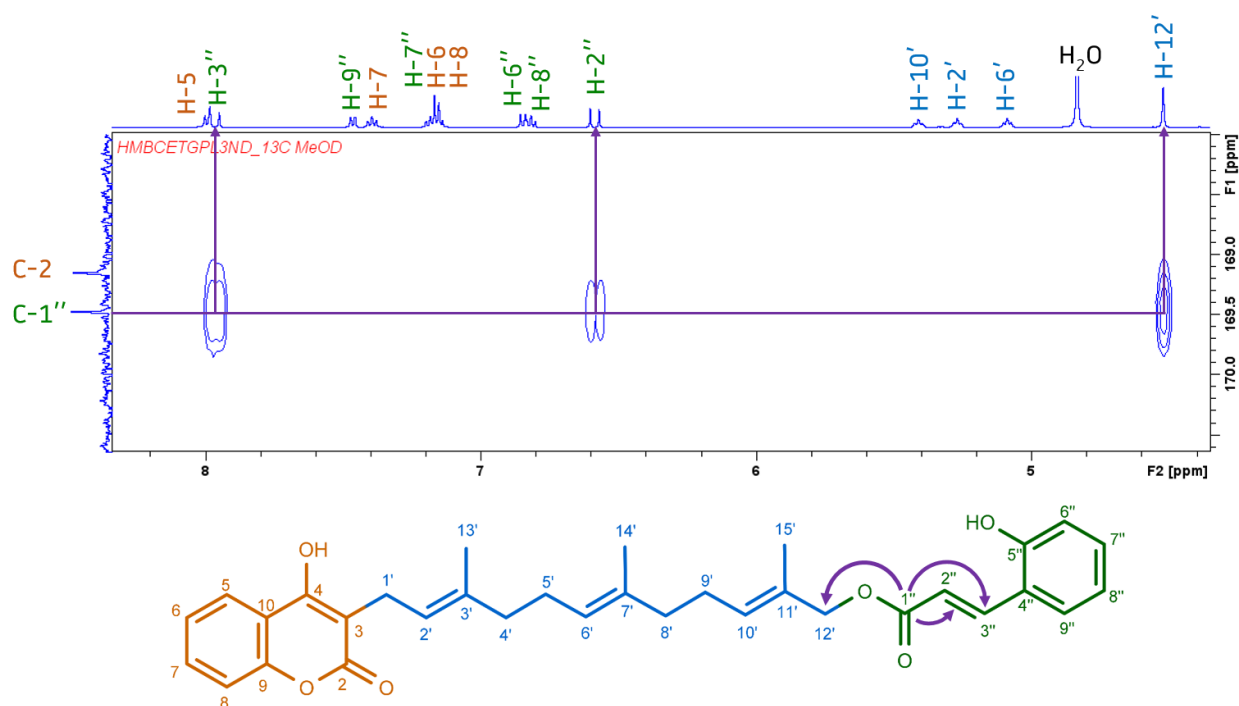


Figure 85 - Hypothèse de structure du composé F2-E, dérivé du féruléol, et corrélations observées en HMBC pour le carbone **C-1''** de l'ester reliant l'acide o-coumarique au féruléol

Tableau 25 - Comparaison des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C entre les travaux de Pham et al²³² en 2018 sur l'acide o-coumarique (125 MHz, CD_3OD) et les données expérimentales de l'ester d'acide o-coumarique du composé F2-E (500 MHz, CD_3OD), les différences sont indiquées en **rouge**

	RMN ^{13}C		RMN ^1H	
	Acide o-coumarinique	F2-E	Acide o-coumarinique	F2-E
1''	171,3	169,5		
2''	117,0	118,3	7,99 d ($J = 16,5$)	6,59 d ($J = 16,1$)
3''	142,5	142,4	6,57 d ($J = 16,5$)	7,97 d ($J = 16,6$)
4''	122,7	122,6		
5''	158,2	158,3		
6''	118,6	117,1	6,86 d ($J = 7,5$)	6,85 m
7''	132,5	132,6	7,21 br d ($J = 9,0$)	7,18 m
8''	120,8	120,7	6,83 br d	6,82 m
9''	130,0	130,1	7,49 br d ($J = 8,5$)	7,46 dd ($J = 8$ et $1,5$)

2.3.3. Activité antibactérienne du composé F2-E coumaryl 12-féruléol

Lors d'un premier isolement, une quantité suffisante de **F2-E coumaryl 12-féruléol** a été obtenue pour réaliser un test antibactérien en triplicat : les CMI mesurées sont résumées dans le **Tableau 26**.

Tableau 26 - Activité antibactérienne du composé F2-E ($n = 3$), exprimée en moyenne des CMI +/- l'écart-type ($\mu\text{g/mL}$ et μM) et comparée à celle de l'érythromycine (témoin positif, $n = 3$)

Souches bactériennes	F2-E		Erythromycine	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
<i>S. aureus</i> HG001	1,30 +/- 0,56	2,47 +/- 1,07	0,98 +/- 0,0	1,33 +/- 0,0
<i>S. epidermidis</i> ATCC35983	1,95 +/- 0,0	3,70 +/- 0,0	0,98 +/- 0,0	1,33 +/- 0,0
<i>S. epidermidis</i> HUS	0,97 +/- 0,0	1,85 +/- 0,0	> 500	> 681
<i>S. hominis</i> HUS	1,63 +/- 0,56	3,08 +/- 1,07	0,98 +/- 0,0	1,33 +/- 0,0
<i>S. haemolyticus</i> HUS	1,30 +/- 0,56	2,47 +/- 1,07	15,62 +/- 13,53	21,29 +/- 18,44
<i>C. striatum</i> HUS	3,26 +/- 1,13	6,16 +/- 2,14	> 500	> 681
<i>E. coli</i> MG1655	> 125	> 237	62,5 +/- 0,0	85,16 +/- 0,0

L'activité de ce composé est particulièrement marquée, avec une CMI du même ordre de grandeur que le témoin positif utilisé, l'érythromycine. Néanmoins nous souhaitons remesurer cette activité en même temps que le féruléol **36** et l' ω -hydroxyféruléol **43**, afin de pouvoir réaliser une comparaison stricte de l'activité entre ces 3 dérivés. C'est pourquoi les deux autres molécules ne seront testées que lorsqu'une quantité suffisante des 3 composés auront été obtenues.

L'isolement d'une quantité suffisante pour permettre des tests antibactériens *in vitro* a été initié par Megi Gjokolaj, stagiaire en deuxième année de Master, et est actuellement continué par Capucine Braillon, doctorante en première année dans l'UMR 7200 sous la direction de Catherine Vonthron-Senecheau et l'encadrement de Sergio Ortiz.

3. Conclusion sur le fractionnement bioguidé d'AMM01 et ses composés antibactériens

Le fractionnement bioguidé par l'activité antibactérienne des extraits de la gomme ammoniacque traditionnelle AMM01 a mis évidence la présence de deux fractions actives, donc au moins deux composés antibactériens. L'isolement et l'identification du composé majoritaire de chacune de ces 2 fractions a permis d'appuyer l'identification botanique d'AMM01 mais aussi d'expliquer son activité antibactérienne.

En effet, la composition chimique de la fêrûle commune ou fenouil géant *F. communis*, la plante que nous supposons être à l'origine d'AMM01, a déjà été décrite^{177,214,219}. Parmi ces molécules on retrouve le féruléol **36** (**F1-C**) et l' ω -hydroxyféruléol **43** (**F2-A**), les deux composés identifiés putativement dans le **Chapitre 2** – Identification des ingrédients des remèdes et étude phytochimique des drogues végétales nous ayant amenés à supposer qu'AMM01 provenait de cette espèce. Leur isolement a permis de confirmer leur identité en déterminant leur structure, et donc d'appuyer l'hypothèse de *F. communis* comme origine botanique. Toutefois la gomme ammoniacque dite « africaine » n'est pas considérée comme produite par cette espèce spécifiquement, bien que la gomme ammoniacque soit décrite par certains comme la gomme-résine des espèces du genre *Ferula* en général, sans distinction d'espèces (**Chap.1.1.4.2**). Si la gomme-résine AMM01 n'est pas à proprement parler de la gomme ammoniacque, elle s'en approche grandement car *a priori* produite par une espèce du même genre.

La composition de l'espèce *F. communis* a également été étudiée pour ses propriétés antibactériennes. Il a été établi que cette activité était principalement due à des dérivés sesquiterpéniques, comme pour les autres espèces du genre *Ferula* étudiées. Dans le cas de *F. communis*, ces dérivés sesquiterpéniques antibactériens appartiennent majoritairement à 3 familles, dont les coumarines sesquiterpéniques²¹⁹ avec des 4-hydroxycoumarines sesquiterpéniques^{233,234} comme le féruléol **36** (composé majoritaire de la fraction **F1-C**) et l' ω -hydroxyféruléol **43** (composé majoritaire de la fraction **F2-A**). Dans la littérature, le féruléol **36** a montré une activité antibactérienne sur plusieurs autres souches Gram + dont *S. aureus* avec une CMI de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ¹⁷⁷ à 0,63 $\mu\text{g/mL}$ ²³³ selon les études. Avec certains de ses dérivés (**Figure 86**) dont l' ω -hydroxyféruléol **43**, il a également montré une activité antibactérienne sur différentes souches de *Mycobacterium* avec des CMI entre 1,25 et 5 $\mu\text{g/mL}$ ^{233,234}. La présence en majorité de ces deux composés dans les fractions antibactériennes pourrait donc en expliquer l'activité.

Ces deux composés ne sont néanmoins pas les seuls impliqués dans l'activité antibactérienne des extraits d'AMM01. Une troisième 4-hydroxycoumarine a été isolée sur la base de son absorbance et sa fluorescence remarquable autour de 360 nm. Sa détermination structurale a permis d'établir qu'il s'agissait d'un dérivé du féruléol **36** n'ayant pas encore été décrit jusqu'à maintenant, nommé

coumaryl 12-féruléol dans ce manuscrit. L'évaluation de son activité antibactérienne a mis en évidence une forte activité sur les bactéries Gram +, avec des CMI du même ordre de grandeur que l'érythromycine, un antibiotique commercial. Le féruléol **36** et l'hydroxyféruléol **43** ne sont donc pas les seuls composés antibactériens dans la gomme ammoniaque. Ce nouveau composé, assez minoritaire dans l'extrait, est actuellement en train d'être extrait en quantité suffisante pour pouvoir conduire différents tests biologiques. L'évaluation de l'activité antibactérienne de ces trois composés purifiés permettra de déterminer s'ils sont effectivement les responsables majoritaires de l'activité antibactérienne de leur fraction d'origine (test à venir) mais aussi de comparer cette activité.

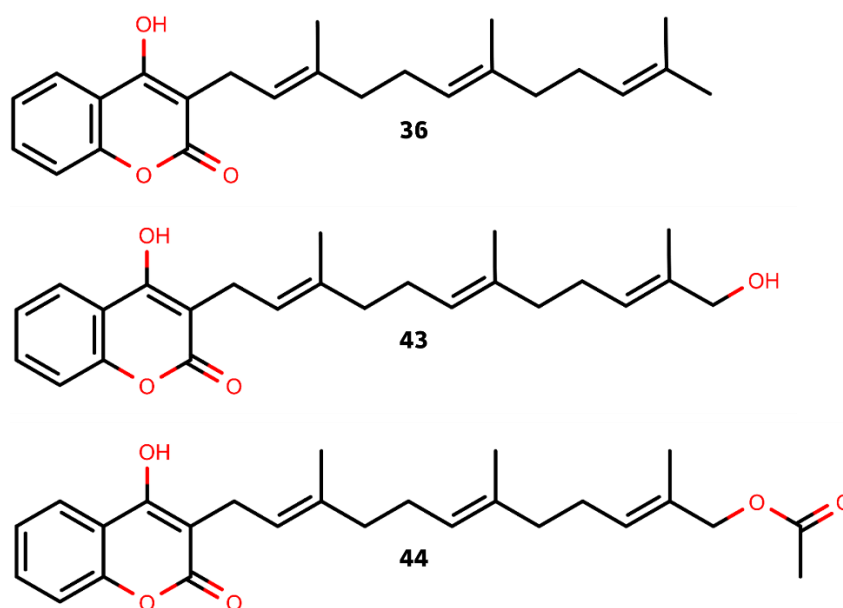


Figure 86 – Coumarines sesquiterpéniques antibactériennes de *F. communis* : féruléol **36**, ω-hydroxyféruléol **43** et ω-acétoxyféruléol **44**^{233,234}

Cependant le fenouil géant a en premier lieu été étudié à cause de la férulose, un trouble hémorragique léthal chez le bétail causé par l'ingestion des parties aériennes de la plante⁵⁶. Deux chémotypes ont alors été différenciés, un toxique et un non-toxique. La toxicité du premier chémotype serait due aux 4-hydroxycoumarines présentes, en particulier le féruléol **36** (Figure 87-A. page suivante), ainsi qu'aux pyrano-[3,2-C]-coumarines dont la ferprénine **45** (Figure 87-B. page suivante)⁵⁶. Le chémotype non-toxique serait quant à lui principalement composé d'esters de daucanes dérivés du jaeschkeanadiol **46** (Figure 88-A page suivante.) comme la férutinine **38**, la téferdine **39** et la téféline **40** (Figure 28) et du siol **47** (Figure 88-B. page suivante)⁵⁶. La férule commune contient donc également des composés cytotoxiques sur les mammifères dont certains font partis des composés antibactériens décrits plus haut, notamment le féruléol. S'ils peuvent donc expliquer l'activité antibactérienne des extraits d'AMM01, les 3 composés que nous avons isolés pourraient aussi être à l'origine d'une certaine toxicité pour l'homme. En parallèle des tests antibactériens, des tests cytotoxiques seront donc également menés sur ces 3 composés (tests à

venir). Il est néanmoins intéressant de noter qu'une application topique permet, de manière générale, l'utilisation de composés et de doses davantage toxiques que par ingestion grâce à la barrière biologique que constitue la peau⁷⁸.

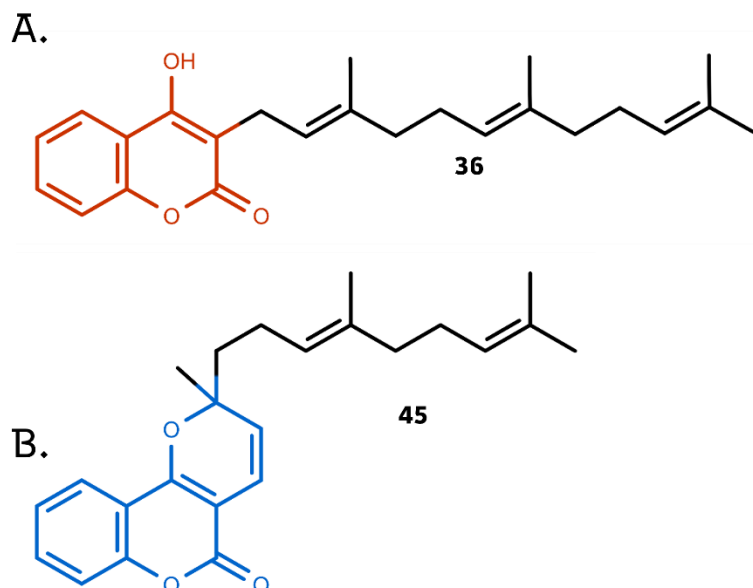


Figure 87 – Principales familles phytochimiques responsable de la toxicité de *F. communis*⁵⁶ : **A.** les 4-hydroxycoumarines avec l'exemple du féruléol **36** ; **B.** les pyrano-[3,2-C]-coumarines avec l'exemple de la ferprénine **45**

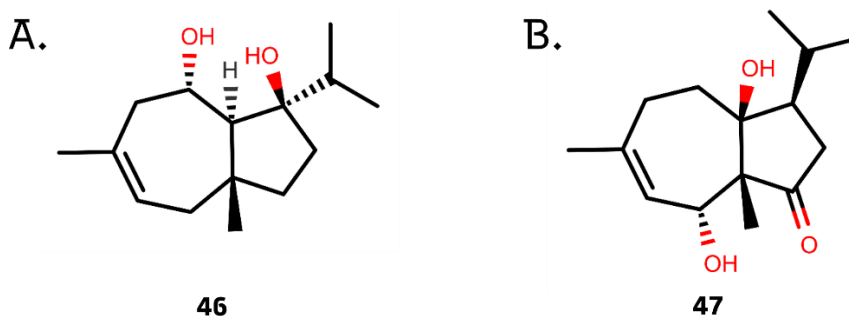


Figure 88 – Principales familles d'esters de daucanes présentes dans le chémotype non-toxique de *F. communis*⁵⁶, dérivées : **A.** du jaeschkeanadiol **46** ; **B.** du siol **47**

Les différents composés des extraits semblent donc principalement être des 4-hydroxycoumarines, décrites comme antibactériennes mais également cytotoxiques. Leur évaluation simultanée sur les bactéries Gram + ainsi que sur les lignées cellulaires humaines permettra d'établir de premiers indices de sélectivité *in vitro* et d'ainsi comparer l'impact des différents substitués en bout de chaîne sesquiterpénique sur l'activité antibactérienne, mais aussi sur la cytotoxicité.

Néanmoins, il pourrait y avoir encore d'autres molécules antibactériennes dans ces extraits : comme mentionné précédemment, 3 grandes familles de dérivés sesquiterpéniques antibactériens ont été décrites chez *F. communis*. On retrouve notamment des **esters de daucanes** avec des activités antibactérienne, antifongique et antiparasitaire²¹⁹. Par exemple, le 14-(*o*-hydroxycinnamoyloxy)-dauc-4,8-diène **48** (**Figure 89-A.**) a montré une activité antibactérienne marquée, avec une CMI de 2,5 µg/mL contre notre cible *S. aureus*, ainsi que sur d'autres souches Gram +²³³. De la même manière le ferchromone **49** (**Figure 89-B.**), une **chromane sesquiterpénique**, a montré une activité sur plusieurs souches bactériennes Gram + avec une CMI de 12,5 µg/mL sur *S. aureus*²³³. **L'isolement et l'identification des autres composés présents dans les extraits d'AMM01 poursuivis par Capucine BRAILLON pourraient donc révéler de nouvelles molécules impliquées dans la forte activité antibactérienne de ces extraits.**

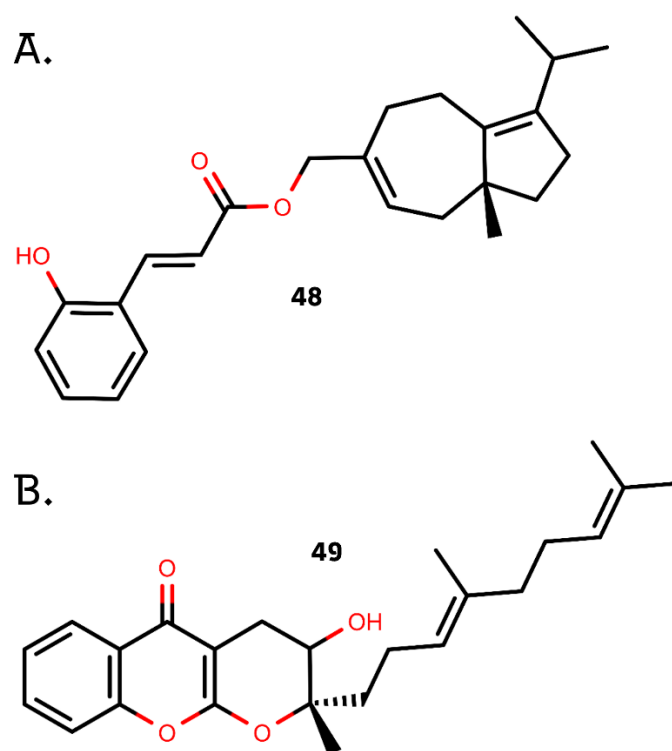


Figure 89 – Sesquiterpénoïdes antibactériens de *F. communis*²³³ : **A.** le 14-(*o*-hydroxycinnamoyloxy)-dauc-4,8-diène **48**, un ester de daucane ; **B.** le ferchromone **49**, une chromane sesquiterpénique

1. Activité antibactérienne des formulations traditionnelles

2. Etude de la synergie entre les drogues végétales

3. Etude la synergie entre les drogues végétales et l'acétate de cuivre

4. Synthèse de particules entre les drogues

Chapitre 5

Approche synergique entre les différents ingrédients des remèdes étudiés

p 155 à p 192

Chapitre 5 - Approche synergique entre les différents ingrédients des remèdes étudiés, en particulier l'association drogues végétales/métal

Dans le **Chapitre 3** – Etude des activités biologiques des différents ingrédients nous avons testé plusieurs activités biologiques impliquées dans un abcès cutané afin d'évaluer si l'intérêt de cette combinaison d'ingrédients pouvait se trouver dans une approche holistique de l'abcès. Une autre hypothèse serait que cette association permettrait une amélioration de l'activité antibactérienne globale, par synergie entre 2 ou plusieurs des ingrédients.

Jusqu'à maintenant, l'activité antibactérienne a été uniquement testée sur des extraits ou des solutions des différentes drogues isolées. Ces expérimentations ont notamment permis de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits de la gomme ammoniacale traditionnelle AMM01 sur *S. aureus* et d'autres souches Gram+, ainsi que la capacité de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ à inhiber la croissance des souches Gram- là où aucun extrait n'avait d'effet. Cependant, les deux remèdes étudiés associent ces drogues en l'état, sans extraction ou mise en solution préalable, sous la forme d'un mélange broyé directement déposé sur l'abcès (**Index**). Les extraits testés ne représentant qu'une partie des composés des différents ingrédients seuls, l'activité antibactérienne des remèdes dans leur formulation traditionnelle pourrait donc se révéler différente.

Nos objectifs ont alors été, dans un premier temps, d'évaluer si les deux remèdes étudiés pouvaient inhiber le développement de souches cutanées Gram+ dans leur **formulation traditionnelle** et non plus au travers d'extraits intermédiaires ou de solutions séparées. Dans un second temps, la question de l'importance de chaque drogue dans l'activité des remèdes a été étudiée, ainsi que leur **potentielle synergie antibactérienne**.

Afin de s'approcher le plus possible de la formulation traditionnelle tout en restant dans des conditions *in vitro*, les remèdes ont été reproduits comme décrit dans la traduction du manuscrit d'Al-Kindi puis testés par diffusion sur gélose sous la forme de dépôts solides. L'importance de la gomme ammoniacale AMM01 et l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ dans l'activité antibactérienne de ces dépôts solides a également été vérifiée.

Pour la synergie antibactérienne entre les ingrédients, l'étude a été réalisée à partir d'extraits pour les drogues végétales et les tests antibactériens ont été faits par microdilution en bouillon. La synergie entre les drogues végétales a été évaluée sur les souches Gram+ en comparant l'activité antibactérienne des extraits du mélange des 4 drogues végétales RDV à celle des extraits de la drogue la plus active, la gomme ammoniacale AMM01. Puis les extraits hydroalcooliques des différentes drogues ont été associés 2 à 2 selon la méthode de l'échiquier et testés sur *S. aureus*. La présence d'une synergie a été évaluée sur la base de ces résultats et du calcul des indices de concentration inhibitrice fractionnaire (indices FIC).

La synergie entre ces drogues végétales et l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ a ensuite été étudiée en associant les extraits hydroalcooliques des différentes drogues avec une solution d'acétate de cuivre 2 à 2 selon la méthode de l'échiquier pour ensuite calculer les indices FIC sur *S. aureus*. Une autre manière d'aborder la synergie plante-métal au sein des remèdes a été l'obtention de particules après mélange de l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH avec du sel de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ pendant plusieurs heures. Les particules obtenues ont été testées *in vitro* sur différentes souches, par microdilution en bouillon mais également sur des biofilms. En parallèle, le cuivre présent a été dosé et d'autres analyses ont été initiées afin de caractériser leur forme, taille et structure cristalline.

1. Activité antibactérienne des formulations traditionnelles par diffusion sur gélose

Les préparations traditionnelles des remèdes ont été reproduites au plus proche avant d'être testées sur tapis bactériens au sein de l'UMR 7242 – Equipe *Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications* par l'ingénieur Régine Janel.

Plusieurs préparations ont été réalisées : les préparations dont les proportions correspondent aux deux remèdes étudiés, **R₁** et **R₂**, ainsi que le mélange des 4 drogues végétales **RDV** et le mélange des drogues végétales sans la gomme ammoniacale **3DV (Part.Exp-7)**. Pour plus de clarté, les différents sigles des préparations sont rappelés dans l'**index** mis à votre disposition.

Les différentes préparations ainsi que l'acétate de cuivre seul ont été testés par diffusion sur gel d'agar sur un tapis bactérien en tant que modèle simplifié d'une surface de peau infectée par des bactéries. Les souches bactériennes suivantes ont été testées : *S. aureus* HG001, *S. epidermidis* de la collection des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, *C. striatum* de la collection des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, *E. coli* MG1655 et *P. aeruginosa* ATCC15692. Des disques commerciaux de gentamycine ont été utilisés comme témoin positif.

Deux quantités ont été déposées : une minimale (S) et son quadruple (L). Ces quantités ont été définies de manière à ce que seule la masse d'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ et la masse de gomme ammoniacale AMM01 varient entre les dépôts des différentes préparations (**Part.Exp-7**), permettant une comparaison des mélanges avec et sans ces éléments.

1.1. Limites du test

Afin de s'approcher le plus possible de l'usage traditionnel, nous avons dû nous éloigner du cadre habituel des tests de diffusion sur gélose et comparer entre elles différentes matrices complexes et hétérogènes. En effet, les gomme-résines utilisées sont naturellement hétérogènes et contiennent des restes de structures végétales, parfois des déchets comme de la terre ou des gravillons.

De plus, le dépôt des plantes s'est révélé plus difficile que le celui du sel de cuivre, le broyat de plantes n'étant pas aussi fin. Cela a été le cas en particulier pour la gomme ammoniacale : la résine étant très collante, elle restait agglutinée en petits grains inégaux et se répartissait mal sur la gélose (**Figure 90**). Les zones d'inhibition observées pour des préparations impliquant de la gomme ammoniacale n'étaient donc pas rondes et homogènes, et les dépôts n'étaient pas strictement

reproductibles. Ajouté à cela, la présence de composés colorés capables de diffuser dans la gélose a aussi gêné la lecture des zones d'inhibition les plus petites (**Figure 90**).

La comparaison entre les zones d'inhibition a donc été faite avec beaucoup de précaution et seules les différences les plus marquées ont été relevées : nous parlerons donc ici d'ordres de grandeur et de tendances plutôt que de différences strictes.

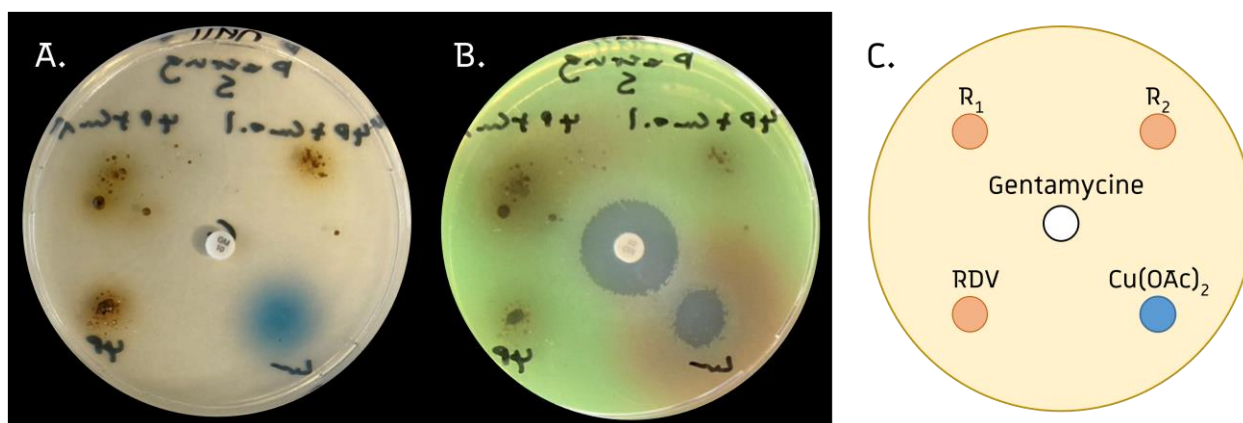


Figure 90 – Dépôts des masses minimales *S* des différentes préparations et de la gentamycine 10 µg (centre) sur *P. aeruginosa* : **A.** avant incubation ; **B.** après incubation

Préparation testées : R1 remède 1, mélange des 4 drogues végétales et de Cu(OAc)₂ 1/1/1/1/1 (m/m/m/m/m) ; R2 remède 2, mélange des 4 drogues végétales et de Cu(OAc)₂ 1/1/1/1/0,1 (m/m/m/m/m) ; RDV mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m) ; 3DV mélange des drogues végétales sans la gomme ammoniacque AMMO1 1/1/1 (m/m/m)

Bien qu'il faille garder ces limites à l'esprit, ce test permet d'avoir une première idée de l'activité antibactérienne des remèdes dans leur formulation traditionnelle et la comparaison des différentes préparations permet déjà de distinguer l'importance de chaque ingrédient.

1.2. Activité antibactérienne des remèdes étudiés sous leur formulation traditionnelle

Les diamètres d'inhibition obtenus pour les différents dépôts sont présentés dans le **Tableau 27** (page suivante).

Les remèdes **R₁** et **R₂** provoquent des zones d'inhibitions sur les 3 souches **Gram+** aux doses **S** et **L**, notamment sur la souche habituellement responsable des abcès cutanés, *S. aureus* (**Tableau 27** et **Figure 91-A,B&C**). Ces remèdes sous leur formulation traditionnelle, directement déposés sur gélose, permettent donc d'inhiber le développement de bactéries habituellement impliquées dans des abcès cutanés, sans qu'une étape d'extraction des composés ne soit nécessaire.

Tableau 27 – Diamètres des zones d'inhibition observées pour les différentes préparations : remèdes **R₁** et **R₂** ; remèdes sans acétate de cuivre **RDV** ni gomme ammoniacque **3DV** ; acétate de cuivre **Cu(OAc)₂**, exprimés en moyenne en mm +/- écart-type standard (n = 3)

Préparations	dépôts (mg)	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. striatum</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
R₁	S (5)	11 +/- 5,0	14 +/- 7,5	12 +/- 4,6	10 +/- 5,8	11 +/- 4,4
	L (20)	23 +/- 2,5	25 +/- 3,0	25 +/- 1,5	18 +/- 4,2	17 +/- 1,0
R₂	S (4,1)	7 +/- 6,1	13 +/- 2,1	9 +/- 4,7	-	-
	L (16,4)	15 +/- 2,9	18 +/- 1,0	16 +/- 1,2	-	4 +/- 5,8
RDV	S (4)	6 +/- 5,3	8 +/- 6,4	7 +/- 2,9	-	-
	L (16)	13 +/- 0,6	20 +/- 1,0	14 +/- 7,5	-	-
3DV	S (3)	5 +/- 4,4	4 +/- 4,2	3 +/- 5,2	-	-
	L (12)	15 +/- 4,9	22 +/- 5,0	8 +/- 7,0	-	-
Cu(OAc)₂	S (1)	12 +/- 1,5	21 +/- 1,0	18 +/- 2,1	12 +/- 1,5	14 +/- 2,9
	L (4)	17 +/- 6,0	24 +/- 4,5	26 +/- 4,5	15 +/- 6,7	17 +/- 5,5
Gentamycine	0,01	24 +/- 1,7	10 +/- 1,2	28 +/- 0,6	23 +/- 2,3	22 +/- 0,6

Résultats en gras : activité antibactérienne sur les souches Gram- (hors témoin positif)

Préparations testées : R1 remède 1 [mélange des 4 drogues végétales et de Cu(OAc)₂ 1/1/1/1/1 (m/m/m/m/m)] ; R2 remède 2 [mélange des 4 drogues végétales et de Cu(OAc)₂ 1/1/1/1/0,1 (m/m/m/m/m)] ; RDV mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m) ; 3DV mélange des drogues végétales sans la gomme ammoniacque AMM01 1/1/1 (m/m/m)

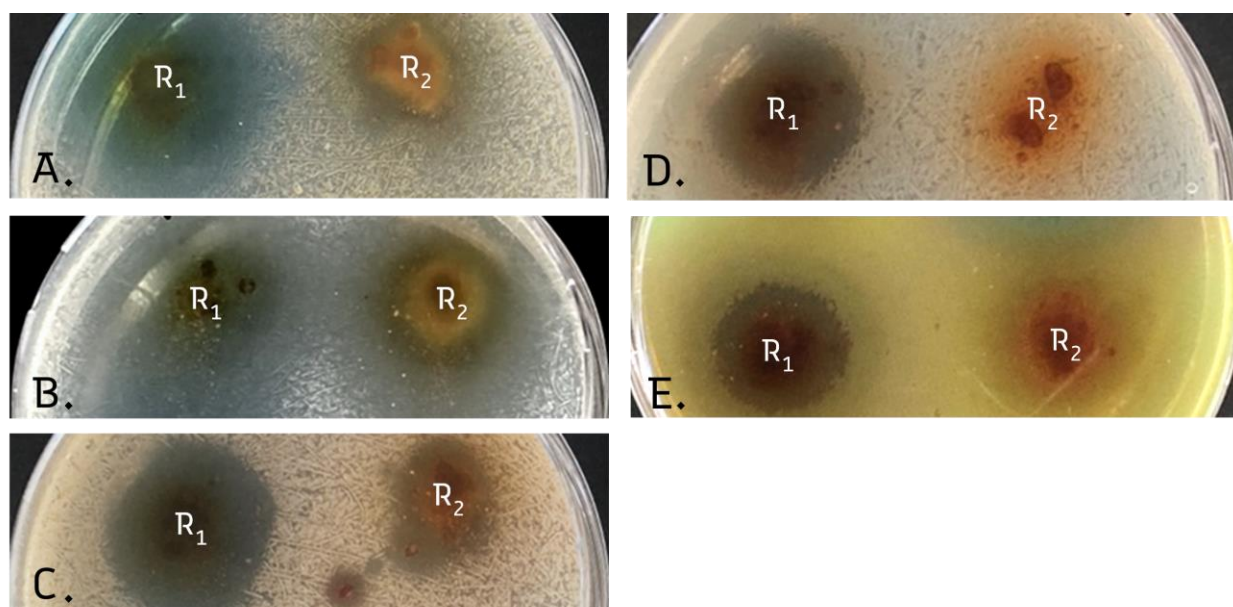


Figure 91 – Zone d'inhibition des **dépôts L** des remèdes **R₁** et **R₂** après diffusion sur géloses et 24h d'incubation : **A.** *S. aureus* ; **B.** *S. epidermidis* ; **C.** *C. striatum* ; **D.** *E. coli* ; **E.** *P. aeruginosa*

Préparation testées : R1 remède 1 [mélange des 4 drogues végétales et de Cu(OAc)₂ 1/1/1/1/1 (m/m/m/m/m)] ; R2 remède 2 [mélange des 4 drogues végétales et de Cu(OAc)₂ 1/1/1/1/0,1 (m/m/m/m/m)]

Le remède R_1 provoque également des zones d'inhibitions sur les 2 souches **Gram-** aux doses S et L tandis que le remède R_2 ne provoque de zones d'inhibition clairement lisibles que pour la dose L sur *P. aeruginosa* (**Tableau 27** et **Figure 91-D&E**). Le remède R_1 dans sa formulation traditionnelle permet également d'inhiber la croissance de bactéries Gram- sur gélose dans nos conditions de test, dont *P. aeruginosa* une souche pouvant surinfecter un abcès cutané. A l'inverse, dans les conditions testées, le remède R_2 ne permet pas d'étendre l'activité antibactérienne aux souches Gram-.

Bien que ces tests *in vitro* soient très éloignés d'une infection bactérienne cutanée avancée, ils viennent appuyer l'hypothèse selon laquelle les remèdes étudiés 1 & 2 seraient efficaces contre un abcès infectieux dû des souches Gram+ comme *S. aureus*, *S. epidermidis* ou *C. striatum*, et ce même sous la forme de drogues broyées, mélangées et appliquées en l'état. La prévention d'une surinfection par une souche Gram- comme *P. aeruginosa* semble aussi possible en présence d'acétate de cuivre, s'il est administré en quantité suffisante (remède R_1).

1.3. Importance des différents ingrédients dans les formulations traditionnelles des remèdes

Les résultats du criblage antibactérien, décrits dans le **Chap.3-2** ont mis en avant la forte activité antibactérienne des extraits de la gomme ammoniacque AMM01 sur les différentes souches Gram+ testées. Ce criblage a également mis en évidence l'activité antibactérienne modérée de l'acétate de cuivre $Cu(OAc)_2$ sur toutes les bactéries testées. Le sel de cuivre est donc actif sur les mêmes souches Gram+ que pour les extraits AMM01 mais aussi et surtout sur les 2 souches Gram-, *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Ces deux drogues semblent donc jouer un rôle central dans l'activité antibactérienne des remèdes, dans ces conditions de test. Nous avons donc vérifié si ces deux drogues conservent leur rôle central dans d'autres conditions expérimentales, soit la formulation traditionnelle testée *in vitro* par diffusion sur gélose.

1.3.1. De l'importance de l'acétate de cuivre dans l'activité antibactérienne des remèdes

Ces expérimentations avec les drogues déposées sous forme sèche confirment l'importance de l'acétate de cuivre $Cu(OAc)_2$ dans l'activité antibactérienne des remèdes. L'acétate de cuivre seul est actif dès 1 mg contre toutes les souches, Gram+ comme Gram- (**Tableau 27** et **Figure 92**). Sa présence dans la préparation du remède R_1 provoque une zone d'inhibition sur les bactéries Gram-

testées, là où aucune zone d'inhibition n'a pu être observée pour le mélange des 4 drogues végétales RDV (**Tableau 27** et **Figure 92-B.**).

Cependant, dans la préparation du remède R_2 , le sel de cuivre est présent en trop faible quantité (10 fois inférieure par rapport à R_1) et ne parvient qu'à très partiellement inhiber la croissance des souches Gram- (dose L sur *P. aeruginosa*) dans les conditions testées (**Tableau 27** et **Figure 91**).

L'acétate de cuivre présente donc une activité sur les souches Gram+ testées, que ce soit par microdilution en bouillon (**Chap.3-2**) ou par diffusion sur gélose, déposé directement sur le gel. Sur les souches Gram- testées, il est le seul ingrédient à apporter une activité inhibitrice là où le mélange des 4 drogues végétales ne suffit pas, que ce soit par microdilution en bouillon ou directement déposé sur la gélose. De plus, cette activité sur les différentes souches testées s'observe qu'il soit testé seul ou combiné avec le mélange de drogues végétales RDV des remèdes. Il doit néanmoins être présent en quantité suffisante pour être actif (R_1 VS R_2).

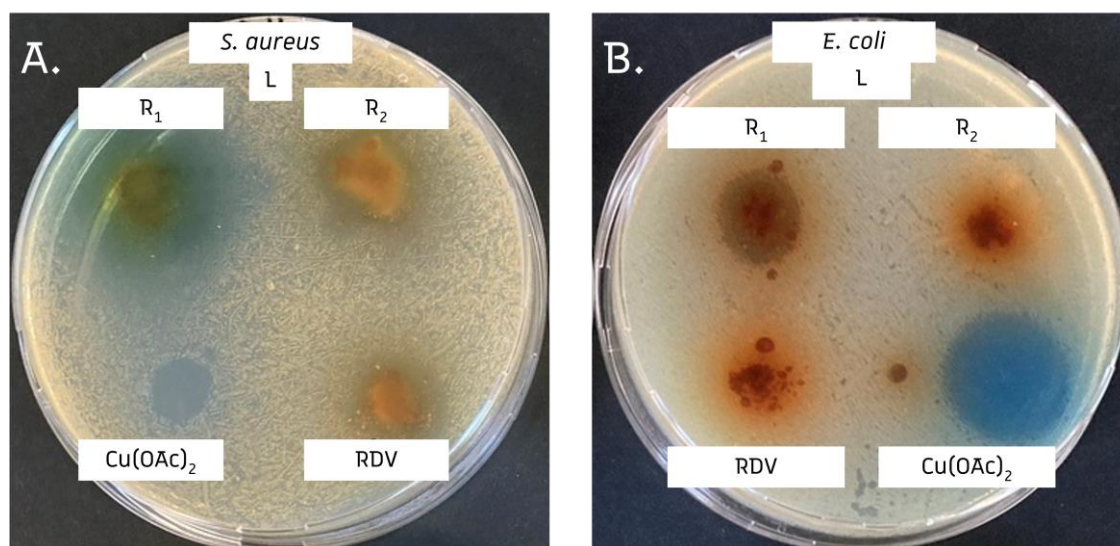


Figure 92 – Zones d'inhibition des dépôts L des remèdes R_1 , R_2 , du mélange RDV et de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ après diffusion sur géloses et 24h d'incubation : **A.** *S. aureus* ; **B.** *E. coli*

Préparations testées : R_1 remède 1 [mélange des 4 drogues végétales et de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 1/1/1/1/1 (m/m/m/m/m)] ; R_2 remède 2 [mélange des 4 drogues végétales et de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 1/1/1/1/0,1 (m/m/m/m/m)] ; RDV mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m)

L'acétate de cuivre permettrait donc d'élargir le spectre d'activité des remèdes aux bactéries Gram-, bien plus résistantes que les souches Gram+. Ainsi, en plus de lutter contre l'infection par une bactérie Gram+ cutanée comme *S. aureus*, il pourrait éviter la surinfection de l'abcès par des bactéries Gram- comme *P. aeruginosa*.

1.3.2. De l'importance de la gomme ammoniacque dans l'activité antibactérienne des remèdes

Les deux préparations à base de drogues végétales, RDV et 3DV, ne sont actives que sur les bactéries Gram+. La comparaison entre le mélange des 4 drogues végétales RDV et le même mélange dépourvu de gomme ammoniacque 3DV ne montre aucune différence remarquable (**Tableau 27**). Le mélange d'aloès, de myrrhe et de gomme sarcocolle *sans gomme ammoniacque* 3DV est actif sur les 3 souches Gram+ et l'ajout de gomme ammoniacque au mélange 3DV, représenté par le mélange RDV, n'apporte pas d'amélioration significative de l'activité. *L'importance de la gomme ammoniacque dans l'activité antibactérienne des remèdes ne ressort donc pas dans ces conditions de test, alors qu'elle était très nette dans le criblage antibactérien des extraits du Chap.3-2.*

Deux phénomènes peuvent expliquer cette différence entre les tests *in vitro* des extraits, que ce soit par diffusion sur agar ou par microdilution en bouillon, et les tests *in vitro* des dépôts solides. Tout d'abord, les composés actifs de la gomme ammoniacque peuvent n'être que très peu extraits de la matrice qu'est la gomme-résine. En effet, si les composés actifs de la gomme ammoniacque sont capables de diffuser dans la gélose comme le montrent les tests par diffusion sur gélose des extraits AMMO1, l'aspect collant de la drogue a pu gêner cette diffusion. Cette texture l'a rendue particulièrement difficile à réduire en poudre alors que les autres drogues végétales étaient soit déjà pulvérisées, soit sèches et donc plus faciles à broyer. La surface de contact avec la gélose était donc moins optimisée pour la gomme ammoniacque que pour les autres drogues, gênant la diffusion des composés à partir du mélange RDV. De plus, cet aspect collant a aussi pu baisser la surface de contact des *autres* drogues du mélange RDV en agglomérant les poudres, minimisant ainsi les zones d'inhibition pour les dépôts du mélange RDV. Ensuite, les différentes extractions des drogues végétales ont également pu exclure des composés actifs présents initialement dans les drogues végétales autres que la gomme ammoniacque, donnant des extraits moins actifs que les dépôts solides. Ainsi, dans les dépôts solides, l'activité de la gomme ammoniacque serait « noyée » dans celles des autres drogues. Afin de vérifier cela, il serait intéressant de tester des dépôts solides de chaque drogue végétale seule.

La gomme ammoniacque semble ici relativement peu active dans la formulation traditionnelle des remèdes par rapport aux autres drogues, si l'on compare aux activités obtenues avec les extraits. Les composés actifs de la gomme ammoniacque sont capables de diffuser dans la gélose, aussi le problème vient-ils peut-être du transfert résine-gélose. Il serait intéressant de tester des dépôts solides de la gomme-résine ainsi que les autres drogues végétales seules sur gélose, afin de pouvoir visualiser si les composés actifs arrivent à correctement « sortir » des différentes matrices végétales.

Ces premiers tests sur gélose nous ont permis d'avoir un aperçu de l'effet antibactérien des remèdes dans leur formulation traditionnelle mais l'utilisation des drogues entières apporte de nombreux biais empêchant une étude approfondie de cette activité, notamment sur le rôle et les interactions des différents ingrédients. Dans le but d'évaluer plus finement les interactions entre les différents ingrédients, nous avons donc étudié la potentielle synergie entre les *extraits* hydroalcooliques des drogues végétales d'une part, et entre ces extraits et une solution d'acétate de cuivre d'autre part.

Pour cela, la **méthode de l'échiquier** a été utilisée, cette dernière consistant à croiser les gammes de concentration de deux substances et non plus à croiser la gamme de concentrations de l'une à une unique concentration de l'autre (**Part.Exp-8.1**). Cette méthode est utilisée pour la mesure des interactions entre deux composés mais également entre des matrices plus complexes comme des extraits²³⁵⁻²³⁷.

Les résultats obtenus ont ensuite permis de calculer des **indices de concentration inhibitrice fractionnaire ou indices FIC**, FICI (*Fractional Inhibitory Concentration Indices*), ces indices permettant d'estimer le type d'interaction entre une drogue A et B, pour l'activité biologique testée. Le calcul d'un indice FIC se définit comme suit (**Part.Exp-8.1**) :

$$\frac{CMI\ A\ combiné\ à\ B}{CMI\ A\ seul} + \frac{CMI\ B\ combiné\ à\ A}{CMI\ B\ seul}$$

Nous avons employé ici la méthode de calcul du **FICI moyen final** avec les normes suivantes : FICI moyen final < 0,5 interaction synergique ; 0,5 < FICI moyen final < 1 interaction additionnelle, 1 < FICI moyen final < 4 pas d'interactions significatives ; FICI moyen final > 4 interaction antagoniste (**Part.Exp-8.1**).

Pour ces expérimentations, nous nous sommes focalisés sur ***S. aureus*** dans un premier temps, cette souche étant la cible thérapeutique la plus probable dans le cas d'un abcès et semblant par ailleurs sensible à l'association plantes-métal.

2. Etude de la potentielle synergie antibactérienne entre les extraits des drogues végétales

Nous avons évoqué en début de chapitre que les extraits de gomme ammoniacque AMM01 avaient montré la plus grande activité par microdilution en bouillon lors du criblage antibactérien. Lors de ce criblage, les extraits du mélange des 4 drogues végétales RDV ont également été testés. Nous avons donc dans un premier temps comparé l'activité de ces différents extraits avec celle des extraits AMM01, afin de voir si l'association des drogues végétales avant extraction améliorerait l'activité antibactérienne par rapport à la gomme ammoniacque seule. Puis nous avons étudié les associations des différentes drogues végétales entre elles sur la souche *S. aureus*, en combinant les extraits hydroalcooliques deux à deux selon la méthode de l'échiquier et en calculant les indices FIC pour chaque association (**Part.Exp-8.1**).

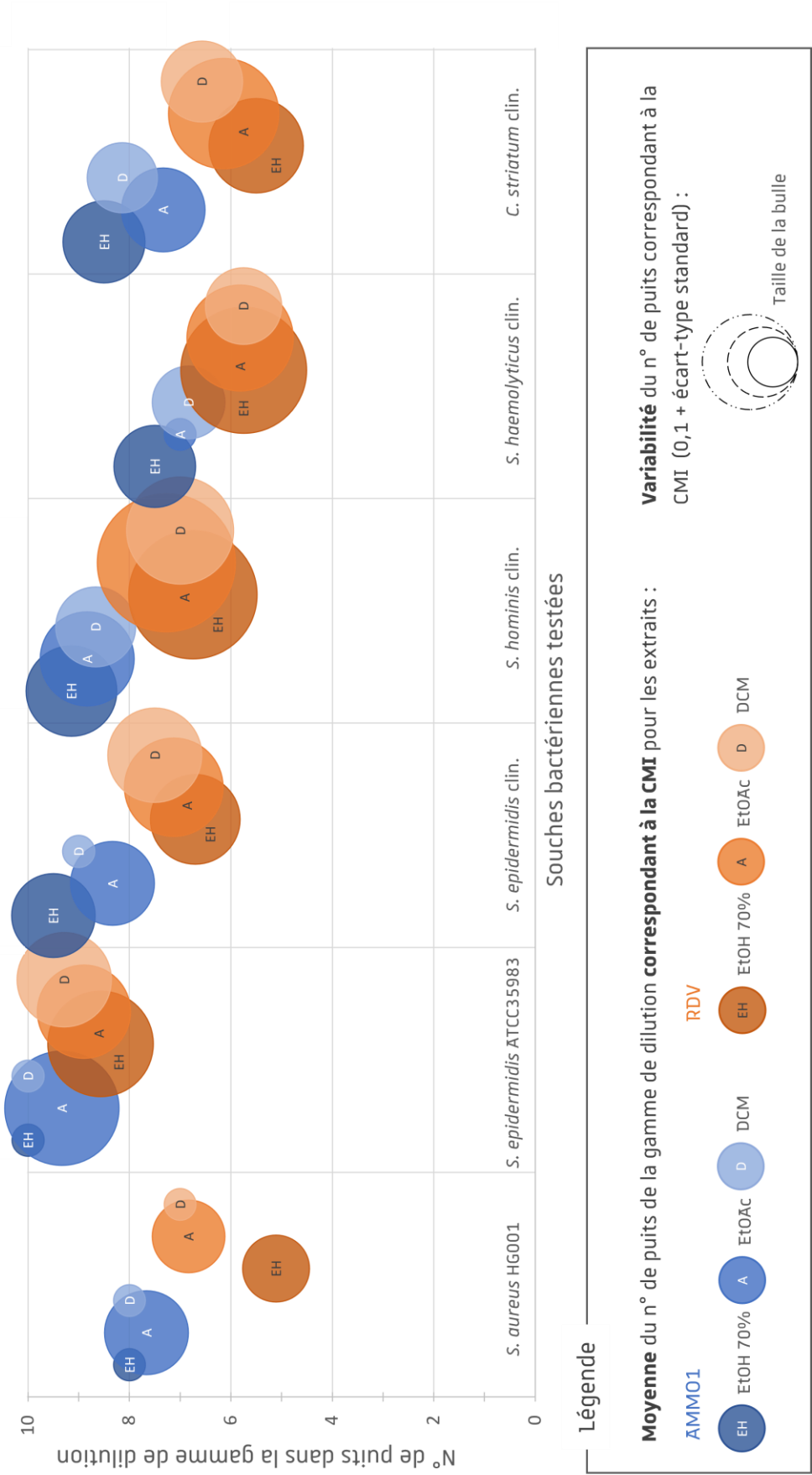
2.1. Comparaison de l'activité antibactérienne des extraits AMM01 et RDV

Les CMI des extraits du mélange des 4 drogues végétales RDV sont présentées dans le **Tableau 18** et montrent une activité antibactérienne marquée, proche de celle de la gomme ammoniacque AMM01. Les activités antibactériennes des différents extraits sur les différentes souches sont comparées dans la **Figure 93**. Ces activités sont exprimées en n° de puits plutôt qu'en CMI afin de s'affranchir de l'échelle log2 des concentrations (plus le n° de puit est grand, plus la CMI est basse).

Si les extraits du mélange des 4 drogues végétales RDV sont bien antibactériens avec des CMI inférieures à 100 µg/mL, voire inférieure à 10 µg/mL (**Tableau 18** p 104), on remarque que globalement l'activité antibactérienne est inférieure à celle des extraits de la gomme ammoniacque traditionnelle AMM01, les extraits ayant été préparés dans les mêmes solvants et testés sur les mêmes souches (**Figure 93**). Cette perte d'activité peut s'expliquer par un effet de « dilution » des composés actifs de la gomme ammoniacque par les composés inactifs provenant des autres drogues dans le mélange RDV.

Il ne semble donc pas y avoir, dans ces conditions expérimentales, de synergie entre les composés des différentes drogues végétales présentes dans les extraits RDV permettant une amélioration de l'activité antibactérienne par rapport aux extraits AMM01.

Comparaison des activités antibactériennes des extraits AMMO1 et RDV



Contrairement aux tests de diffusion sur gélose des drogues pulvérisées présentés précédemment, les tests par microdilution en bouillon révèlent une contribution significative de la gomme ammoniacque à l'activité antibactérienne du remède. Cependant, s'il y a un effet de synergie antibactérien entre les différentes drogues végétales, il n'est pas assez important pour être visible dans ces conditions de test.

2.2. Association des extraits hydroalcooliques des drogues végétales et indices FIC (méthode de l'échiquier)

Des associations par échiquier ont été réalisées entre les extraits hydroalcooliques des drogues végétales afin d'étudier leur potentielle synergie antibactérienne sur *S. aureus*. Les indices FIC ont été calculés pour chaque association et ces résultats sont présentés dans le **Tableau 28**.

Les extraits hydroalcooliques ont été choisis car l'éthanol à 70% est le seul solvant d'extraction présentant des rendements exploitables pour chacune des drogues. Il est à noter que ces associations ont été faites avec l'extrait de myrrhe traditionnelle MYRR1-EH et non pas l'extrait de la myrrhe commerciale de *C. abyssinica* COMA-EH (seule la myrrhe COMA a été utilisée pour préparer le mélange des 4 drogues végétales RDV).

Tableau 28 – FICI moyen des échiquiers entre les extraits hydroalcooliques (EH) des drogues végétales (n = 3).

	AMM01-EH			SARC-EH			MYRR1-EH		
ALOF-EH	29,42	29,42	29,42	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MYRR1-EH	1,569	1,142	1,142	NC	NC	NC			
SARC-EH	5,02	22,77	22,77						

Les cases en **bleu** = absence d'interactions ($1 < \text{FICI} < 4$) ; les cases en **rouge** = antagonisme ($\text{FICI} > 4$) ; **NC** = non communiqué (aucune activité permettant le calcul ou valeurs admises comme aberrantes)

Extraits hydroalcooliques des drogues végétales : ALOF-EH suc commercial d'*A. ferox* ; MYRR1-EH myrrhe traditionnelle ; SARC-EH gomme sarcocolle traditionnelle ; AMM01-EH gomme ammoniacque traditionnelle

Dans les contrôles testant les extraits isolés, l'extrait de gomme ammoniacque est le seul actif sur la souche testée *S. aureus*, les autres ayant une CMI supérieure à 500 µg/mL. D'après les calculs de l'indice FIC moyen pour chaque échiquier, les extraits de suc d'*A. ferox* ALOF-EH et de gomme sarcocolle SARC-EH ont un **effet antagoniste** sur l'activité antibactérienne de l'extrait de gomme ammoniacque AMM01-EH, tandis que l'extrait de myrrhe MYRR1-EH n'a pas d'influence significative sur son activité (**Tableau 28**). Concernant les associations des extraits notées NC, la souche s'est développée à toutes les concentrations ne permettant alors pas de calculer les indices FIC (**Tableau**

28). On considérera donc qu'il n'y a pas d'interactions entre ces extraits permettant une activité antibactérienne significative sur *S. aureus*.

L'association de l'extrait actif AMM01-EH avec les autres extraits ne tend donc pas à améliorer l'activité antibactérienne, certains extraits diminuant même cette activité. Ces premiers tests sur les extraits hydroalcooliques n'appuient donc pas l'hypothèse d'une synergie antibactérienne entre les différentes drogues végétales dans le remède.

Les drogues végétales associées avant ou après extraction ne semblent donc pas avoir de synergie antibactérienne entre elles.

3. Etude de la potentielle synergie antibactérienne entre les extraits des drogues végétales et l'acétate de cuivre

L'acétate de cuivre est le seul des ingrédients des remèdes à permettre d'inhiber le développement des bactéries Gram- testées. Nous n'avons pas pu comparer son activité aux extraits du remède R₁ (**Index**) comme pour AMM01 et RDV, l'extraction du remède n'ayant pas été possible à cause de la précipitation du cuivre dans les trois solvants d'extractions utilisés (résultats non présentés ici). Afin de contourner cette problématique, nous avons appliqué la méthode de l'échiquier à l'extrait hydroalcoolique des 4 drogues végétales RDV-EH associé avec l'acétate de cuivre sur *S. aureus* et la croissance bactérienne a été suivie pendant 24 h (**Part.Exp-8.1**). Puis nous avons étudié les associations des différentes drogues végétales avec l'acétate de cuivre sur la même souche, en combinant les extraits hydroalcooliques et une solution du sel de cuivre deux à deux selon la méthode de l'échiquier et en calculant les indices FIC pour chaque association (**Part.Exp-8.1**).

3.1. Association de l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH avec l'acétate de cuivre et indices FIC (méthode de l'échiquier)

Dans un premier temps, une association par échiquier a donc été réalisée entre l'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ et l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH, afin de mimer l'association des différents ingrédients dans le remède. La croissance bactérienne de *S. aureus* a été mesurée au cours du temps par lecture de la densité optique DO à 600 nm pendant 24h toutes les 30 minutes et une courbe de croissance a ainsi été obtenue pour chaque puit (**Part Exp-8.2**). Ce suivi par DO a permis de mettre en évidence que la combinaison de l'extrait RDV-EH et de l'acétate de cuivre Cu(Oac)₂, à certaines concentrations, permettait l'amélioration de l'activité antibactérienne. En effet, une croissance bactérienne est observée en présence de l'**extrait à 7,812 µg/mL (Figure 94)** et du **sel de cuivre à 1,25 mM (Figure 94)**, bien que cette croissance soit à chaque fois inférieure au témoin négatif (*S. aureus* uniquement en présence de milieu MHII, **Figure 94**). Or cette croissance est complètement inhibée **lorsqu'on associe dans le même puit ces 2 concentrations d'extrait et de sel de métal (Figure 94)**.

Il semble donc bien que l'association de l'extrait des drogues végétales RDV-EH et de l'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ ait un effet bénéfique qui améliore l'activité antibactérienne, dans ces conditions expérimentales.

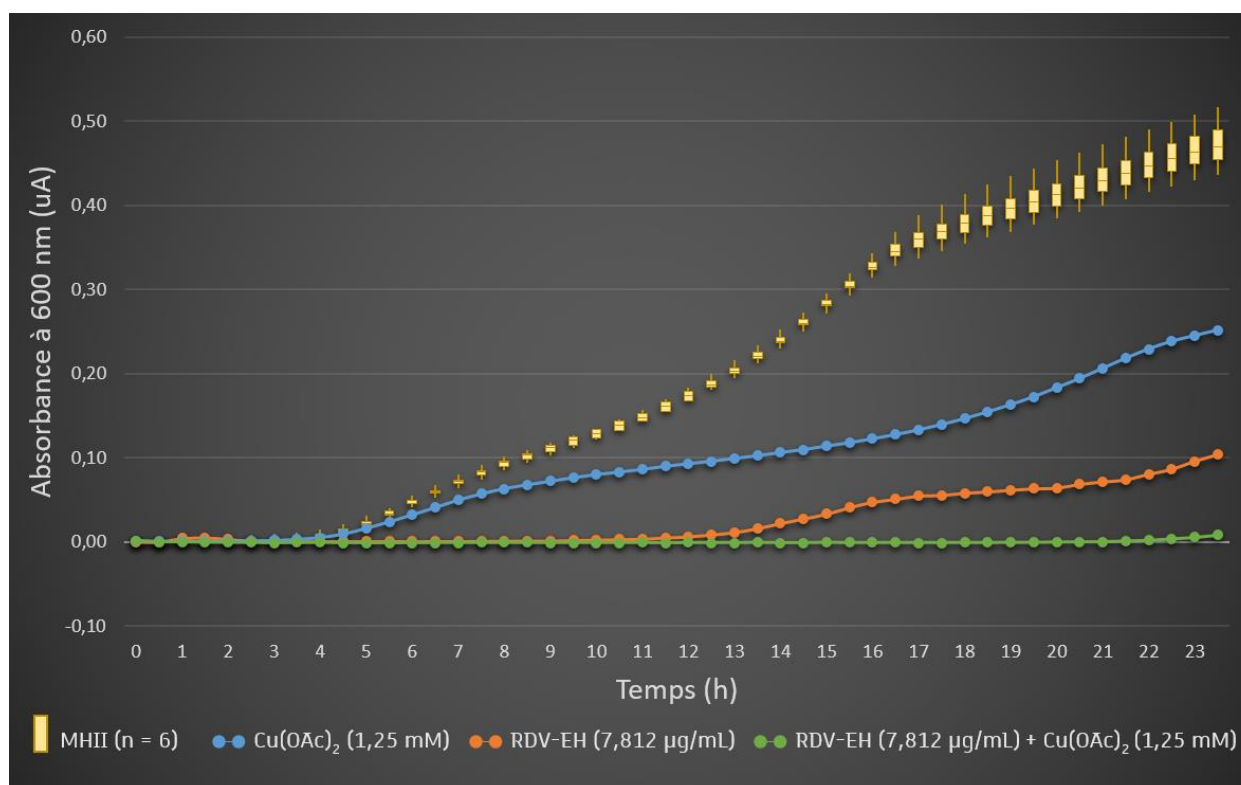


Figure 94 – Courbes de croissance de *S. aureus* en présence de milieu MHII (boîtes à moustaches), en présence de l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH à 7,812 µg/mL en présence d'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ à 1,25 mM et en présence de l'association des deux.

Après 24h, la croissance bactérienne a été lue dans les différentes lignes de l'échiquier. On constate que la gamme de l'extrait RDV-EH seul a une CMI de 15,625 µg/mL tandis que la gamme d'acétate de cuivre seul n'atteint pas la CMI (**Tableau 29** valeurs et ligne en gras). Les valeurs de 15,625 µg/mL pour l'extrait et 10 mM pour le sel de cuivre ont donc été utilisées comme « CMI de la substance seule » pour le calcul des indices FIC. Ces indices FIC ont été calculés pour les premiers puits sans développement bactérien pour chaque association (**Tableau 29**). Le FICI moyen final a une valeur de 0,9115, indiquant une légère addition antibactérienne entre les 2 substances.

Une interaction additive antibactérienne semble donc avoir lieu entre des composés issus des drogues végétales et l'acétate de cuivre. Cette addition entre le métal et les drogues végétales pourrait avoir lieu également dans le remède, si les composés d'origine végétale impliqués atteignent la bactérie en proportions suffisantes dans la formulation traditionnelle.

Tableau 29 – Schéma de l'échiquier entre l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH et l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ après 24h, avec les indices FIC calculés indiqués dans les premiers puits sans croissance bactérienne

Gamme de concentration du $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (mM)	Gamme de concentration de RDV-EH ($\mu\text{g/mL}$)					
	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	0
5					1	
2,5					0,75	
1,25					0,625	
0,625				1,0625		
0,3125				1,0313		
0				1		

Croissance bactérienne : puits en vert = croissance bactérienne ; puits en rouge : aucune croissance bactérienne en rouge

CMI des substances seules : en gras et délimitées par une ligne plus épaisse

3.2. Association des extraits hydroalcooliques des drogues végétales avec l'acétate de cuivre et indices FIC (méthode de l'échiquier)

Par la suite, des associations par échiquier ont été réalisées entre l'acétate de cuivre et les extraits hydroalcooliques des drogues végétales seules afin d'identifier la ou les drogues végétales à l'origine de cette addition antibactérienne avec le sel de cuivre. Les FICI moyens ont été calculés pour ces associations et sont présentés dans le **Tableau 30**.

Tableau 30 – FICI moyen entre l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ et les extraits hydroalcooliques (EH) des drogues végétales ($n = 1$ à 3)

		ALOF-EH	COMA1-EH	MYRR1-EH	SARC-EH			AMM01-EH
$\text{Cu}(\text{OAc})_2$	NC	3,132	1,0993	1,099	1,132	1,099	2,662	0,718

Les cases en bleu = absence d'interactions ($1 < \text{FICI} < 4$) ; les cases en jaune = addition ($0,5 < \text{FICI} < 1$) ; NC = non communiqué (aucune activité permettant le calcul ou valeurs admises comme aberrantes)

Extraits hydroalcooliques des drogues végétales : ALOF-EH suc commercial d'*A. ferox* ; COMA1-EH myrrhe commerciale de *C. abyssinica* ; MYRR1-EH myrrhe traditionnelle ; SARC-EH gomme sarcocolle traditionnelle ; AMM01-EH gomme ammoniacque traditionnelle

L'extrait hydroalcoolique de gomme ammoniacque EA-AMM01-EH semble avoir une interaction additive avec le sel de cuivre mais avec des résultats mitigés, un test concluant à une absence d'interactions et un test concluant à une addition (**Tableau 30**). Des réplicats seront réalisés afin de préciser la valeur du FICI moyen avec l'acétate de cuivre. Les résultats préliminaires laissent

néanmoins supposer que l'extrait hydroalcoolique de la gomme ammoniacque AMMO1-Eh pourrait avoir une légère interaction additive avec le sel de cuivre, assez légère pour passer sous le seuil de détection en fonction des variations inhérentes à ces tests *in vitro*.

Concernant les autres drogues végétales utilisées dans le mélange, ni l'extrait hydroalcoolique de myrrhe COMA1-EH ni de gomme sarcocolle traditionnelle SARC-EH n'ont montré d'interaction avec l'acétate de cuivre (**Tableau 30**). De la même manière, l'extrait hydroalcoolique de la myrrhe traditionnelle MYRR-EH, une autre myrrhe que celle utilisée dans le mélange RDV, n'a pas non plus montré d'interactions avec l'acétate de cuivre (**Tableau 30**).

Les résultats obtenus pour l'extrait du suc d'aloès ALOF-EH n'ont quant à eux pas pu être exploités car admis comme aberrants : des réplicats seront donc également réalisés pour cet extrait.

Ces premiers tests semblent donc montrer, malgré une faible reproductibilité des résultats, que la gomme ammoniacque et l'acétate de cuivre pourraient avoir une faible action antibactérienne additive sur *S. aureus* dans ces conditions de test. Ces tests ont cependant besoin d'être reproduits avant de pouvoir tirer une conclusion sur l'interaction entre l'extrait des 4 drogues végétales RDV-EH et l'acétate de cuivre.

4. Synthèse de particules à partir des ingrédients des remèdes (extraits végétaux et sel de cuivre)

Différentes définitions de la certification ISO/TS 80004-2:2015 permettant de cerner ce que sont les nanoparticules ont été rassemblées dans l'encadré ci-contre.

Les nanoparticules métalliques sont aujourd'hui considérées comme une alternative aux antibiotiques contre les bactéries multirésistantes⁴ et leur synthèse verte à partir de sels de métaux et des composés réducteurs présents dans des extraits végétaux a déjà été démontrée et est actuellement étudiée^{91,92} (**Chap.1-5**). Des nanoparticules métalliques ont déjà été obtenues de cette manière à partir des ingrédients utilisés dans nos remèdes : des nanoparticules de cuivre à partir de différents sels et différents extraits^{93,94}, à partir d'acétate de cuivre et d'extraits d'aloès⁹⁵⁻⁹⁷ mais aussi des nanoparticules d'autres métaux à partir d'extraits d'espèces des genres *Commiphora*⁹⁸ et *Ferula*⁹⁹. Nous avons donc voulu déterminer si la formation de nanoparticules de cuivre était possible à partir de l'acétate de cuivre et d'extraits des différents ingrédients des remèdes, combinés ou seuls.

Des essais ont été réalisés afin de tester si la combinaison des drogues végétales et de l'acétate de cuivre des remèdes étudiés pouvait amener à la formation de nanoparticules sous certaines conditions. Pour cela, l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH et l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ont été mélangés dans l'eau ou dans une solution éthanolique à 30%, sous agitation et en chauffant à 37°C (**Part.Exp-9.1**). Les précipités récupérés après centrifugation ont ensuite été testés sur des cultures sur gélose de différentes souches, Gram+ comme Gram-, mais également sur des bactéries sous forme de biofilm (**Part. Exp-9.2**). En parallèle, la caractérisation de ces particules a été initiée, afin de déterminer s'il pouvait s'agir d'agrégats ou d'agglomérats de nanoparticules de cuivre.

Définitions de la norme ISO/TS 80005-2:2015 :

Nanoparticule : nano-objet dont toutes les dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et dont les longueurs du plus grand et du plus petit axe ne diffèrent pas de façon significative.

Note 1 à l'article : *Si les dimensions diffèrent de façon significative (généralement d'un facteur supérieur à 3), des termes tels que nanofibre ou nanoplaque peuvent être préférés au terme nanoparticule.*

Nano-objet : portion discrète de matériau dont une, deux ou les trois dimensions externes sont à l'échelle nanométrique.

Note 1 à l'article : *Les deuxièmes et troisième dimensions externes sont orthogonales à la première dimension et l'une par rapport à l'autre.*

Echelle nanométrique : échelle de longueur s'étendant approximativement de 1 nm à 100 nm.

Note 1 à l'article : *Les propriétés qui ne constituent pas des extrapolations par rapport à des dimensions plus grandes sont principalement manifestes dans cette échelle de longueur.*

Les nano-objets (par exemple les nanoparticules, les nanofibres et les nanoplaques) apparaissent souvent en groupes (de grande taille), plutôt qu'isolés. Pour des raisons d'énergie de surface, des interactions sont probables entre ces nano-objets qui coexistent. Dans la description de ces interactions, les termes suivants sont souvent utilisés. Aucune restriction concernant les dimensions physiques et la forme n'est indiquée pour les termes définis ci-après.

Agglomérat : ensemble de particules faiblement ou moyennement liées, dont l'aire de la surface externe résultante est similaire à la somme des aires de surface de chacun des composants. Note 1 à l'article : *Les forces assurant la cohésion d'un agglomérat sont faibles, par exemple des forces de Van der Waals ou des forces résultant d'un simple enchevêtrement physique.* Note 2 à l'article : *Les agglomérats sont également appelés particules secondaires et les particules sources initiales sont appelées particules primaires.*

Agrégat : particule composée de particules fortement liées ou fusionnées, dont l'aire de la surface externe résultante est significativement plus petite que la somme des aires de surface de chacun des composants. Note 1 à l'article : *Les forces assurant la cohésion d'un agrégat sont puissantes, par exemple des liaisons covalentes ou ioniques, ou des forces résultant d'un frittage ou d'un enchevêtrement physique complexe, ou sinon d'anciennes particules primaires combinées.* Note 2 à l'article : *Les agrégats sont également appelés particules secondaires et les particules sources initiales sont appelées particules primaires.*

Source : <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:fr> consulté le 15.09.22

4.1. Formation d'un précipité après mélange des solutions de RDV-EH et de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$

L'extrait hydroalcoolique du mélange de 4 drogues végétales RDV-EH et l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ont été resolubilisés soit dans l'eau, soit dans l'éthanol à 30 % et ont été soumis à un prétraitement destiné à débarrasser les solutions des composés non-solubles et des débris (37°C, agitation rotative, 4 h). Dans les expérimentations suivantes, ces fractions aqueuses prétraitées seront considérées comme équivalentes à l'extrait initial, notamment en termes de concentrations.

Les différentes solutions prétraitées ont ensuite été associées de manière à avoir un rapport RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ soit de 4/1 (m/m) soit de 4/0,1 (m/m) dans la solution finale. Ces proportions correspondent au remède 1 et au remède 2 respectivement. Les différents mélanges des solutions ont ensuite été remis sur agitateur rotatif pendant 18 h à 37°C, ainsi que les solutions prétraitées de l'extrait RDV-EH et de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ en guise de témoins.

Les solutions témoins ont gardé le même aspect à t_0 et après 18 h d'incubation : aucun changement de couleur n'a été observé et aucun précipité ne s'est formé (**Figure 95-A.**). À t_0 , les différents mélanges avaient un aspect assez clair et limpide mais après 18 h d'incubation, un changement de couleur mais surtout de texture est observé, les solutions devenant plus sombres, plus denses et granuleuses, que ce soit dans l'eau ou dans l'EtOH30% (**Figure 95-B&C.**). Après centrifugation, on obtient un précipité pour tous les mélanges (**Figure 95-C.**).

Les précipités obtenus dans les mélanges sont donc *a priori* bien le résultat d'une interaction du sel de métal avec un ou plusieurs composés d'origine végétale et pas à une précipitation du sel de cuivre ou des extraits dans les conditions expérimentales.

On remarque que les différents mélanges ont tous produit un précipité, avec une abondance qui semble plus importante pour les mélanges ayant la plus grande proportions d'acétate de cuivre 4/1 RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (m/m) (**Figure 95-C.**). L'acétate de cuivre semble donc être ici l'élément limitant dans la formation de ces précipités. Afin de confirmer cela, l'acétate de cuivre en solution pourra être dosé dans les mélanges avant agitation et après agitation+centrifugation.

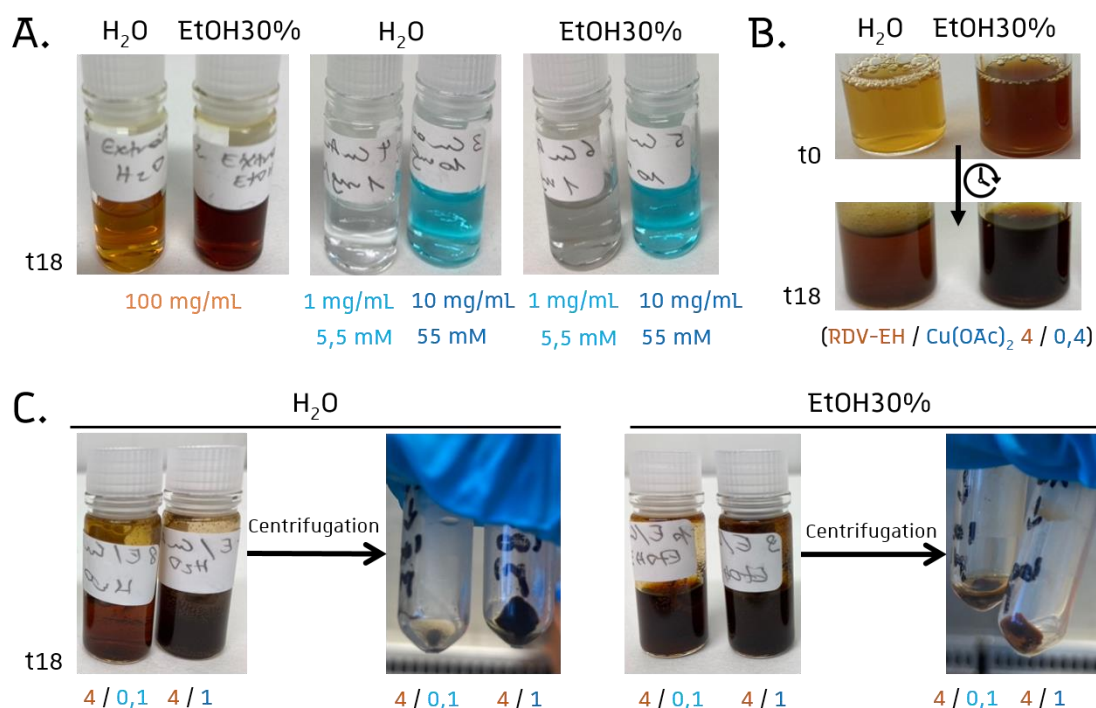


Figure 95 – Solutions après agitation à 37°C pendant 18h : **A.** Solutions témoins de l'extrait hydroalcoolique des 4 drogues végétales RDV-EH et de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$; **B.** Changement d'aspect après incubation pour des mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (expérience antérieure, le changement d'aspect y étant plus net) ; **C.** Mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 4/0,1 (m/m) et 4/1 (m/m), avant et après centrifugation

4.2. Activité antibactérienne des particules formées

Les particules formées dans les différents mélanges ont été testées *in vitro* sur différentes souches Gram+ et Gram- par diffusion sur gélose mais également sur des biofilms, afin d'établir leur intérêt antibactérien. Les différents tests antibactériens ont été réalisés au sein de l'UMR 7242 – Equipe Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications par l'ingénieur Régine Janel.

4.2.1. Criblage par diffusion sur gélose et comparaison surnageant/particules

Les particules récupérées en centrifugeant les mélanges précédents [RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 4/1 et 4/0,1 (m/m), 37°C, agitation rotative, 18h] ont été resolubilisées et concentrées 10 fois dans le solvant d'origine. Puis l'activité de ces particules concentrées, des mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ avant centrifugation et des solutions témoins de l'extrait RDV-EH et de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ seuls a été testée par diffusion sur gélose (**Part.Exp-9.2.1**). Les tests ont été réalisés sur *S. aureus* HG001, *S. epidermidis* (collection de souches des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg), *E. coli* MG1655 et *P. aeruginosa* ATCC15692. Un dépôt de 25 μL a été réalisé pour chaque solution et suspension testée.

Les zones d'inhibition les plus remarquables induites par les solutions témoins de l'extrait RDV-EH et du sel $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ sont illustrées dans la **Figure 96** :

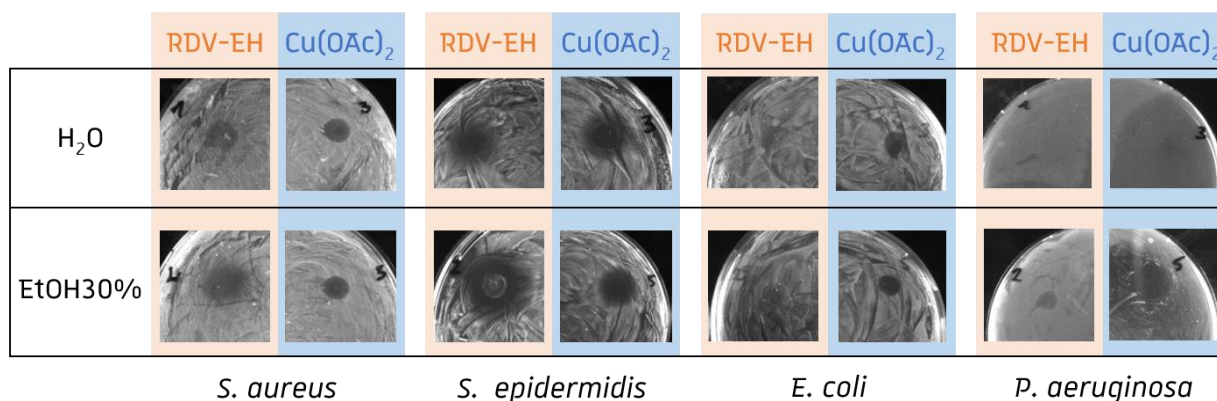


Figure 96 – Zones d'inhibition des dépôts (25 μL) des solutions témoins de l'extrait hydroalcoolique des 4 drogues végétales RDV-EH (40 mg/mL) et de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (55 mM) sur les souches *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* et *P. aeruginosa* ($n=1$)

Les solutions témoins de l'extrait hydroalcoolique des 4 drogues végétales RDV-EH n'ont induit des zones d'inhibition que sur les 2 bactéries Gram+, que l'extrait soit resolubilisé dans l'eau ou l'éthanol à 30% (**Figure 96**).

Les solutions témoins de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ à 55 mM ont montré une activité sur les deux bactéries Gram+ et sur la bactérie Gram- *E. coli*, que ce soit dans l'eau ou l'éthanol à 30% (**Figure 96**). Seule la solution témoin du sel $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ à 55 mM dans l'éthanol à 30% a montré en plus une activité sur la bactérie Gram- *P. aeruginosa* (**Figure 96**). Les solutions témoins à 5,5 mM n'ont montré aucune activité antibactérienne dans ces conditions de tests, sauf sur *S. epidermidis* (non illustré ici). Les solutions témoins ont donc leur propre activité antibactérienne qu'il faudra prendre en compte pour le test des mélanges non centrifugés.

Les zones d'inhibition les plus remarquables induites par les mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ après incubation (**Mix**) et par les particules isolées par centrifugation de ces mélanges (resuspendues en concentrant 10 fois, **Prcpt**) sont illustrées dans la **Figure 97** :

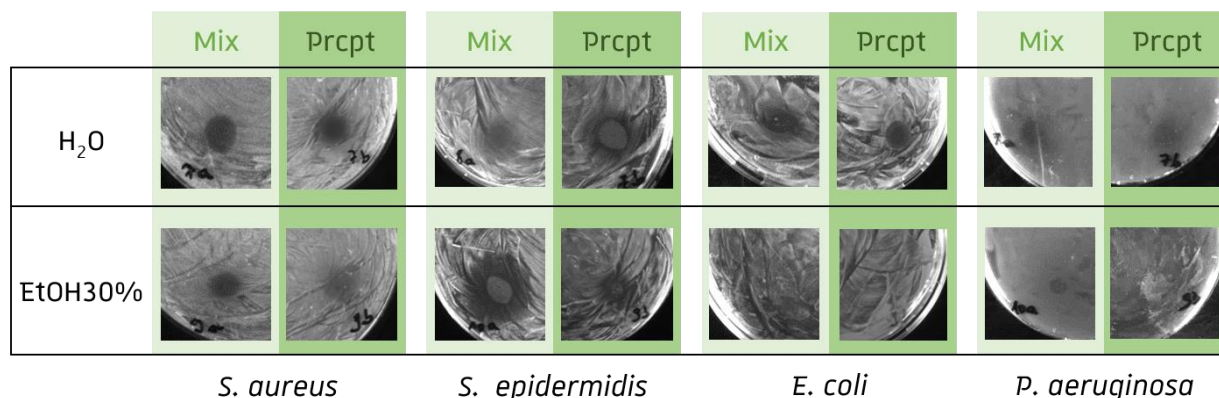


Figure 97 - Zones d'inhibition des dépôts (25 μ L) des mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) (**Mix**) et des particules isolées de ces mélanges par centrifugation et concentrées 10 fois (**Prcpt**) sur les souches *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* et *P. aeruginosa*

RDV-EH : extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m)

Les mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ avant centrifugation ont tous montré des zones d'inhibition pour les bactéries Gram+ *S. aureus* et *S. epidermidis*, que ce soit dans l'H₂O ou l'EtOH30% et pour les deux proportions testées, 4/1 et 4/0,1 (m/m) (**Figure 97-Mix**). Cette activité peut s'expliquer par la présence des particules en suspension, mais également par les composés actifs de l'extrait RDV-EH ou l'acétate de cuivre n'ayant pas réagi. Pour les bactéries Gram- *E. coli* et *P. aeruginosa*, tous les mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) (avec 55 mM d'acétate de cuivre) se sont montré actifs, avec une activité semblant plus marquée dans les mélanges aqueux (**Figure 97-Mix**). À l'inverse les mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/0,1 (m/m) (avec 5,5 mM d'acétate de cuivre) n'ont pas induit de zone d'inhibition sur les souches Gram-, dans ces conditions expérimentales (données non illustrées). Les différents mélanges induisent donc des zones d'inhibition sur toutes les bactéries testées, à condition qu'ils contiennent assez d'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ pour les souches Gram-.

Les particules isolées des différents mélanges et concentrées 10 fois montrent toutes une activité antibactérienne sur les bactéries Gram+ *S. aureus* et *S. epidermidis* (**Figure 97-Prcpt**). Sur les bactéries Gram-, seules les particules obtenues dans le mélange RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) aqueux induisent des zones d'inhibition sur *E. coli* et *P. aeruginosa* (**Figure 97-Prcpt**). Les particules obtenues à partir du mélange préparé dans l'EtOH30% ou des mélanges préparés dans les proportions RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/0,1 (m/m) (avec 5,5 mM d'acétate de cuivre) n'ont pas induit de zone d'inhibition sur les souches Gram-, dans ces conditions expérimentales [données non illustrées pour les proportions 4/0,1 (m/m)]. Les particules formées dans les mélanges induisent des zones d'inhibition sur les bactéries Gram+ testées mais également sur les Gram-, lorsqu'elles proviennent du mélange aqueux avec une quantité suffisante d'acétate de cuivre (55 mM VS 5,5 mM).

Les particules formées dans les différents mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ après incubation (37°C, agitation rotative, 18h) possèdent donc bien une activité antibactérienne. Cette activité a pu être observée contre les bactéries Gram+ testées pour toutes les particules, mais également contre les bactéries Gram- testées pour les particules formées en condition aqueuse avec suffisamment de sel de cuivre (55 mM au lieu de 5,5 mM).

4.2.2. Criblage sur biofilms bactériens de particules formées

Les particules isolées par centrifugation des mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) dans l'eau et dans l'éthanol à 30% ont été mises en suspension dans l'eau ou l'éthanol à 30%. L'impact de ces suspensions a ensuite été testé sur des bactéries planctoniques en train de former un biofilm mais également sur des biofilms déjà formés depuis 24h, afin de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice de biofilm CMib dans ces deux conditions expérimentales (**Part.Exp-9.2.2**).

Ces expériences ont été menées dans un premiers temps sur les souches *S. aureus* (Gram+) et *E. coli* (Gram-), en utilisant un marquage au cristal violet puis en lisant la densité optique DO à 492 nm par un lecteur de microplaque Tecan. L'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH et l'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ ont également été testés seuls, afin d'évaluer leur activité antibiofilm individuelle. Néanmoins, l'absorbance propre des particules empêchant la lecture correcte à 492 nm, les mêmes expérimentations ont été menées mais en utilisant un marquage au colorant SYTO™ et en observant les plaques au microscope confocal de la Plateforme d'Imagerie Quantitative à la Faculté de Pharmacie, Strasbourg. Pour ces expérimentations, seuls les particules issues des mélanges et l'acétate de cuivre ont été testés, cette fois-ci sur les souches *S. aureus* (Gram+) et *P. aeruginosa* (Gram-).

4.2.2.1. Activité antibiofilm de l'extrait RDV-EH et de l'acétate de cuivre Cu(OAc)₂

Tout d'abord, l'activité antibiofilm de l'extrait RDV-EH (solubilisé dans le DMSO) et de l'acétate de cuivre (solubilisé dans l'eau), utilisés précédemment pour la formation des particules, a été testée. Les CMib ont été déterminées dans 2 conditions expérimentales : en incubant l'extrait ou le sel de cuivre avec une suspension planctonique dans des conditions permettant la formation d'un biofilm et en les incubant avec le biofilm déjà formé depuis 24 h. Ces expériences ont été menées sur *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* et une gamme de 1 à 500 µg/mL a été utilisée pour l'extrait RDV-EH tandis que des gammes de 0,025 à 12,5 mM ou 0,04 à 10 mM ont été utilisées pour le sel Cu(OAc)₂.

L'extrait RDV-EH empêche la formation de biofilm à partir d'une suspension planctonique uniquement chez *S. aureus* avec une CMib de 15,6 µg/mL (**Tableau 31**), soit une valeur proche de la

CMI déterminée en microdilution (**Tableau 18**). Il ne semble pas avoir d'effet sur les biofilms *déjà* formés, que ce soit sur *S. aureus* ou *E. coli* (**Tableau 32**). L'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH ne semble donc pas avoir d'activité antibiofilm sur *S. aureus* ou *E. coli* : l'inhibition de la formation du biofilm chez *S. aureus* pourrait être due à son activité sur les bactéries planctoniques et il n'a aucun effet délétère sur les biofilms déjà formés depuis 24 h.

L'acétate de cuivre empêche la formation de biofilm à partir d'une suspension planctonique chez *S. aureus* et *E. coli* avec une CMIb 12,5 mM (**Tableau 33**), mais également chez *P. aeruginosa* avec une CMIb de 10 mM (**Tableau 34**). Les CMIb correspondent là aussi aux CMI déterminées en microdilution (**Tableau 18**), nous ne pouvons donc pas déterminer s'il s'agit d'un effet antibactérien sur les bactéries planctoniques avant qu'elles ne forment un biofilm, ou d'un effet spécifiquement antibiofilm.

Tableau 31 - Absorbance à 492 nm après marquage au cristal violet des biofilms de *S. aureus* ($n = 3$) et *E. coli* ($n = 3$) incubés 30 h avec une gamme de concentrations de l'extrait RDV-EH

Souches	Gamme de concentration de l'extrait RDV-EH (µg/mL)										Bactéries	Blanc
	1	2	3,9	7,8	15,6	31,3	62,5	125	250	500		
<i>S. aureus</i>	0.342	0.298	0.333	0.313	0.089	0.009	-0.003	-0.002	-0.012	0.017	0.290	0.000
<i>E. coli</i>	0.248	0.273	0.248	0.260	0.310	0.294	0.311	0.378	0.398	0.498	0.266	0.000

RDV-EH : extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m)

Tableau 32 - Absorbance à 492 nm après marquage au cristal violet des biofilms de *S. aureus* ($n = 1$) et *E. coli* ($n = 1$) incubés 30 h dont 6h avec une gamme de concentrations de l'extrait RDV-EH

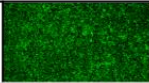
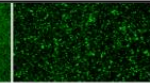
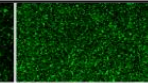
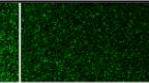
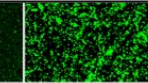
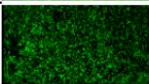
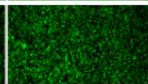
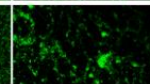
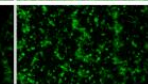
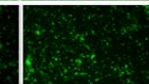
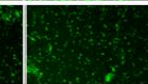
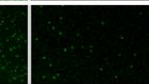
Souches	Gamme de concentration de l'extrait RDV-EH (µg/mL)										Bactéries	Blanc
	1	2	3,9	7,8	15,6	31,3	62,5	125	250	500		
<i>S. aureus</i>	0.184	0.228	0.152	0.200	0.215	0.174	0.167	0.189	0.249	0.379	0.242	0.000
<i>E. coli</i>	0.356	0.328	0.287	0.328	0.340	0.309	0.284	0.269	0.264	0.344	0.406	0.000

RDV-EH : extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m)

Tableau 33 - Absorbance à 492 nm après marquage au cristal violet des biofilms de *S. aureus* ($n = 3$) et *E. coli* ($n = 3$) incubés 30 h avec une gamme de concentrations de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$

Souches	Gamme de concentration d'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (mM)										Bactéries	Blanc
	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,1	6,3	12,5		
<i>S. aureus</i>	0.486	0.390	0.458	0.481	0.525	0.507	0.447	0.329	0.095	-0.011	0.262	0.000
<i>E. coli</i>	0.251	0.265	0.208	0.322	0.275	0.172	0.187	0.202	0.096	-0.012	0.243	0.000

Tableau 34 – Photographies au microscope confocal de biofilms de *S. aureus* (n = 3) et *P. aeruginosa* (n = 3) incubés 30 h avec une gamme de concentrations de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (marquage SYTO™)

Souches	Gamme de concentration en acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$						
	0 µg/mL 0 mM	7,3 µg/mL 0,04 mM	27 µg/mL 0,15 mM	113 µg/mL 0,62 mM	454 µg/mL 2,5 mM	908 µg/mL 5 mM	1816 µg/mL 10 mM
<i>S. aureus</i>							
<i>P. aeruginosa</i>							

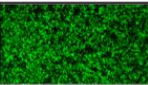
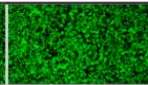
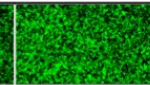
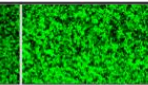
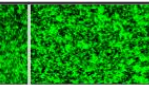
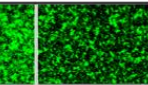
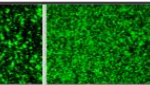
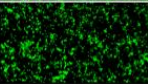
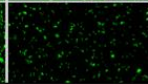
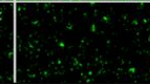
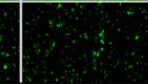
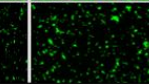
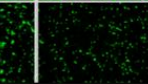
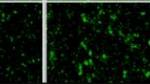
A l'inverse l'acétate de cuivre n'a aucun d'effet délétère sur les biofilms déjà formés de *S. aureus*, même aux concentrations les plus hautes (**Tableau 35** et **Tableau 36**). Les biofilms préformés de souches *E. coli* (**Tableau 35**) et *P. aeruginosa* (**Tableau 36**) se sont quant à eux que peu à pas perturbés par le sel de cuivre, même à 10 ou 12,5 mM.

Le sel de cuivre ne semble donc pas avoir d'activité spécifiquement antibiofilm sur la bactérie Gram+ *S. aureus*. Pour les souches *E. coli* et *P. aeruginosa*, les biofilms semblent légèrement impactés mais pas au point d'être détruits, l'acétate de cuivre n'a donc pas ou très peu d'activité antibiofilm sur les bactéries Gram- testées.

Tableau 35 – Absorbance à 492 nm après marquage au cristal violet des biofilms de *S. aureus* (n = 3) et *E. coli* (n = 3) incubés 30 h dont 6h avec une gamme de concentrations de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$

Souches	Gamme de concentration d'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (mM)										Bactéries	Blanc
	0?	0?	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,1	6,3	12,5		
<i>S. aureus</i>	0.351	0.351	0.446	0.408	0.501	0.442	0.377	0.446	0.359	0.316	0.302	0.000
<i>E. coli</i>	0.360	0.423	0.464	0.475	0.438	0.392	0.296	0.196	0.151	0.110	0.347	0.000

Tableau 36 – Photographies au microscope confocal de biofilms de *S. aureus* (n = 2) et *P. aeruginosa* (n = 2) incubés 30 h dont 6h avec une gamme de concentrations de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (marquage colorant SYTO™)

Souches	Gamme de concentration en acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$						
	0 µg/mL 0 mM	7,3 µg/mL 0,04 mM	27 µg/mL 0,15 mM	113 µg/mL 0,62 mM	454 µg/mL 2,5 mM	908 µg/mL 5 mM	1816 µg/mL 10 mM
<i>S. aureus</i>							
<i>P. aeruginosa</i>							

Les solutions témoins de l'extrait hydroalcoolique des 4 drogues végétales RDV-EH et de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, utilisés pour la synthèse des particules, ne montrent donc pas d'activité antibiofilm marquée. L'inhibition de la formation des biofilms à partir de bactéries planctoniques peut s'expliquer par l'activité antibactérienne déjà mise en évidence dans le **Chapitre 3** – Etude des activités biologiques des différents ingrédients et les biofilms préformés ne semblent pas impactés dans leur développement, à part peut-être un léger effet de l'acétate de cuivre sur les bactéries Gram- testées.

4.2.2.2. Activité antibiofilm des *particules* isolées de mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$

L'activité antibiofilm de différentes particules, obtenues à partir des mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 4/1 (m/m) avec incubation soit dans l' H_2O soit dans l'EtOH30% (37°C, agitation rotative, 18h), a été testée. Les CMib ont été déterminés dans 2 conditions expérimentales testées précédemment sur les solutions témoins, sauf les particules obtenues dans l'EtOH30% qui n'ont été testées que sur les biofilms en formations. Ces expériences ont été menées sur *S. aureus* et *E. coli* avec une gamme de 3,7 à 2300 $\mu\text{g/mL}$ sur les biofilms en formation et 0,75 à 2300 $\mu\text{g/mL}$ sur les biofilms déjà préformés.

Les particules formées dans les mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 4/1 (m/m) empêchent bien la formation de biofilms chez *S. aureus* (**Tableau 37**) et *P. aeruginosa* (**Tableau 38**). Cette effet est observé pour les particules synthétisées dans l'eau comme dans l'éthanol à 30%, avec des CMib de 2300 $\mu\text{g/mL}$ et 467 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Néanmoins, comme pour les solutions témoins testées précédemment, on ne peut pas déterminer s'il s'agit d'une inhibition de la croissance bactérienne planctonique ou d'une inhibition de la formation du biofilm.

Les particules formées dans l'eau ont également été testées sur des biofilms déjà formés depuis 24h et ont montré un effet délétère marqué sur les biofilms de *S. aureus*, avec une CMib de 2300 $\mu\text{g/mL}$, mais aussi sur les biofilms de *P. aeruginosa* avec un effet plus progressif dès 0,75 $\mu\text{g/mL}$ (

Tableau 39). Les particules formées dans le mélange RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ aqueux ont donc bien une activité antibiofilm sur des biofilms déjà préformés de *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Les particules formées dans le mélange RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 4/1 (m/m) dans l' H_2O (37°C, agitation rotative, 18 h) montrent une activité antibiofilm marquée, là où ni l'extrait RDV-EH ni le sel $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ seuls ne montraient d'activité. Concernant les particules formées dans l'EtOH30%, elles inhibent la formation de biofilms, soit en inhibant le développement des bactéries planctoniques avant qu'elles ne forment le biofilm, soit en les empêchant de s'organiser en biofilm. Si ces activités laissent à penser à la présence de nanoparticules et/ou de complexes organométalliques parmi les particules formées, la nature exacte de ces particules est encore inconnue. Afin de les caractériser,

plusieurs mesures ont été entreprises et si certaines sont encore en cours, d'autres ont déjà pu nous apporter des éléments de réponse.

Tableau 37 – Photographies au microscope confocal de biofilms de *S. aureus* ($n = 3$) incubés **30 h** avec une gamme de concentrations des *particules* formées dans les mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) dans l'eau ($n = 2$) ou l'éthanol à 30% ($n = 2$) (marquage SYTO™)

Solvant utilisé pour le mélange RDV-EH/Cu(OAc) ₂	Concentration en particules formées dans les mélanges RDV-EH/Cu(OAc) ₂					
	0 µg/mL	3,7 µg/mL	19 µg/mL	93 µg/mL	467 µg/mL	2300 µg/mL
H ₂ O						
EtOH 30%						

RDV-EH : extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m)

Tableau 38 – Photographies au microscope confocal de biofilms de *P. aeruginosa* ($n = 2$) incubés **30 h** avec une gamme de concentrations des *particules* formées dans les mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) dans l'eau ($n = 2$) ou l'éthanol à 30% ($n = 2$) (marquage SYTO™)

Solvant utilisé pour le mélange RDV-EH/Cu(OAc) ₂	Concentration en particules formées dans les mélanges RDV-EH/Cu(OAc) ₂					
	0 µg/mL	3,7 µg/mL	19 µg/mL	93 µg/mL	467 µg/mL	2300 µg/mL
H ₂ O						
EtOH 30%						

RDV-EH : extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m)

Tableau 39 – Photographies au microscope confocal de biofilms de *S. aureus* ($n = 3$) et *P. aeruginosa* ($n = 3$) incubés **30 h dont 6 h** avec une gamme de concentrations de *particules* formées dans le mélange RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) aqueux (marquage colorant SYTO™)

Souches	Gamme de concentration en particules formées dans le mélange RDV-EH/Cu(OAc) ₂ aqueux						
	0 µg/mL	0,75 µg/mL	3,7 µg/mL	19 µg/mL	93 µg/mL	467 µg/mL	2300 µg/mL
<i>S. aureus</i>							
<i>P. aeruginosa</i>							

RDV-EH : extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 (m/m/m/m)

4.3. Caractérisation des particules (étude préliminaire)

4.3.1. Importance des drogues végétales en présence

Afin de déterminer quelles drogues végétales pouvaient être impliquées dans la synthèse de ces particules issues des mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂, nous avons associé l'acétate de cuivre aux extraits hydroalcooliques individuels des 4 drogues végétales composant la préparation RDV.

Les extraits hydroalcooliques du mélange des 4 drogues végétales (RDV-EH) mais également du suc d'*A. ferox* commercial (ALOF-EH), de la myrrhe traditionnelle (MYRR-EH, N.B. *RDV a été initialement préparé avec la myrrhe COMA et non de la myrrhe MYRR*), de la gomme sarcocolle traditionnelle (SARC-EH), de la gomme ammoniacale traditionnelle (AMMO1-EH) ainsi que l'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ ont donc été solubilisés dans l'eau puis ont été soumis au même protocole de prétraitement et d'incubation précédent. Comme précédemment, les fractions aqueuses prétraitées seront considérées comme équivalentes à l'extrait initial, notamment en termes de concentrations.

Les mélanges ont été faits dans un rapport RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) et un rapport extrait/Cu(OAc)₂ 1/1 (m/m). Les mêmes masses d'extraits et de sel de cuivre ayant été utilisées dans toutes les expérimentations, les quantités de particules obtenues ont pu être comparées. L'évolution visuelle des différents mélanges est illustrée dans la **Figure 98** (page suivante) et les masses obtenues après lyophilisation sont résumées dans le **Tableau 40** (page suivante).

Après incubation (37°C, agitation rotative, 18 h), les mélanges changent d'aspect (couleur, densité) et, après centrifugation, la formation de précipité a pu être confirmée pour tous les mélanges, en particulier pour RDV-EH/Cu(OAc)₂ et ALOF-EH/Cu(OAc)₂ (**Figure 98-B**). En effet, le culot obtenu à partir de ces deux mélanges sont semblables en aspect mais surtout en rendement de particules formées (**Tableau 40**).

Les extraits hydroalcooliques de la préparation RDV et des 4 drogues végétales changent tous d'aspect une fois mélangé à l'acétate de cuivre et la centrifugation a pu mettre en évidence la formation de particules pour toutes les associations testées. L'extrait hydroalcoolique de suc d'*A. ferox* commercial ALOF-EH en particulier forme un précipité très semblable à celui obtenu avec l'extrait hydroalcoolique des 4 drogues végétales RDV-EH, quasiment aussi important en termes de masse.

A. Solutions aqueuses des extraits 100 mg/mL et solution $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 100 mg/mL



B. Solutions aq. extraits prétraitées + solution aq. $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ prétraitée 1/1 (m/m) après incubation (37°C, agitation rotative, 18 h)

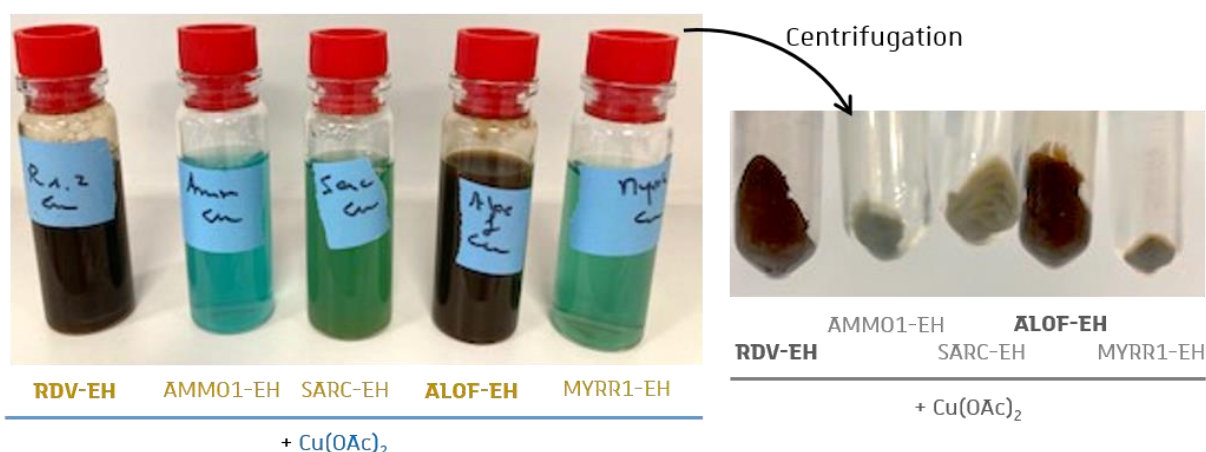


Figure 98 – A. Solutions aqueuses à 100 mg/mL des extraits hydroalcooliques des drogues végétales et d'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, après prétraitement (37°C, agitation rotative, 4 h) ; **B.** Mélanges des extraits avec de sel $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ après incubation (37°C, agitation rotative, 18 h) et les précipités obtenus après centrifugation des mélanges

Extrait hydroalcoolique de : RDV-EH mélange des 4 drogues végétales dans les proportions 1/1/1/1 (m/m/m/m) ; ALOF-EH suc commercial d'*A. ferox* ; MYRR1-EH myrrhe traditionnelle ; SARC-EH gomme sarcocolle traditionnelle ; AMMO1-EH gomme ammoniaque traditionnelle

Tableau 40 – Concentration de la fraction aqueuse de l'extrait hydroalcoolique des différentes drogues végétales (exprimée en équivalent de concentration de l'extrait même) et de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ dans les mélanges et masse de précipités récupérés après incubation (37°C, agitation rotative, 18h), centrifugation et lyophilisation

Extraits	[fraction aqueuse]	$[\text{Cu}(\text{OAc})_2]$	m précipité lyophilisé
RDV-EH	<=> extrait à 40 mg/mL	10 mg/mL	33,5 mg
ALOF-EH	<=> extrait à 10 mg/mL	10 mg/mL	25,5 mg
MYRR1-EH	<=> extrait à 10 mg/mL	10 mg/mL	0,9 mg
SARC-EH	<=> extrait à 10 mg/mL	10 mg/mL	5,6 mg
AMMO1-EH	<=> extrait à 10 mg/mL	10 mg/mL	1,2 mg

Les composés extraits du suc d'*A. ferox* commercial semblent donc majoritairement impliqués dans la formation des particules au sein du mélange RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) après incubation (37°C, agitation rotative, 18 h).

La synthèse de nanoparticules d'oxyde de cuivre CuO ou de nanoparticules d'argent Ag à partir d'extrait de feuille d'*A. vera* est déjà décrite dans la littérature^{96,97,238}. Le suc d'aloès étant tiré de la feuille et les suc d'*A. ferox* et *A. vera* étant considérés comme équivalents par la Ph. Eur.¹¹¹ (**Annexe 1**), il semble donc possible que les particules obtenues dans les mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ et ALOF-EH/Cu(OAc)₂ contiennent des nanoparticules, ce qui expliquerait l'activité antibiofilm des premières. L'activité antibiofilm et la caractérisation de ces particules ALOF-EH/Cu(OAc)₂ sont actuellement en cours.

4.3.2. Dosage du cuivre dans les particules par ICP-AES

Les particules formées dans les mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) (dans l'H₂O ou l'EtOH30%) et ALOF-EH/Cu(OAc)₂ 1/1 (m/m) (uniquement dans l'EtOH30%) ont été récupérées par centrifugation, puis lavées 2 fois avant d'être lyophilisées. Un des mélanges ALOF-EH/Cu(OAc)₂ dans l'EtOH30% a également été filtré sur un filtre de 0,22 µm après incubation (37°C, agitation rotative, 18 h), avant d'être centrifugé et lyophilisé. Des échantillons des différentes particules obtenues ont été envoyés pour analyse ICP-AES à la Plateforme Analytique des Inorganiques à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Cronenbourg.

L'analyse a détecté du cuivre Cu dans tous les échantillons, entre 4 et 10% selon le mélange d'origine (**Tableau 41**). Les différentes particules obtenues contiennent donc bien toutes du cuivre.

Néanmoins ce cuivre représente un pourcentage assez bas (4-10%) de la masse totale des particules, suggérant qu'elles sont également composées d'autres éléments. Ces éléments pourraient notamment être des débris végétaux présents dans les extraits, déjà observés au microscope photonique. En effet, après une filtration sur 0,22 µm du mélange ALOF-EH/Cu(OAc)₂ 1/1 (m/m) dans l'EtOH30%, on obtient un plus grand pourcentage de cuivre (8% VS 20%) dans l'échantillon (**Tableau 41**).

Cependant, si l'on filtre le mélange avant incubation pendant 18h, on obtient moins de particules finales (données non montrées ici) : le filtre pourrait donc retenir des composés impliqués dans la synthèse des particules, par exemple des polymères comme des polysaccharides. En effet ces derniers pourraient être présents dans la sarcocolle SARC (**Chap.2-1.3.3**) ou dans le suc d'aloès ALOF s'il a été mélangé avec du gel lors de la récolte (**Chap.2-1.1.3**).

Tableau 41 – Dosage du cuivre dans les particules obtenues à partir des différents mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ et ALOF-EH/Cu(OAc)₂

Mélanges extrait/Cu(OAc) ₂	Solvant utilisé	Masse extrait	Masse Cu(OAc) ₂	Masse particules lyophilisées	% (m/m) de cuivre
RDV-EH/Cu(OAc) ₂	H ₂ O	1400 mg	350 mg	135,2 mg	6,8 +/- 0,2
RDV-EH/Cu(OAc) ₂	EtOH30%	400 mg	100 mg	103,9 mg	4,10 +/- 0,08
ALOF-EH/Cu(OAc) ₂	EtOH30%	1 g	1 g	463,4 mg	8,0 +/- 0,1
ALOF-EH/Cu(OAc) ₂ filtré	EtOH30%	925 mg	925 mg	455,3 mg	20,8 +/- 0,5

Extraits hydroalcooliques : RDV-EH mélange des 4 drogues végétales 1/1/1/1 m/m/m/m ; ALOF-EH suc d'*A. ferox* commercial

Les particules obtenues dans les différents mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ et ALOF-EH/Cu(OAc)₂ contiennent donc du cuivre, à différents pourcentages selon les conditions expérimentales. Après filtration du mélange ALOF-EH/Cu(OAc)₂ dans l'EtOH30%, on voit le pourcentage de cuivre présent dans les particules doubler : il semblerait donc bien que les particules contiennent également des éléments plus gros que 22 µm et ne comportant pas l'élément cuivre, comme par exemple des débris végétaux.

Actuellement nous ne savons pas encore de quoi sont composées ces particules et s'il s'agit d'un mélange très diversifié ou non (débris végétaux, complexes organométalliques, nanoparticules ... ?). D'autres analyses sont actuellement en cours afin de déterminer la taille, la forme et la structure cristalline des particules obtenues, notamment afin de déterminer si des nanoparticules ont pu être synthétisées. Les méthodes employées sont résumées dans la partie suivante.

4.3.3. Mesures en cours et futures

Des analyses par microscopie électronique à transmission sont actuellement en cours au Laboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale (LAMS, Paris) par l'intermédiaire de la Pr. Maguy JABER, afin de visualiser la forme et mesurer la taille des particules formées à l'aide d'analyses MET, DRX et RPE.

La Microscopie Electronique en Transmission **MET** (ou TEM, *Transmission Electron Microscopy* en anglais) est une technique de microscopie où un faisceau d'électron va traverser une fine lame d'échantillon et les interactions de l'échantillon avec les électrons transmis vont donner une image contrastée. Cette méthode permet une meilleure résolution que la microscopie

photonique (environ 600 fois plus) et permet par exemple d'observer des structures aussi petites que des organites ou des nanoparticules. Elle va nous renseigner sur la taille et la forme des particules synthétisées.

La diffractométrie des rayons X **DRX** (ou XRD, *X-Ray Diffraction* en anglais) ou cristallographie aux rayons X est une analyse permettant de caractériser la matière cristallisée, dont les métaux. Elle est basée sur la diffraction des rayons X par les atomes : les faisceaux diffractés vont interagir entre eux et les signaux produits par cette interaction seront caractéristiques de l'arrangement des atomes. Cette méthode va nous permettre d'en apprendre plus sur la taille des particules mais également sur leur structure cristalline.

La Résonance Paramagnétique Electronique **RPE** ou Résonance de Spin Electronique RSE (ESR, *Electron Spin Resonance* en anglais) est une méthode de spectrométrie de résonance magnétique permettant de détecter, quantifier et identifier les espèces chimiques radicalaires, c'est-à-dire ayant un ou plusieurs électrons non-appariés. Cette analyse va permettre de nous renseigner sur la formation d'espèces radicalaires, notamment les espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species* en anglais).

S'il s'avère qu'il s'agit bien de nanoparticules, le suivi de réaction sera alors simplifié, des méthodes étant déjà décrites pour suivre et quantifier leur formation. Une des méthodes employées pour suivre la quantité de cuivre réagissant et formant des nanoparticules est le suivi au cours du temps de l'absorbance caractéristique du phénomène de résonance des plasmons de surface (SPR, *Surface Plasmon Resonance* en anglais)²³⁹. Ce phénomène est caractéristique des métaux et va être à l'origine d'une bande d'absorbance à différentes longueurs d'ondes selon le métal impliqué, les caractéristiques des particules et leur environnement^{239,240}. Par exemple, les nanoparticules de cuivre de 50 nm vont avoir un pic d'absorbance SPR entre 560 et 570 nm²⁴⁰. Le suivi de cette bande d'absorbance au cours du temps permettrait donc de suivre la cinétique de la formation des nanoparticules de cuivre et de s'assurer que la réaction est totale²³⁹.

5. Conclusion sur l'activité antibactérienne de l'association des différents ingrédients au sein des remèdes

L'association des différentes drogues végétales selon la formulation traditionnelle du remède R_1 permet une inhibition de la croissance de *S. aureus* par diffusion sur gélose (**Chap.5.1**), appuyant l'hypothèse d'une efficacité du remède traditionnel contre un abcès cutané causé par cette souche. Néanmoins, la méthode de la diffusion sur gélose n'est qu'un modèle *in vitro* permettant un criblage : s'il n'exclut pas l'efficacité de ces remèdes, il ne permet pas encore de l'affirmer. Il faudra en effet déterminer si les composés actifs sont capables de pénétrer non pas dans une gélose mais dans la peau et plus précisément dans un abcès cutané. L'utilisation de modèles de peau *in vitro* pourrait alors se révéler une alternative pertinente à l'utilisation de modèles animaux²⁴¹.

Se pose alors la question de l'intérêt d'une telle combinaison, non pas sur les différents aspects d'un abcès (**Chap.3-5**) mais sur l'infection bactérienne en particulier.

Il pourrait notamment s'agir d'une complémentarité de spectre antibactérien. En effet, les tests par microdilution en bouillon dans le **Chapitre 3** – Etude des activités biologiques des différents ingrédients ont pu mettre en évidence que les extraits de la gomme ammoniaque inhibent fortement le développement des souches Gram+ testées et que l'acétate de cuivre permet d'inhiber le développement des souches Gram- testées, là où aucun extrait végétal n'a d'effet. De fait, les tests par diffusion sur gélose de la préparation du remède 1 R_1 indiquent que l'acétate de cuivre est essentiel à l'activité *in vitro* du remède R_1 sur les bactéries Gram-. À l'inverse, la gomme ammoniaque ne semble pas particulièrement active dans ces conditions de test, certainement dû à son aspect collant limitant la surface de contact avec la gélose. La combinaison du sel de cuivre et des drogues végétales pourrait donc présenter une complémentarité de cibles thérapeutiques, à condition toutefois que les composés actifs passent bien de la drogue à la peau et de la peau à la bactérie. Si c'est le cas, le spectre d'activité antibactérienne du remède pourrait alors être assez large pour permettre d'éviter des surinfections, notamment par des Gram- comme *P. aeruginosa*.

Il pourrait également s'agir d'une synergie entre les composés des différents ingrédients, permettant une meilleure activité que s'ils étaient seuls. Aucune interaction antibactérienne n'a pu être mise en évidence entre les extraits hydroalcooliques des drogues végétales dans nos conditions expérimentales (méthode de l'échiquier et indice FIC). À l'inverse, une interaction additive entre l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH et l'acétate de cuivre $Cu(OAc)_2$ a pu être observée (**Chap.5.3**, méthode de l'échiquier, suivi croissance 24h, indice FIC, $n = 1$). Aucune interaction antibactérienne n'a pu clairement être mise en évidence entre les extraits

hydroalcooliques des drogues végétales individuelles et l'acétate de cuivre dans nos conditions expérimentales (méthode de l'échiquier, indice FIC). Néanmoins, un effet additif a été observé entre l'extrait hydroalcoolique de gomme ammoniaque traditionnelle AMM01-EH et le sel de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ dans un des deux réplicats réalisés : des réplicats supplémentaires seront réalisés afin de trancher sur le type d'interaction entre l'extrait et l'acétate de cuivre. Les composés extraits des différentes drogues végétales dans l'éthanol à 70% (extraits hydroalcooliques) ne semblent donc pas agir en synergie entre eux ou avec l'acétate de cuivre contre *S. aureus*, dans nos conditions expérimentales.

La littérature décrit également la formation de nanoparticules métalliques entre des composés d'origine végétale (généralement sous la forme d'extraits) et des sels de divers métaux. Ces nanoparticules présentent des propriétés antibactériennes mais également antibiofilms et sont considérées comme une alternative pour les souches multi-résistantes : l'obtention de nanoparticules métalliques à partir des drogues des remèdes seraient donc une valorisation possible de ces derniers. Des particules ont effectivement été obtenues en mélangeant l'extrait hydroalcoolique des 4 drogues végétales RDV-EH ou du suc d'*A. ferox* commercial ALOF-EH à de l'acétate de cuivre. Du cuivre a été détecté dans ces particules par ICP-AES et leur taille, forme et structure cristalline sont en train d'être analysées. Néanmoins, les tests de ces particules ont déjà démontré leur activité antibactérienne que ce soit sur des souches Gram+ comme *S. aureus* ou des souches Gram-, mais également leur activité antibiofilm là où ni l'extrait ni l'acétate de cuivre n'ont d'activité. Si les particules formées entre les extraits végétaux et l'acétate de cuivre doivent encore être caractérisées, elles permettent une activité biofilm marquée par rapport à ces extraits et l'acétate de cuivre. Leur synthèse semble être principalement due à la présence des composés extraits du suc d'*A. ferox* commercial ALOF, la drogue ALOF constituant ¼ du mélange des 4 drogues végétales RDV. La synthèse de nanoparticules d'oxyde de cuivre CuO ou de nanoparticules d'argent Ag à partir d'extrait de feuille d'*A. vera* étant décrite dans la littérature^{96,97,238}, il semble possible que les particules obtenues contiennent des nanoparticules, ce qui expliquerait l'activité antibiofilm de celles obtenues dans les mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$.



Conclusion générale

p 193 à p 199



Conclusion générale et perspectives

L'étude de pharmacopées traditionnelles passées est une approche originale se penchant sur des connaissances encore peu étudiées, mettant en lumière l'activité de drogues végétales, minérales et parfois animales sur des cibles identifiées à partir de leur usage traditionnel en prenant en compte les associations et préparations utilisées. La reproduction des remèdes nous a toutefois amenés à relever plusieurs défis, autant pour l'identification des ingrédients que pour l'approvisionnement et l'identification botanique des drogues végétales utilisées.

En effet, les ingrédients identifiés à partir de la traduction du manuscrit sont une des interprétations modernes possibles de la composition de ces remèdes. Cette interprétation est en grande partie basée sur l'étude du *materia medica* dans l'*aqrābādhīn* d'Al-Kindī réalisée par Martin Levey en 1966, des siècles après la rédaction du manuscrit. L'espèce désignée par le nom vernaculaire d'un ingrédient a donc pu changer au cours des siècles, tout comme les espèces en elles-mêmes, ou même seulement leur chémotype. De plus, dans le cas de la myrrhe, de la gomme sarcocolle et de la gomme ammoniacque, un même nom vernaculaire a été employé pour désigner la gomme-résine de plusieurs espèces, appartenant au même genre ou non. Enfin, le vert-de-gris est un mélange de divers sels de cuivre voire d'autres métal selon le minerai employé, ne pouvant se résumer à uniquement de l'acétate de cuivre. [Il s'agit là d'une des limites inhérentes à une approche historique : les drogues végétales et le sel de métal identifiés ne peuvent pas exactement être ceux utilisés par les médecins au 9^{ème} siècle.](#) Ainsi, si l'approche historique présente l'avantage d'utiliser des pharmacopées encore peu étudiées du point de vue de l'ethnopharmacologie, elle apporte également des difficultés supplémentaires concernant la vérification des informations.

L'approvisionnement des drogues végétales a également rencontré quelques obstacles et a, de fait, occupé la totalité de mon stage de M2 et une partie de ma première année de thèse. En effet, si le suc d'aloès et la myrrhe sont disponibles sur les marchés connus du laboratoire, ce n'était pas le cas de la gomme sarcocolle et de la gomme ammoniacque. De plus, les contrôles selon la monographie de la Ph. Eur. et le profil phytochimique de cette myrrhe commerciale (COMA1) a démontré sa mauvaise qualité. Des tradithérapeutes de pays utilisant encore ces 3 gomme-résines ont donc été utilisés comme sources, avec toutefois l'inconvénient de ne pas indiquer l'espèce productrice. L'identification de ces espèces a constitué le 3^{ème} défi majeur de la reproduction des remèdes. Par ailleurs, l'étude bibliographique de la gomme ammoniacque et de son histoire nous pousse à penser que la gomme-résine que nous nous sommes procurées (AMMO1) est une « gomme ammoniacque africaine » (*F. tingitana* et fêrûles d'Afrique) et non de la « gomme ammoniacque perse » (*F. ammoniacum*), la perse étant *a priori* utilisée par Al-Kindī. [La reproduction des remèdes réalisée est donc encore différente de la composition théorique déterminée en amont, notamment par l'inconnu de certaines espèces.](#) Toutefois, il est à noter que ces drogues végétales sont

justement décrites comme pouvant provenir de plusieurs espèces, en particulier la myrrhe¹¹¹ et la gomme ammoniacque¹⁷⁴ où le terme peut s'étendre à tout un genre même si, depuis, la définition s'est affinée à quelques espèces. Les propriétés thérapeutiques pourraient alors ne pas être confinées à une espèce, avec une famille de composés actifs commune : l'espèce aurait alors pu avoir peu d'importance à l'époque (la notion d'espèce y étant elle-même différente d'aujourd'hui). Nous avons donc estimé que le niveau d'identification des drogues était suffisamment pertinent pour reproduire les remèdes. Néanmoins, ces difficultés ont mis en lumière la complexité d'une étude sur du matériel végétal d'origine étrangère : une solution serait une collaboration encore plus étroite avec nos partenaires à l'international (notamment au Maroc). Un prélèvement pourrait alors être fait sur place, avec l'expertise d'un botaniste local.

De plus, la comparaison du profil phytochimique de la myrrhe traditionnelle (MYRR1) à celui d'un échantillon d'une myrrhe issue du droguier de Tours (MYRR2) en guise de référence a permis de confirmer qu'il s'agissait bien de myrrhe, même si l'espèce en reste toujours inconnue. Concernant la gomme ammoniacque, la comparaison à un échantillon issu du droguier de Tours (AMM03) a montré des profils très différents : il pourrait alors s'agir de 2 gomme-résines de 2 espèces de fêrle distinctes et avec un profil visuellement très différent. Néanmoins l'identification putative des composés majoritaires a permis d'apporter des éléments de réponses sur l'espèce productrice avec le féruléol **36**, suggérant une production par *F. communis* (chénotype toxique). *Si l'identité des espèces à l'origine des drogues végétales ne sont pas toutes établie, la composition chimique des extraits réalisés nous a permis d'émettre des hypothèses appuyées par plusieurs éléments.* Une identification des différentes drogues par extraction d'ADN pourrait confirmer ces hypothèses mais elle est compliquée du fait qu'il s'agisse d'exsudats et non d'organes de plantes pour toutes les drogues végétales (peu d'ADN en bon état). Toutefois, l'identification des espèces botaniques pourrait être affinée en réalisant une nouvelle comparaison des profils chimiques avec des échantillons de référence dont l'origine botanique est connue. Cette comparaison pourrait notamment se faire par GC-MS, cette technique étant particulièrement adaptée aux composés volatils et aux petites molécules organiques en général.

Les remèdes sélectionnés étant prescrits contre des abcès cutanés, les différents ingrédients ont été testés pour 3 activités biologiques liées à la résorption de ce genre d'infections : l'activité antibactérienne (en particulier sur *S. aureus*), l'activité pro ou anti-inflammatoire et la cicatrisation, à l'aide de modèles *in vitro*. Il a ainsi pu être mis en évidence que la gomme ammoniacque AMM01 présente une forte activité antibactérienne sur les bactéries Gram+ testées. Une CMI proche d'un antibiotique commercial et avec un indice de sélectivité satisfaisant ont d'ailleurs été obtenus sur *S. aureus*. L'acétate de cuivre permet quant à lui d'atteindre les bactéries Gram- testées, naturellement beaucoup plus résistantes aux antibiotiques. De plus, la reconstitution du remède et son test par diffusion sur gélose a permis de confirmer l'activité antibactérienne *in*

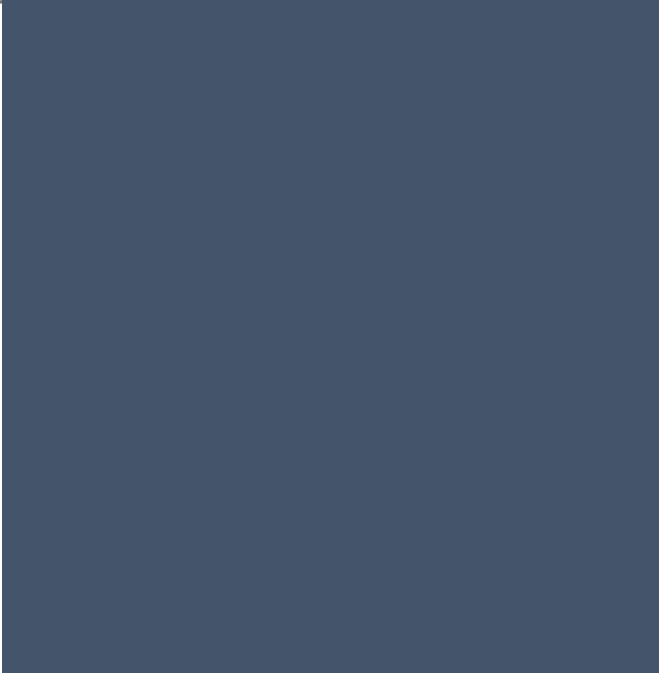
vitro du remède sur plusieurs souches, Gram+ et Gram-. Le suc d'aloès ALOF, la myrrhe MYRR et la gomme sarcocolle SARC ont quant à elles présenté une activité anti-inflammatoire. Cette activité sera davantage caractérisée à l'aide d'autres tests *in vitro* dans un futur proche, notamment par dosage de cytokines anti-inflammatoires. Enfin, concernant l'activité cicatrisante, aucune activité notable n'a été mise en évidence : de nouveaux tests vont être conduits prochainement dans des conditions différentes, évitant notamment le biais que pourrait causer l'apoptose des fibroblastes suite à la « coupure » du tapis cellulaire. Les 5 ingrédients, végétaux comme métallique, semblent ainsi présenter une complémentarité d'activités biologiques (et de spectre bactérien pour la gomme ammoniacale et le sel de cuivre) face à un abcès cutané infectieux. La combinaison de plusieurs ingrédients pourrait alors s'expliquer par une approche holistique de l'infection, en accord avec l'usage traditionnel des différentes drogues rapporté dans la littérature. Ces résultats nous permettent donc d'apporter des éléments de réponse à notre premier objectif de comprendre le fonctionnement des remèdes sélectionnés. Toutefois ces tests *in vitro* sont bien éloignés d'un réel abcès. Tout d'abord il s'agit de bactéries en conditions de laboratoire (très différentes de celles de la peau) et de cellules murines. De plus, comme on a pu le supposer avec le test de la gomme ammoniacale déposée directement sur de la gélose, tous les composés ne vont pas forcément diffuser de la drogue à l'intérieur de l'abcès. De plus, l'activité inflammatoire n'est pas forcément souhaitée lorsque l'infection bat son plein : il serait alors pertinent d'identifier les composés responsables de cette activité et leur diffusion au cours du temps au sein d'un abcès. À l'avenir, il serait donc intéressant de tester ces activités sur un modèle plus proche des conditions d'application du remède afin de voir si cette activité est conservée, comme sur des cellules humaines dans un premier temps puis sur un modèle de peau par exemple. Concernant la cytotoxicité, les drogues végétales se sont révélées peu toxiques par rapport à leur activité biologique, à l'inverse de l'acétate de cuivre. Il est cependant à souligner que l'application topique des remèdes permet l'utilisation de doses plus élevées avec moins d'impact systémique que pour des remèdes ingérés, pouvant expliquer l'usage de drogues connues pour leur toxicité. Par ailleurs, cette cytotoxicité sera testée sur des modèles *in vitro* de cellules humaines pour plus de pertinence.

Nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la gomme ammoniacale AMM01, l'ingrédient des remèdes étudiés montrant l'activité antibactérienne la plus marquée dans nos conditions expérimentales. Après un fractionnement bioguidé, les composés majoritaires des deux fractions actives ont pu être isolés et identifiés par HRMS et RMN. Il s'agit du féruléol **36** et de l' ω -hydroxyféruléol **43**, deux 4-hydroxycoumarines présentes chez le chémotype toxique de *F. communis* et décrites pour leur activité antibactérienne notamment sur *S. aureus*. Un troisième composé a été isolé et ce dernier, n'étant pas décrit dans la littérature scientifique à notre connaissance, a été nommé coumaryl 12-féruléol dans le cadre de cette thèse. La détermination de sa structure indique qu'il s'agit d'un dérivé du féruléol **36** et les tests antibactériens *in vitro* ont

révélé une forte activité antibactérienne sur les souches Gram +. Cependant, le férulénol **36**, l' ω -hydroxyférulénol **43** et de manière plus générale les 4-hydroxycoumarines sont décrites comme toxiques. Elles sont notamment tenues responsables de la férulose sur le bétail ayant consommé des pieds de *F. communis* contenant cette famille de composés. Ces trois molécules sont-actuellement isolées par la doctorante Capucine Braillon en quantité suffisante afin de tester leur activité antibactérienne et cytotoxique, permettant ainsi de déterminer et comparer leur indice de sélectivité. Ce dernier permettra de déterminer le réel potentiel antibactérien de ces composés.

Enfin, concernant les associations plantes/métal étudiées à travers ces remèdes, la reconstitution du remède n°1 a également permis de confirmer la complémentarité de spectre antibactérien entre les drogues végétales et l'acétate de cuivre par diffusion sur gélose. **L'étude de la pharmacopée d'Al-Kindi nous a donc permis de mettre en lumière une nouvelle association plante-métal antibactérienne, notre deuxième objectif étant de valoriser ce type de combinaison.** Néanmoins, cette association est intéressante dans un contexte *in vitro* précis. Dans l'optique d'un usage actuel, l'utilisation de composés purs ou *a minima* d'extraits dosés est nécessaire pour une question de contrôle de la dose. L'association des extraits végétaux et de l'acétate de cuivre permet effectivement de toucher les souches Gram+ et Gram-, sans toutefois présenter de synergie ni même d'addition entre les extraits individuels et le sel de cuivre. Seul l'extrait du mélange des 4 drogues végétales (RDV) montre une addition avec l'acétate de cuivre : cette addition doit cependant être confirmée par plusieurs réplicats.

En parallèle, la combinaison des drogues végétales et de l'acétate de cuivre a été approfondie selon un autre axe, s'éloignant de la pratique traditionnelle rapportée dans les remèdes. Une interaction plante/métal actuellement étudiée d'un point de vue antibactérien est la synthèse verte de nanoparticules métalliques à l'aide d'extraits végétaux et de sels de métaux. L'ingénieur Régine Janel a donc entrepris cette synthèse à l'aide des extraits des drogues végétales et le sel de cuivre constituant les remèdes. Si ces particules sont encore en cours de caractérisation, la présence de cuivre a déjà été mise en évidence et la synthèse semble dépendre grandement de l'extrait du suc d'aloès ALOF. Mais les résultats les plus remarquables sont leur activité biologique. En plus d'une forte activité antibactérienne, une activité antibiofilm sur des souches Gram+ comme Gram- a été mise en évidence, là où ni l'extrait ni l'acétate de cuivre seuls n'avaient d'effet. **Ces expériences viennent donc confirmer une autre association plantes/métal antibactérienne à travers la synthèse de particules métalliques, ces particules permettant même d'impacter les biofilms.** De plus, si la synthèse de nanoparticules métalliques a déjà été mise en évidence avec un extrait de feuille d'aloès et du gel d'aloès, à notre connaissance c'est la première fois que des particules ont été obtenues entre du latex d'aloès et de l'acétate de cuivre. Le latex étant actuellement moins utilisé que le gel, il pourrait s'agir d'une valorisation possible. Toutefois, la question de la reproductibilité sera centrale.



Partie expérimentale

p 199 à p 238



Partie expérimentale

Les expérimentations en chimie et une partie des tests antibactériens ont été réalisées de ma main au sein de l'UMR7200 et de l'UMR7242, mais également par de nombreux collaborateurs auquel cas mentionnés en début de paragraphe.

1. Procédures générales

1.1. Solvants

Des solvants de pureté $\geq 99\%$ ont été utilisés pour les extractions solide/liquide des drogues végétales, pour les différentes étapes d'extractions liquide/liquide, de séparations LC et par LC-Flash au cours du fractionnement bioguidé, ainsi que pour les CCM réalisées tout au long de ces étapes. Pour la séparation par HPLC semi-préparative ainsi que les analyses par HPLC-DAD, des solvants de pureté $\geq 99,9\%$ et de l'eau ultra pure (H_2O mQ) ont été utilisés.

1.2. Chromatographies sur Couche Mince (CCM)

La CCM est une technique séparative facilement réalisable et peu onéreuse basée sur le principe d'affinité avec la phase stationnaire, ici par liaisons hydrogènes avec la silice non-greffée (phase normale). Des plaques de gel de silice 60 F_{254} sur support aluminium (Merck) et des plaques de gel de silice 60 F_{254} greffée C_{18} (phase inverse) sur support aluminium (Merck) ont été utilisées.

La visualisation s'est faite dans un premier temps sous UV à 254 et 365 nm, puis par révélation à l'aide de la vanille sulfurique. Pour cela, les plaques étaient pulvérisées d'une solution éthanolique de vanilline à 1 % puis d'une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10 %, avant d'être chauffées à 110 °C environ²⁴².

1.3. Conditionnement

Les extraits, fractions et composés isolés ont été séchés par évaporation à l'aide d'évaporateurs rotatifs dans des bains à $\pm 37\text{ °C}$ et les dernières traces d'eau ont été éliminées par sublimation via un lyophilisateur. Les extraits ont été stockés à 4 °C, les fractions et composés à -20°C, le tout à l'obscurité. Ces méthodes ont permis de limiter la dégradation de potentiels composés thermosensibles.

1.4. Techniques analytiques : instruments, paramètres et préparations des échantillons

Les analyses HPLC-DAD ont été réalisées avec un gradient ACN/H₂O, avec 0,1 % de TFA dans les deux solvants (**Tableau 42**). Les échantillons à analyser ont été solubilisés dans du MeOH ($\geq 99,9\%$), puis filtrés sur des filtre-seringues en PTFE ou en cellulose, non stérilisés, de porosité 0,45 μm .

Les analyses HPLC-HRMS ont été réalisées au sein de la Plateforme d'Analyses Chimiques de Strasbourg Illkirch (PACSI) avec un gradient ACN/H₂O, avec 0,05 % d'acide formique dans les deux solvants (**Tableau 42**)**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** L'ionisation et la fragmentation a été faite selon les paramètres résumés dans le **Tableau 43** (page suivante). Les échantillons ont été solubilisés dans du MeOH ($\geq 99,9\%$) puis filtrés sur des filtre-seringues en PTFE ou en cellulose, non stérilisés, de porosité 0,45 μm .

Les analyses RMN ont été réalisées au sein du PACSI à l'aide d'un spectromètre RMN 500 MHz Ultrashield+, console Avance III (Bruker), équipé d'une sonde BBFO+. Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant deutéré adapté (Sigma-Aldrich) puis filtrés sur des filtre-seringues en PTFE ou en cellulose, non stérilisés, de porosité 0,45 μm . Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm en fonction du signal résiduel du solvant, et les constantes de couplage sont exprimées en Hz. Les signaux sont décrits comme des singulets (s), des doublets (d), des triplets (t), des quadruplets (q), des quintuplets (quint), des multiplets (m), des doublets de doublets (dd), des triplets de doublets (td), des triplets de quadruplets (tq) et des triplets de quintuplets (tquint).

Tableau 42 - Caractéristiques techniques des analyses HPLC-DAD et HPLC-HRMS

	HPLC-DAD	HPLC-HRMS/MS
Appareil	Chaîne HPLC Agilent Technologies 1200	Chaîne HPLC Agilent Technologies 6520
Colonne	Interchim Uptisphere [®] Strategy [™] C18-3, 5 μm , 250 x 4,6 mm	Interchim Uptisphere [®] Strategy [™] C18-3, 5 μm , 250 x 4,6 mm
Température du four	-	37 °C
Volume d'injection	10 μL	5 μL
Concentration	10 mg/mL	10 mg/mL
Solvants	ACN 0,1 % TFA / H ₂ O mQ 0,1 % TFA	ACN 0,05 % AF / H ₂ O 0,05 % AF
Débit	0,8 mL/min	0,8 mL/min
Détecteur	Diode Array Detector (DAD)	Electrospray Ionisation mode & Time-Of-Flight analyzer (ESI-Q-TOF)

ACN : acétonitrile ; TFA : acide trifluoroacétique ; AF : acide formique

Tableau 43 – Paramètres utilisés pour les analyses en spectrométrie de masse

Plage de m/z balayée (MS)	115 – 2000 m/z
Plage de m/z balayée (MS/MS)	50 – 2000 m/z
Fréquence d'acquisition (MS et MS/MS)	3 spectres/s
Voltage du capillaire	3500 V
Débit de gaz de désolvatation	8 L/min
Pression du gaz de nébulisation	30 psig
Température de la source	340 °C
Energie de collision	30,0 eV

1.5. Techniques séparatives : instruments/matériel, paramètres et préparations des échantillons

Les LC sur colonne ouverte ont été réalisées sur gel de silice (taille des pores 60 Å, granulométrie 40 – 63 µm, maillage 230 – 400 Mesh, Sigma-Aldrich). L'élution s'est faite soit de manière isocratique, soit par paliers isocratiques en faisant augmenter la proportion du solvant ayant la plus grande force éluante (série éluotrope ou classification de Snyder). La collection des fractions s'est faite à la main tous les 5 mL et le suivi a été fait par CCM.

Les LC-Flash ont été réalisées sur une chaîne SpotTM II Ultimate (Armen Instrument) équipée d'un détecteur UV à barrette de diode DAD. L'appareil est contrôlé par le logiciel Armen Glider Flash et permet une collection automatique des fractions en fonction de l'absorbance à une longueur d'onde donnée. Des colonnes pré-paquées de gel de silice ont été utilisées (Fast Connect, A.I.T. France), de grammage et granulométrie variables selon les besoins : 4 g ou 12 g ; 40-60 µm (silice irrégulière) ou 20-40 µm (silice BP-SUP). Les dépôts ont été faits en fonction du grammage de la colonne (4 à 400 mg pour 4 g de gel, 40 à 1200 mg pour 12 g), par injection directe dans le plus petit volume possible du mélange de solvant utilisé en début d'élution. Le débit était adapté en fonction du grammage de la colonne (5 mL/min pour 4 g de gel et 20 mL/min pour 12g).

Les HPLC semi-préparatives ont été réalisées sur une chaîne PLC 2050 (Gilson) équipée d'un détecteur DAD et d'une boucle d'injection de 5 mL et une colonne préparative Zorbax Eclipse SB-C₁₈ a été utilisée (5 µm, 21,2 x 250 mm, Agilent Technologies). L'appareil est contrôlé par le logiciel Gilson Glider Prep et permet là aussi une collection automatique en fonction de l'absorbance à une longueur d'onde donnée. L'élution s'est faite par gradient ACN/H₂O, avec ou sans acide (TFA ou acide acétique).

2. Approvisionnement des ingrédients des remèdes étudiés, extraction et contrôles des drogues végétales

2.1. Approvisionnement en matière première

Les différentes drogues végétales proviennent soit d'un intermédiaire commercial français, SAS Cailleau Herboristerie (6 rue de Strasbourg, 49120 CHEMILLE-EN-ANJOU, France), soit de commerces traditionnels de pays où elles sont commercialisées. Le détail de leur provenance est résumé dans le **Tableau 4**. Pour le vert-de-gris, de l'acétate de cuivre $C_4H_6CuO_4$ de chez Strem Chemicals Inc. (Newburyport, Massachusetts) a été utilisé sous forme de poudre anhydre.

Les drogues de référence pour comparaisons proviennent de différents droguiers et sont résumées dans le **Tableau 5**. Le houblon HUML a été cueilli à Illkirch, France (numéro Voucher : STR040551).

2.2. Extractions des différentes drogues végétales

Les extractions ont été réalisées au sein de l'UMR7200 et une partie par Loya SCHOEFFEL, stagiaire de M1 sous la direction de Catherine VONTHRON-SENECHEAU et avec mon encadrement ; Fatlind NEZIRI, stagiaire de L2 sous la direction de Pierre FECHTER et avec l'encadrement de Maël GAINCHE et moi-même ; Megi GJIKOLAJ, stagiaire de M2 sous la direction de Sergio ORTIZ et en partie sous mon encadrement.

Pour chaque drogue végétale (ou mélange de drogues végétales), trois extractions non-successives ont été réalisées dans 3 solvants de polarité décroissante : éthanol à 70% EtOH70%, acétate d'éthyle EtOAc et dichlorométhane DCM. Pour le houblon HUML, une extraction dans le méthanol MeOH a été réalisée.

Tout d'abord les drogues en larmes ou blocs ont été broyées au mortier, lorsque leur texture le permettait : la gomme ammoniacque s'est révélée trop collante pour cette étape et pour les cônes de houblon séchés, le cryobroyage a été utilisé. Ensuite les extractions ont été réalisées par macération de 72 h en renouvelant le solvant d'extraction toutes les 24 h, dans des proportions drogue/solvant 1/10 (m/V), sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière. Le renouvellement du solvant était fait en filtrant l'extrait : le marc était remis à extraire dans un volume de solvant non-saturé en composés et le filtrat était évaporé afin d'obtenir un extrait sec. Cette méthode a permis d'épuiser les drogues en composés solubles, les 3 extraits secs étant ensuite regroupés et traités comme un seul et même extrait.

2.3. Contrôle de l'identité botanique et caractérisation des drogues végétales

2.3.1. Contrôle de l'identité botanique à l'aide la Ph. Eur. 11.0

Différents contrôles ont été réalisés sur les drogues végétales en fonctions des informations disponibles sur leur provenance et sur leur caractérisation dans la littérature scientifique. Dans un premier temps, les monographies de la Ph. Eur. 11.0 ont été utilisées.

Le suc d'aloès du Cap (*Aloe ferox* Mill.) et la myrrhe (*Commiphora* sp.) ont des monographies dédiées dans la Ph. Eur. décrivant des contrôles afin de vérifier leur identité botanique. Ces monographies se trouvent en annexe. Les diagnostics macroscopiques et microscopiques ont été réalisés, ainsi que les contrôles par CCM.

2.3.2. Caractérisation des extraits et comparaison à des références par HPLC-DAD et HPLC-HRMS/MS

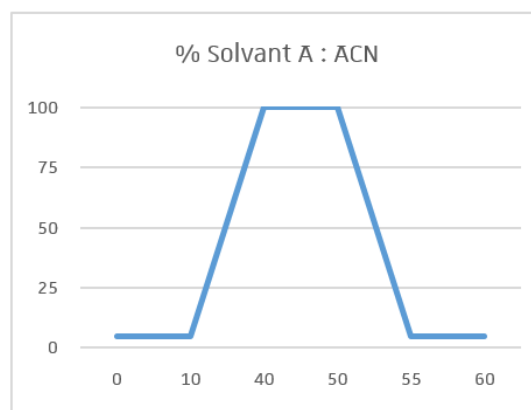
Les profils chromatographiques ont été réalisés par HPLC combinée à soit un détecteur à barrette de diode (que l'on abrégera ici par **HPLC-DAD**), soit un Spectromètre de Masse Haute Résolution avec un mode d'ionisation *electrospray* (ESI) et un analyseur *Time-of-Flight* (ToF) (que l'on abrégera ici par **HPLC-HRMS/MS**).

La gomme sarcocolle et la gomme ammoniaque ne bénéficient pas de monographie à la Ph. Eur. et, dans le cas de la myrrhe, la monographie ne permet pas d'identifier l'espèce. Aussi une caractérisation des extraits par HPLC-DAD et HPLC-HRMS/MS a été réalisée afin de pouvoir comparer leur profil chromatographique aux données de la littérature scientifique mais également à des échantillons de référence provenant de différents droguiers.

Les méthodes utilisées ont été les suivantes, en HPLC-DAD comme en HPLC-HRMS :

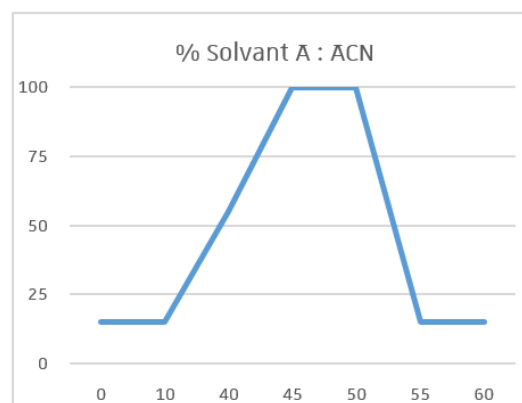
- Méthode « REFERENCE » (utilisée en première intention)

Temps (min.)	Solvant A : ACN	Solvant B : H ₂ O mQ
0	5	95
10	5	95
40	100	0
50	100	0
55	5	95
60	5	95



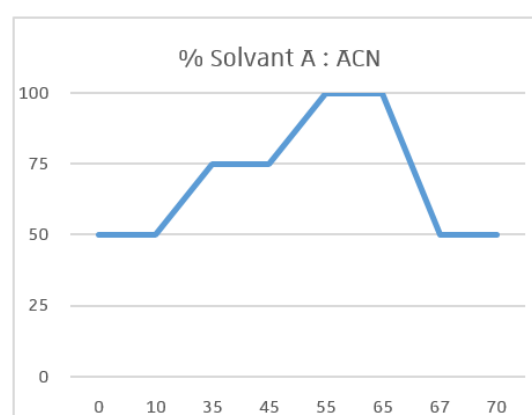
- Méthode « ALOES » (adaptée aux échantillons ALOF)

Temps (min.)	Solvant A : ACN	Solvant B : H ₂ O mQ
0	15	85
10	15	85
40	55	45
45	100	0
50	100	0
55	15	85
60	15	85



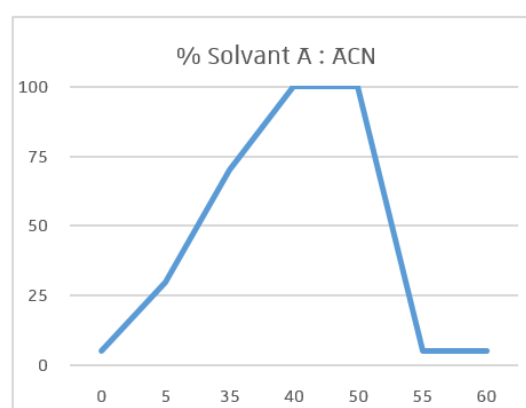
- Méthode « DOREMA » (adaptée aux échantillons AMMO mais aussi COMA & MYRR)

Temps (min.)	Solvant A : ACN	Solvant B : H ₂ O mQ
0	50	50
10	50	50
35	75	25
45	75	25
55	100	0
65	100	0
67	50	50
70	50	50



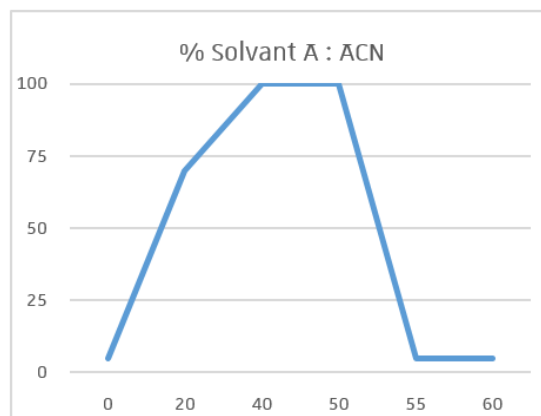
- Méthode « SARCOCOLLE-HYDRO » (essai d'optimisation pour l'échantillon SARC-EH)

Temps (min.)	Solvant A : ACN	Solvant B : H ₂ O mQ
0	5	95
5	30	70
35	70	30
40	100	0
50	100	0
55	5	95
60	5	95



- Méthode « SARCOCOLLE-LIPO » (essai d'optimisation pour les échantillons SARC-A & SARC-D)

Temps (min.)	Solvant A : ACN	Solvant B : H ₂ O mQ
0	5	95
20	70	30
40	100	0
50	100	0
55	5	95
60	5	95



La liste des méthodes utilisées pour chacun des extraits est résumée dans le **Tableau 44**. Nos échantillons et les échantillons de référence ont été analysés dans les mêmes conditions afin de permettre une comparaison.

Les analyses HPLC-HRMS/MS ont également permis de faire de la déréplication sur nos extraits, c'est-à-dire identifier une partie des molécules s'y trouvant sans avoir à passer par une étape d'isolement et de purification. L'identification de composés déjà décrits est possible en comparant à la littérature scientifique la prédiction de la formule brute (sur la base du signal m/z des ions protonés ou déprotonés) ainsi que sur les signaux m/z des ions obtenus après fragmentation. Pour cela le logiciel MZmine 3 (logiciel libre) a été utilisé ainsi que le site de ChemCalc pour la prédiction de la formule brute²⁴³. **L'identification putative de certains composés a permis d'appuyer ou non nos hypothèses sur l'identité botanique des drogues végétales.**

Tableau 44 - Méthodes HPLC utilisées pour chaque extrait

Droque	Solvant	Code	Méthodes utilisées en HPLC-DAD	Méthodes utilisées en HPLC-HRMS/MS
Suc d' <i>A. ferox</i> commercial	EtOH 70%	ALOF-EH	REF	ALOES
	EtOAc	ALOF-A		
	DCM	ALOF-D	/	/
Gomme résine de <i>C. abyssinica</i> commerciale	EtOH 70%	COMA1-EH	REF ; DOREMA	DOREMA
	EtOAc	COMA1-A		
	DCM	COMA1-D		
Gomme résine de <i>C. abyssinica</i> de référence	EtOAc	COMA2-A	DOREMA	DOREMA
Myrrhe traditionnelle (Maroc)	EtOH 70%	MYRR1-EH	REF ; DOREMA	DOREMA
	EtOAc	MYRR1-A		
	DCM	MYRR1-D		
Myrrhe de référence	EtOAc	MYRR2-A	DOREMA	DOREMA
Gomme sarcocolle (Pakistan)	EtOH 70%	SARC-EH	REF	SARCOLLE-HYDRO
	EtOAc	SARC-A	REF	SARCCOLLE-LIPO
	DCM	SARC-D		
Gomme ammoniacale traditionnelle (Maroc)	EtOH 70%	AMM01-EH	REF ; DOREMA	DOREMA
	EtOAc	AMM01-A		
	DCM	AMM01-D		
Gomme ammoniacale de référence	EtOAc	AMM03-A	DOREMA	DOREMA

Solvants utilisés : EtOH70% éthanol à 70% ; EtOAc acétate d'éthyle ; DCM dichlorométhane

2.3.3. Extraction et amplification de l'ADN de la gomme ammoniacale AMM01

2.3.3.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN s'est faite selon le protocole d'extraction d'ADN au CTAB habituellement utilisé au sein de l'UMR 7362, en adaptant l'extraction selon l'étude Alaoui *et al*, 2013²²³ sur l'extraction d'ADN de *hashish*, la résine de *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae, 1753). Cette extraction adaptée aux résines est basée sur le protocole proposé pour les matrices complexes lors d'un cours de formation du Centre commun de recherche de la Commission européenne sur l'extraction et la purification d'ADN, en 2006²²⁴.

La solution extractive a été préparée avec 14 mL de NaCl (apporte les ions Na⁺ qui vont neutraliser les phosphates de l'ADN), 2 mL d'EDTA (protège l'ADN des nucléases en liant les ions Mg⁺,

cofacteurs nécessaires à ces enzymes), 5 mL de tampon TrisHCl (pH = 8), 2 g du tensioactif bromure de cetyltriméthylammonium CTAB (forme un complexe avec l'ADN) et ajustée à 50 mL avec de l'eau distillée. Les différents éléments ont été solubilisés en chauffant à 50°C sous agitation.

Des quantités de 100 mg de gomme ammoniacque AMMO1 ont été mises dans 500 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24:1) et 500 µL de solution extractive et la préparation a été mélangée à l'aide d'un vortex. La gomme étant très hydrophobe, le chloroforme a été ajouté en même temps que la solution extractive afin de solubiliser la matrice, perturber la membrane d'éventuelles cellules, et ainsi libérer l'ADN potentiellement présent. Le chloroforme permet également d'extraire une partie des molécules présentes dans la gomme, lipides, protéines et autres impuretés, ces molécules pouvant gêner l'amplification de l'ADN²³. Après 20 minutes de déphasage et centrifugation 10 min à 13 500 rpm, la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN a été récupérée et mise à incuber à 65°C pendant 1h en agitant toutes les 10 minutes. Ensuite, 600 µL de cette phase aqueuse ont été de nouveau lavés avec 800 µL de chloroforme/alcool isoamylique. Après 20 minutes de déphasage et centrifugation 10 min à 13 500 rpm, la phase aqueuse a été récupérée.

L'ADN a ensuite été récupéré par précipitation dans l'eau en ajoutant de l'éthanol (neutralise la charge partielle de l'eau) et de l'acétate de sodium NaOAc (les ions Na⁺ neutralisent la charge négative des phosphates de l'ADN). Pour cela, 500 µL de phase aqueuse ont été vortexés avec 25 µL de NaOAc 3 M. Puis 500 µL d'éthanol à 70% à - 20°C ont été ajoutés et la préparation a été de nouveau vortexée. L'ADN a été laissé à précipiter 30 minutes à - 20°C. Après centrifugation 10 min à 13 500 rpm, les tubes ont été immédiatement mis dans un portoir réfrigéré afin d'enlever le surnageant. Puis le culot a été de nouveau précipité avec 500 µL d'éthanol à 70% à - 20°C et après centrifugation 5 min 13 500 rpm, le surnageant a été de nouveau éliminé. Les dernières traces ont été éliminées avec 10 min dans un bain à sec à 50°C. L'ARN a ensuite été éliminé à l'aide de RNase. Une solution de RNase a été diluée au 100^{ème} dans du tampon TE et 100 µL sont ajoutés sur le culot sec. Après re-solubilisation de l'ADN, la solution a été mise à l'étuve 1h à 55°C, en vortexant une fois au bout d'une demi-heure. L'ADN a été gardé dans le tampon TE à 4°C. La quantité d'ADN a été mesurée via la fluorescence de la solution, l'ADN étant révélé à l'aide d'un réactif Qubit et la fluorescence résultante mesurée avec un fluorimètre Qubit.

Au vu du peu de quantité d'ADN obtenue, différentes stratégies de concentration ont été testées. Dans un premier temps, les différents extraits d'ADN déjà réalisés ont été mélangés dans un même tube, puis la dernière étape de précipitation à l'alcool du protocole détaillé précédemment a été appliquée. Puis, dans un deuxième temps, le kit d'extraction d'ADN de plante DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Pays-Bas) a été utilisé.

2.3.3.2. Amplification de l'ADN

L'amplification s'est faite par *Polymerase Chain Reaction* PCR (ou Amplification en Chaîne par Polymérase ACP en français) sur la région ITS.

Les régions *Internal Transcribed Spacer* ITS (ou Espaceur Interne Transcrit en français) désigne la portion d'ADN nucléaire ribosomique non-codant située *entre* les gènes de la petite et de la grande sous-unité de l'acide ribonucléique ribosomique. Ces régions sont utilisées pour l'étude phylogénétique des eucaryotes et notamment pour le genre *Ferula*, elle présente donc l'avantage d'avoir été séquencée pour beaucoup d'espèces du genre^{178,244-246}. Dans un premier temps l'amplification s'est faite pour obtenir la régions ITS en entier, puis seulement sur l'ITS2 (**Figure 99**), une partie de la région ITS de plus petite taille (environ 250 paires de bases) et donc plus adaptée aux échantillons dont l'ADN est dégradé, comme nous le supposons pour la gomme ammoniacque traditionnelle AMM01.

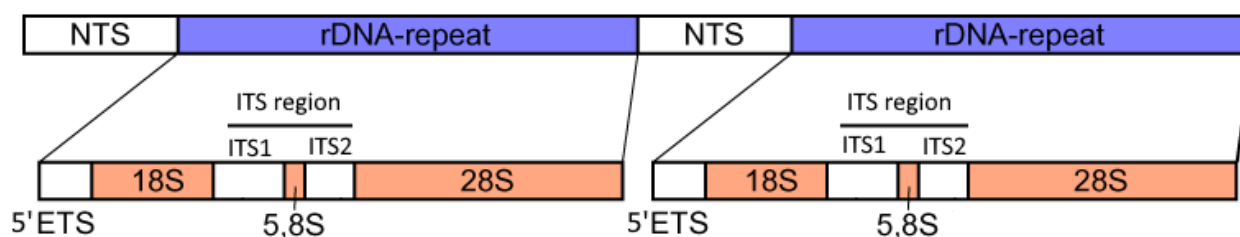


Figure 99 – Organisation des ADN ribosomiaux eucaryotes nucléaires : les gènes codant l'ARN ribosomal sont organisés en tandem, chaque cluster contenant le gène codant l'ARN 18S de la petite sous-unité du ribosome, l'Internal Transcribed Spacer ITS1, le gène codant l'ARN 5,8S de la grande sous-unité du ribosome, l'Internal Transcribed Spacer ITS2 et le gène codant l'ARN 26 ou 28S de la grande sous-unité du ribosome

La PCR est une technique permettant d'obtenir de grande quantité d'une séquence ADN spécifique à partir d'un échantillon. Pour cela on dénature l'ADN double brin à 95°C, puis on hybride les amorces ITS à 70 °C. Ici des amorces ITS de White *et al*, 1990²²⁵ et des amorces ITS2 de Chen *et al*, 2010²²⁶ ont été utilisées. Puis la séquence est complétée à partir de cette amorce en utilisant les oligonucléotides présents dans le milieu de réaction et une polymérase bactérienne capable de fonctionner à haute température, la Taq polymérase. Ici 30 cycles ont été réalisés à l'aide d'un thermocycleur.

Une fois la séquence amplifiée, elle est séquencée à l'aide de la méthode de Sanger et comparées aux bases de données disponibles comme GenBank. Malheureusement la quantité et la qualité de l'ADN extrait ne nous a pas permis d'aller jusqu'à cette étape.

3. Tests sur cellules eucaryotes

Afin de poursuivre l'étude de ces remèdes du côté de l'hôte, deux types cellulaires ont été utilisés afin de déterminer la toxicité des différents ingrédients sur des cellules eucaryotes et leur effet sur l'inflammation (extraits végétaux et sel de cuivre). Ces expériences ont été réalisées au sein de l'UMR 7199 – Equipe 3Bio par Geoffrey Bianchi et Camila Cevallos, deux stagiaires en deuxième année de Master sous la tutelle de la Pr. Sylvie Fournel (UMR 7199) et du Dr. Pierre Fechter (UMR 7242), avec l'encadrement de Mme Cendrine Seguin (UMR 7199). Les protocoles rapportés ci-dessous sont tirés de leurs travaux de stage et des rapports communiqués par l'équipe. Les différents tests ont été réalisés sur les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues et sur l'acétate de cuivre, sur des macrophages murins RAW 264.7 et des fibroblastes murins Swiss 3T3.

Les différents extraits secs ont été resolubilisés dans du DMSO à 100 mg/mL puis filtrés sur une membrane PVDF dotée de pores de 0,1 µm (Merck-millipore). L'acétate de cuivre a quant à lui été solubilisé dans l'eau. Toutes les solutions utilisées en culture proviennent de Sigma Aldrich à l'exception du sérum de veau fœtal (SVF) qui provient de chez Gibco.

3.1. Culture cellulaire

Les macrophages murins RAW 264.7 (ATCC TIB-71TM) ont été cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose*) contenant de la glutamine stabilisée, 5% de sérum de veau fœtal (VF), 100 U/ml de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine. Les fibroblastes NIH3T3 ont été cultivées en plaque 96 puits, avec $2,5 \cdot 10^4$ cellules par puits dans du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF Gibco) et un mélange pénicilline (100 U/ml) /streptomycine (0,1 mg/ml) en « prophylaxie ». Les conditions de culture étaient 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

Une fois que les cellules adhérentes ont atteint une confluence¹ d'environ 90%, le milieu DMEM était retiré et la boîte de culture était rincée deux fois avec 5 mL de tampon phosphate salin PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Les macrophages étaient ensuite détachés par incubation dans une solution de Trypsine-EDTA (0,5 g/L de Trypsin, 10 mM EDTA) pendant 5 minutes à 37°C. Les cellules ont été centrifugées en PBS 5 minutes à 200 g. Après comptage, les cellules ont ensuite été resuspendues dans du milieu de culture complet.

¹ La confluence est le degré d'écartement qui existe entre des cellules adhérentes cultivées en monocouche, 100 % de confluence correspondant à un tapis cellulaire sans interstice entre les cellules.

Les cellules ont alors été incubées avec les différents extraits ou l'acétate de cuivre en plaque 96 puits à fond plat dans du DMEM de manière à $5 \cdot 10^4$ cellules par puits. Les échantillons à tester ont ensuite été ajoutés, à différentes concentrations selon les tests. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24h à 72h (*scratch tests*) dans un volume total de 100 µL/puit.

Pour les tests d'inhibition de la réponse inflammatoire, les macrophages ont été incubées avec du lipopolysaccharide LPS à 50 ng/mL 4h après la mise en contact des extraits ou du cuivre avec les cellules.

Lors de ces expérimentations, la DO a été lue à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre SAFAS FLX-Xenius. Les figures ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism, de même que les tests statistiques (tests ANOVA à un seul facteur avec un seuil de signification $\alpha = 0,05$).

3.2. Tests de cytotoxicité (test MTS)

La toxicité des extraits et du sel de cuivre sur les macrophages et les fibroblastes a été évaluée en mesurant l'activité mitochondriale au bout des 24h d'incubation, sur des gammes de concentrations allant de 7,812 µg/mL à 500 µg/mL pour les extraits et de 0,0625 à 4 mM pour l'acétate de cuivre.

Pour cela, l'activité des enzymes déshydrogénases NADP-H dépendantes a été dosée par test MTS à l'aide du test commercial CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation (Promega). Ce test consiste à mettre en contact un sel de dérivé de tétrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium] avec les enzymes mitochondriales afin de réduire ce dernier en colorant de type formazan. Après 24 h d'incubation, les surnageants ont été retirés et les cellules incubées avec 100 µL d'une solution de tétrazolium diluée au 1/5 dans du PBS pendant 1 h à 37°C. La DO a ensuite été lue à 490 nm et 700 nm. Le témoin positif correspondant à 100% de viabilité a été réalisé avec des cellules non-traitées NT, incubées uniquement en présence de milieu. Le témoin négatif correspondant à 100% de mortalité a été réalisé en incubant les cellules avec 10% de DMSO. Le pourcentage de viabilité des cellules en présence des extraits résulte du rapport de la $(DO_{490nm} - DO_{700nm})$ des cellules incubées avec l'échantillon sur la $(DO_{490nm} - DO_{700nm})$ des cellules NT.

3.3. Test de Griess : mesure de la production d'oxyde nitrique NO

La production de NO par les macrophages activés peut être mesurée en dosant sa forme stabilisée (l'ion nitrite NO_2^-) dans le surnageant au bout de 24h d'incubation à l'aide du réactif de

Griess. Les cellules ont été incubées avec les extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues, sur une gamme de concentrations allant de 5 µg/mL à 500 µg/mL.

Le réactif de Griess a été préparé en laboratoire en mélangeant une solution de *p*-aminobenzene sulfonamide à 58,1 mM dans de l'acide acétique 30% et une solution de *N*-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride à 3,9 mM dans de l'acide acétique 60%, dans un rapport 1:1 (v/v). Le dosage des ions nitrites a été réalisé en plaque 96 puits en mélangeant 40 µL de surnageant des cultures de macrophages (incubés avec les extraits, l'acétate de cuivre ou le LPS) et 60 µL du réactif préparé, avant de lire la DO à 543 nm. Les concentrations ont été évaluées à l'aide d'une gamme de concentration de nitrites de sodium NaNO₂ allant de 100 µM à 1,6 µM. Le témoin positif correspondant à une production induite par 50 ng/mL de LPS.

3.4. Test ELISA : mesure des cytokines TNF-α

L'activation des macrophages induit la production de TNF-α, une cytokine *pro-inflammatoire*, que l'on détecte aisément dans les surnageants de culture par la technique ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Des anticorps de capture clone 1F3F3D4 et de détection clone XT 3/XT22 (Biolegends) ont été utilisés, ainsi qu'une solution standard de TNF-α (Abcam).

Pour tester l'effet pro-inflammatoire des extraits végétaux à l'acétate d'éthyle, les macrophages ont été incubés en présence des extraits seuls (125 µg/mL) et pour tester l'effet anti-inflammatoire, 50ng/mL de LPS ont été ajoutés 4h après les extraits (125 µg/mL ou 62,5 µg/mL). Des cellules incubées uniquement avec du milieu PBS ont été utilisées comme référence, tandis qu'une culture activée par LPS a servi de contrôle positif de l'activation pro-inflammatoire.

Après adhésion des anticorps de capture du TNF-α (clone 1F3F3D4 à 1 µg/mL dans du tampon carbonate/bicarbonate de sodium 0,05 M pH 9,6) dans les puits d'une plaque 96 puits pendant une nuit à 4°C et 2 lavages avec du tampon PBS à 0,05% de Tween 20 (tampon de lavage), les puits étaient saturés avec du tampon PBS à 0,05% de Tween 20 et à 1% d'albumine sérique bovine BSA, 1h à 37°C.

Après lavage avec du tampon de lavage, 50 µL de surnageant des cultures de macrophages dilués étaient ajoutés dans chaque puit, avant de remettre la plaque à incuber 2h à 37°C. Après lavage, 100 µL d'anticorps de détection anti-TNF-α couplé à la biotine à 0,5 µg/mL ont été ajoutés dans chaque puit, avant de remettre la plaque à incuber 1h à 37°C. Après lavage, la révélation des anticorps de détection a été réalisée avec 100 µL d'avidin HRP (eBioscience) pendant 45 minutes à 37°C, avant d'ajouter une solution de tétraméthylbenzidine (Sigma-Aldrich) à 1,25 mM et de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 13,05 mM dans un tampon citrate 0,1 M à pH 5. La réaction est stoppée avec une solution d'HCl à 1 M et la DO est lue à 450 nm.

Pour la gamme d'étalonnage, le même protocole a été appliqué en remplaçant le surnageant par une gamme de concentration d'une solution standard de TNF- α (Abcam).

3.5. Test de cicatrisation (*scratch test*) sur fibroblastes murins

Le potentiel effet cicatrisant des extraits à l'acétate d'éthyle des différentes drogues végétales a été mesurée selon la méthode du *scratch test*, consistant à mesurer la migration au cours du temps de fibroblastes murins Swiss 3T3 incubés avec la substance à tester. Ici, du surnageant de macrophages murins, eux-mêmes incubés en présence de ces extraits a été utilisé.

Dans un premier temps, des macrophages murins RAW 264.7 ont été incubés en présence des extraits à 125 $\mu\text{g/mL}$ ou à 62,5 $\mu\text{g/mL}$, avec ou sans LPS (mêmes conditions que celles décrites dans la partie 3.1). Après 3 jours d'incubation, les surnageants contenant les extraits, le LPS et les molécules sécrétées par les macrophages ont été prélevés.

Dans un second temps, les fibroblastes ont étéensemencées en plaque 96 puits. Après 24h à 37°C, les tapis cellulaires au fond de chaque puits ont été scindés en deux à l'aide d'un cône de 10 μL , générant une blessure d'une largeur moyenne de 1000 pixels au grossissement x20. Les tapis cellulaires ont ensuite été lavés au tampon phosphate salin PBS pour retirer les cellules flottantes, puis les surnageants des macrophages RAW 264.7 incubés avec les extraits ont été ajoutés pendant 16 h.

Des coupures ont été réalisées sur des cultures fibroblastes incubés uniquement avec du milieu PBS en guise de témoin négatif. Une culture de fibroblastes incubée 24h avec le surnageant de macrophages incubés avec du LPS a été utilisé comme témoin positif de la réponse inflammatoire.

À $t = 0$ et après 16 h, les cultures de fibroblastes ont été photographiées à l'aide d'un microscope optique inversé (Carl Zeiss Microscopy) équipé d'une caméra CS5 (ProgRes, Jenoptik) et du logiciel Leica Microsystems. La surface de la blessure a été mesurée en nombre de pixel moyen avec le logiciel Image J (plugin *Wound Healing Size Tool*) afin d'estimer la migration des fibroblastes entre les deux bords de la « coupure ».

4. Tests sur bactéries

Les tests antibactériens extraits, fractions et composés ont été réalisés selon plusieurs méthodes au sein de l'UMR 7242 – *Equipe Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications*, dont une partie par l'ingénieure Régine Janel.

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne : la diffusion sur gel d'agar, une méthode qualitative fréquemment utilisée pour le criblage, et la microdilution en bouillon, une méthode davantage quantitative permettant de déterminer une Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), soit la plus petite concentration en substance testée à partir de laquelle on ne voit plus de développement bactérien²⁴⁷. Le criblage des extraits a été réalisé par diffusion sur gel d'agar sur une partie des souches ($n = 1$) et a été confirmé par microdilution en bouillon sur toutes les souches ($n \geq 3$). L'évaluation des fractions, sous-fractions et composés s'est ensuite fait uniquement par microdilution en bouillon, en déterminant à chaque fois la CMI.

4.1. Souches bactériennes

Les tests ont été conduits sur les souches Gram + suivantes :

- *Staphylococcus aureus* HG001
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC35983
- *Staphylococcus epidermidis* HUS
- *Staphylococcus hominis* HUS
- *Staphylococcus haemolyticus* HUS
- *Corynebacterium striatum* HUS

Ainsi que les souches Gram – suivantes :

- *Escherichia coli* MG1655
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15692

Les souches HUS proviennent des collections des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg HUS.

Les souches utilisées étaient conservées à -80°C dans 1 mL d'un mélange 50/50 de milieu MH-II et de glycérol 50%. Afin de préserver la stérilité de ces stocks, un prélèvement était fait sur les bactéries encore congelées puis étalé sur un gel d'agar MH-II, avant d'être incubé une nuit à 37°C . La culture sur boîte ainsi obtenue était conservée à 4°C pendant 1 mois. Ce stock intermédiaire a été utilisé pour les différents prélèvements nécessaires aux précultures.

4.2. Milieux de culture

Les tests ont été réalisés dans du milieu Muller Hinton II ajusté en cations (Becton, Dickinson & Co). De l'agar agar (Euromedex) a été utilisé pour préparer les gels et les milieux solides comme liquides ont été stérilisés par autoclave.

Le bouillon MH-II utilisé pour les précultures ainsi que les microdilutions en bouillon a été préparés avec du milieu Muller Hinton II ajusté en cations à 22 g/L dans de l'eau distillée, avant d'être stérilisé.

Les gels d'agar MH-II ont été préparés avec du milieu Muller Hinton II ajusté en cations à 22 g/L et de l'agar agar à 15 g/L dans de l'eau mQ, avant d'être stérilisé. Les boîtes ont été coulées en liquéfiant le gel au micro-onde afin de le répartir dans des boîtes de Pétri stériles (15 mL/boîte).

4.3. Précultures

L'inoculation des gels d'agar et des bouillons a été faite à partir de précultures bactériennes. Un prélèvement était fait sur les stocks de souches à 4 °C et mis dans 5 mL de bouillon MH-II avant d'être incubé à 37°C, sous agitation à 225 rotations par minute (rpm) et pendant une nuit, soit entre 16 et 18h. L'absorbance ou Densité Optique (DO) était ensuite lue à 600 nm pour chaque préculture, après une première dilution par 10 afin d'avoir une DO > 1. Les précultures étaient ensuite diluées avec du bouillon MH-II pour atteindre la taille d'inoculum recommandée pour le test prévu.

4.4. Détermination du facteur de corrélation entre la DO et la densité bactérienne

Tout d'abord la corrélation entre la densité optique DO_{600 nm} et la densité bactérienne a été déterminée pour chaque souche, afin de pouvoir suivre les recommandations du CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) et de l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Ces recommandations ont pour but de mettre en place une standardisation des tests d'activité antibactérienne afin d'évaluer si une bactérie est sensible ou non à un composé^{247,248}. Ces protocoles sont proposés en première intention afin de permettre une meilleure reproductibilité des expérimentations entre laboratoires et donc une comparaison des résultats, les conditions de cultures influençant les activités observées^{247,248}.

La taille finale de l'inoculum recommandée est de 1 à 2.10⁸ Unités Formant des Colonies/mL (UFC/mL) pour les cultures sur gel d'agar et de 5.10⁵ UFC/mL pour les cultures en bouillon^{247,248}. Le

coefficient de corrélation entre la DO et la densité bactérienne exprimée en UFC/mL a été déterminée pour chaque souche puis appliqué à ces deux valeurs.

Pour cela, des boîtes de gélose MH-II/agar ont été inoculées par stries, à raison de 2 gélose par souches. Les boîtes ont été incubées 18 h à 37 °C puis des précultures ont été lancées à partir de chacune d'entre elles, en prélevant 5 colonies avec le même aspect morphologique afin d'éviter la sélection d'un génotype atypique. Une fois l'incubation finie, la DO des 3 précultures de chaque souche a été mesurée à 600 nm (avec une dilution préalable par 10 pour rester dans la fenêtre de linéarité). Les suspensions bactériennes ont ensuite été diluées de manière à avoir la gamme de dilution suivante : $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$ et $1:10^7$, et 100 μ L de ces différentes dilutions ont été étalés sur gel d'agar MH-II. Les gels ont été incubés une nuit à 37 °C et le lendemain, les colonies ont été dénombrées sur chacune des boîtes, soit pour les 4 dilutions des 3 cultures de chaque souche. Les facteurs de corrélation entre la DO et la densité bactérienne ont été calculés comme suit, à partir des boîtes ayant entre 100 et 400 colonies (en dehors de cette fenêtre, les données sont considérées comme non-représentatives) :

- 1) Calcul de N, le nombre d'Unités Formant des Colonies par mL de la préculture non-diluée :

$$N = \frac{C \times 10}{10^{-D}}$$

avec C le nombre de colonies sur le gel d'agar (compris entre 100 et 400) et 10^{-D} la dilution utilisée pour ce gel d'agar (10^{-4} pour la dilution $1:10^4$).

- 2) Calcul de F, le facteur de corrélation :

$$F = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n f \quad \text{avec} \quad f = \frac{N}{DO_{non-diluée}}$$

Les facteurs de corrélation obtenus ainsi que la valeur des $DO_{600 \text{ nm}}$ utilisées pour les tests de diffusion sur agar et de microdilution en bouillon sont résumés dans le **Tableau 45**. On constate que la DO correspondant à la densité bactérienne varie bien entre les souches, dans les conditions testées. La détermination cette corrélation va donc permettre de tester les différentes souches à la même densité et donc ne pas sous- ou surestimer leur sensibilité face à un extrait ou un composé. Ces DO ont été utilisées pour toutes les expérimentations suivantes.

Tableau 45 - Facteurs de corrélations DO/densité bactérienne pour chacune des souches testées et $DO_{600\text{ nm}}$ correspondantes aux densités bactériennes préconisée pour les différents tests utilisés.

Souches	Facteur de corrélation	Ecart-type standard	Bouillon	Gel d'agar	
			$DO_{600\text{ nm}}$ (5.10^5 UFC/mL)	$DO_{600\text{ nm}}$ (1 à 2.10^8 UFC/mL)	
<i>S. aureus</i>	$5,58.10^8$	$1,17.10^8$	$8,96.10^{-4}$	$1,79.10^{-1}$	$3,58.10^{-1}$
<i>S. epidermidis</i>	$9,06.10^8$	$2,38.10^8$	$5,52.10^{-4}$	$1,10.10^{-1}$	$2,21.10^{-1}$
<i>S. hominis</i>	$1,00.10^9$	$9,04.10^7$	$1,12.10^{-3}$	$2,24.10^{-1}$	$4,48.10^{-1}$
<i>S. haemolyticus</i>	$4,46.10^8$	$7,09.10^7$	$3,01.10^{-3}$	$6,02.10^{-1}$	$1,20.10^0$
<i>C. striatum</i>	$2,09.10^8$	$2,07.10^7$	$2,39.10^{-3}$	$4,78.10^{-1}$	$9,56.10^{-1}$
<i>E. coli</i>	$5,42.10^8$	$1,06.10^8$	$9,22.10^{-4}$	$1,84.10^{-1}$	$3,69.10^{-1}$
<i>P. aeruginosa</i>	$1,75.10^9$	$4,46.10^8$	$2,86.10^{-4}$	$5,72.10^{-2}$	$1,14.10^{-1}$

4.5. Méthode de diffusion sur gel d'agar

Le test de diffusion sur gel d'agar est un test fréquemment utilisé consistant à inoculer un gel de milieu nutritif et d'agar puis d'y déposer les échantillons à tester avant d'incuber le tout. Les échantillons sont généralement sous la forme de disques de papier filtre préalablement imbibés du composé à une concentration connue puis séchés. Le composé contenu dans le disque diffuse plus ou moins dans le gel en fonction de ses propriétés physico-chimiques (milieu aqueux). Après incubation, les bactéries se sont assez développées au point d'être visibles à l'œil nu. Des zones d'inhibition de la croissance bactérienne sont alors observées ou non autour des disques, plus ou moins étendues en fonction de l'effet antibactérien du composé, de sa concentration initiale dans le disque mais également en fonction de sa capacité à diffuser dans le gel. Ainsi les diamètres des zones d'inhibitions ne seront comparables qu'entre des disques imbibés du même composé à la même concentration entre différentes souches, mais pas entre deux composés différents car une différence de diamètre pourrait venir d'une différence de diffusion dans le gel. Nous considérerons donc ce test comme purement qualitatif, indiquant s'il y a une activité antibactérienne ou non à une concentration donnée sur une souche donnée, par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition.

Dans le cas de cette étude, le test par diffusion sur gel d'agar a principalement été utilisé pour faire un premier criblage les extraits de drogues végétales. Pour ces matrices complexes, il a été décidé de travailler avec des gouttes de volume constant plutôt que des papiers imbibés, pour éviter tout problème de solubilité. Chaque extrait a été solubilisé dans du diméthylsulfoxyde (DMSO)

à 100 mg/mL, en chauffant à 37°C et avec une courte sonication lorsque l'extrait ne se solubilisait pas totalement. Deux dilutions ont été préparées à partir de cette solution mère : une solution à 50 mg/mL et une à 20 mg/mL. Les précultures ont été diluées jusqu'à avoir une densité bactérienne comprise entre 1 et 2.10^8 UFC/mL pour chacune des souches, avant d'en étaler 300 µL sur des gels d'agar MH-II préalablement coulés. Après 15 minutes de séchage, des dépôts de 5 µL ont été faits pour les 3 solutions (100 mg/mL, 50 mg/mL et 20 mg/mL soit des dépôts de 500 µg, 250 µg et 100 µg) ainsi qu'un dépôt de 5 µL de DMSO (témoin négatif). Après séchage des dépôts, les boîtes ont été mises à incuber à 37 °C pendant 24 h. La lecture s'est faite par l'observation ou non d'une zone d'inhibition autour du dépôt.

4.6. Méthode de microdilution en bouillon et détermination des CMI

Le test de microdilution en bouillon est également un test couramment utilisé, consistant à faire une gamme de concentration du composé à tester dans de petits volumes, généralement les puits d'une plaque 96 puits (300 µL), avant d'inoculer chaque puit et d'incuber. Les bactéries se développent ou non en fonction de la concentration du composé et à la fin de l'incubation, les puits où les bactéries ont pu se multiplier sont visibles à l'œil nu. Il est alors possible de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) pour ce composé sur cette souche, soit le puit clair (sans population de bactéries visible à l'œil nu) ayant la plus petite concentration²⁴⁷. Il est également possible d'incuber tout en lisant la plaque à 600 nm à intervalle régulier à l'aide d'un lecteur de plaque (Técan, modèle Infinite 200 pro avec le logiciel Magellan) pour suivre le développement bactérien, ou bien de confirmer la lecture à l'œil nu par une lecture au Técan à la fin de l'incubation. Ce n'est possible que si la substance testée est bien soluble dans le puit et ne précipite pas, ce qui n'a pas toujours été le cas des échantillons testés.

Dans le cas de cette étude, le test de microdilution en bouillon a été utilisé aussi bien sur des extraits que des fractions ou des composés isolés. Les lectures au Técan pour les matrices complexes se sont fréquemment révélées ininterprétables, les CMI rapportées sont donc basées uniquement sur la lecture à l'œil nu. Chaque extrait, fraction ou composé a été solubilisé dans du DMSO, à des concentrations entre 100 et 25 mg/mL en fonction de la solubilité et de la gamme réalisée. Différentes gammes de concentrations ont ensuite été préparées, plus ou moins élevées en fonction de s'il s'agissait d'un extrait, une fraction ou un composé isolé (**Tableau 46**). Ces gammes ont été réalisées dans des plaques 96 puits par des dilutions de pas de 2 dans du MH-II. La quantité de DMSO dans les puits n'excédait pas 1 % afin de ne pas causer de toxicité (DMSO toxique pour les bactéries au-delà de 1 % selon les souches²⁴⁹). Les pré-cultures ont ensuite été diluées jusqu'à avoir une densité bactérienne d'environ 5.10^5 UFC/mL, avant d'en déposer 100 µL dans chaque puit de la gamme de concentrations, diluant les substances aux concentrations finales résumées dans le

Tableau 46. Chaque ligne était composée de la gamme de concentration sur 10 puits, d'un puit témoin négatif, avec uniquement du MH-II à la place de la substance à tester afin de vérifier le bon développement de la bactérie, et d'un puit blanc, avec uniquement du MH-II afin de vérifier qu'il n'y a pas de contaminations dans la plaque (**Figure 100**). Les plaques 96 puits ont ensuite été mises à incuber 24h, à 37 °C et sous agitation à 225 rpm afin de permettre l'oxygénation du milieu. Comme évoqué précédemment, la lecture des CMI s'est principalement faite à l'œil nu.

Tableau 46 - Gammes de concentrations utilisées en fonction des éléments testés

Gammes	Concentration finale pour chaque n° de puits									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extraits	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	1,95	0,98
Extraits actifs	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	1,95	0,98	0,49
Fractions & composés	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	1,95	0,98	0,49	0,25	0,12

Plus l'échantillon testé était concentré et/ou actif, plus on baissait la gamme.

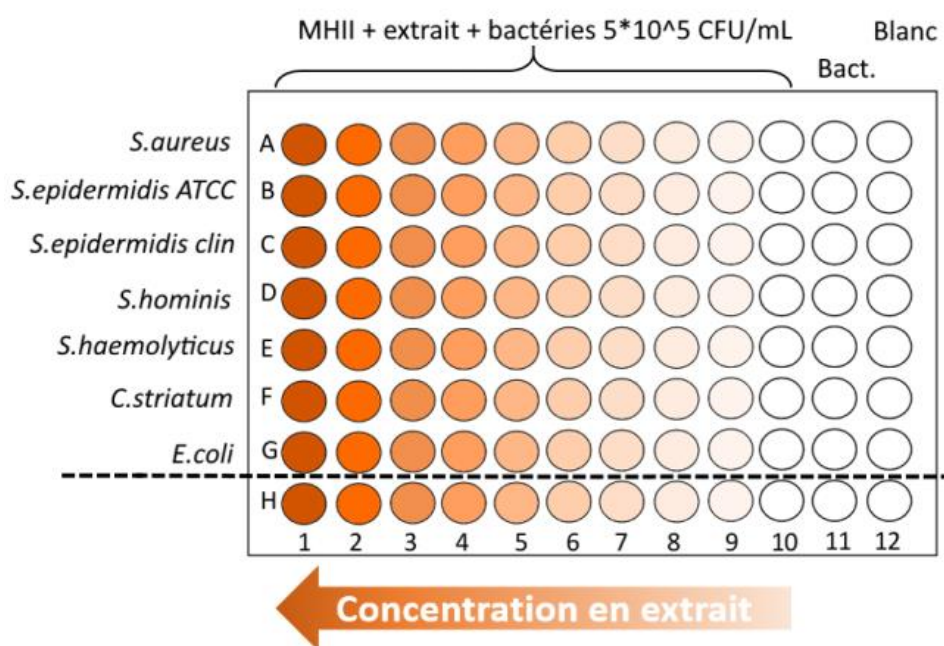


Figure 100 – Exemple d'organisation d'une plaque 96 puits pour la détermination des CMI d'un extrait

4.7. Détermination des indices de sélectivité IS

L'indice de sélectivité IS (*selectivity index* SI en anglais) permet d'estimer si une substance ou un composé est plus actif sur la cible que toxique sur l'organisme ou la cellule hôte. Il s'agit du rapport de la toxicité sur l'activité : $IS = CI_{50} / CMI^{228}$ avec CI_{50} la viabilité cellulaire sur des macrophages murins et CMI l'activité antibactérienne sur les différentes souches. Les indices de sélectivité *in vitro* ont été calculés pour l'acétate de cuivre $Cu(OAc)_2$ et les extraits à l'acétate d'éthyle de la gomme ammoniacale traditionnelle AMM01-A et du mélange des 4 drogues végétales RDV-A.

Plus l'indice sera haut, plus la substance testée est active plutôt que toxique et donc plus son activité est intéressante. Certaines études estiment un extrait actif et non toxique à une valeur $IS > 1$ ou > 2 tandis que d'autres préconisent un seuil ≥ 10 pour considérer un échantillon sélectivement bioactif, sur le modèle de ce qui se fait pour l'activité anti-cancer²²⁸.

5. Fractionnement des extraits végétaux : méthodes séparatives

Lors du fractionnement bioguidé, plusieurs méthodes séparatives ont été utilisées :

- Partition liquide/liquide
- Chromatographie en phase liquide d'adsorption sur gel de silice SiO_2 , sur colonne ouverte et sur une chaîne Flash (LC-Flash)
- Chromatographie en phase liquide de partage à haute performance, semi-préparative, en phase inverse sur gel de silice greffée C_{18} (HPLC semi-préparative).

Ces méthodes sont détaillées dans les paragraphes suivants. Le fractionnement et l'isolement des composés ont été réalisés avec l'aide de Megi Gjokolaj, stagiaire en deuxième année de Master, et de Capucine Braillon, doctorante en première année, toutes deux au sein de l'UMR 7200 sous la direction de la Pr. Catherine Vonthron-Senecheau et avec l'encadrement du Dr. Sergio Ortiz.

5.1. Partition liquide/liquide

Il s'agit d'extractions liquide/liquide successives sur un extrait resolubilisé dans l'eau avec des solvants de polarité croissante non-miscible à l'eau, ici le cyclohexane, le DCM, l'EtOAc et le butanol, dans un rapport eau/solvant organique de 4/1 v/v et avec une concentration d'extrait de 1 g pour 40 mL d'eau. Après décantation dans une ampoule à décanter, la fraction organique est récupérée, séchée et conditionnée tandis que la fraction aqueuse est mise en contact avec le solvant

organique suivant. A la fin, les composés de l'extrait sont donc répartis en 5 fractions en fonction de leur affinité avec les solvants (phénomène de partage).

La partition liquide/liquide a été faite sur l'extrait hydroalcooliques de la gomme ammoniacque AMM01-EH. Les fractions obtenues ont ensuite été testées par microdilution en bouillon sur différentes souches bactériennes.

5.2. Chromatographies en phase liquide, généralités

La chromatographie en phase liquide est une méthode séparative basée sur l'interaction des composés avec une phase stationnaire et une phase mobile, la phase mobile entraînant les composés au travers de la phase stationnaire²⁵⁰. Il existe plusieurs types de LC : la chromatographie d'adsorption et le chromatographie de partage ont été utilisées. Dans ces deux méthodes, la séparation des composés se fait selon leur polarité.

La chromatographie d'adsorption est basée sur l'équilibre entre l'adsorption des composés sur une phase stationnaire solide et leur élution par une phase mobile liquide. La phase stationnaire ou adsorbant est alors un solide présentant de nombreux sites d'adsorption polaires, finement divisé afin d'offrir une grande surface de contact. Le solide utilisé lors de cette étude est le gel de silice (SiO_2) où les sites polaires sont les groupes silanol présents en surface des grains. La phase mobile est quant à elle un solvant ou mélange de solvants qui va éluer plus ou moins fortement les composés en fonction de : 1) leur affinité mutuelle basée sur la polarité (la phase mobile va avoir des interactions compétitives avec la phase stationnaire pour se lier aux composés) et 2) leur adsorption respective sur le gel de silice (la phase mobile va avoir des interactions compétitives avec les composés pour se lier sur les sites d'adsorption de la phase stationnaire). Des solvants plutôt apolaires ont été utilisés afin de ne pas complètement occuper les sites d'adsorption et permettre l'interaction des composés avec le gel de silice, mais assez polaires pour être capable d'éluer les composés : ces solvants sont détaillés dans les parties suivantes pour la séparation sur colonne ouverte et par LC-Flash.

La chromatographie de partage est basée sur la distribution des composés entre une phase mobile et une phase stationnaire²⁵⁰. La phase stationnaire est là aussi un solide finement divisé pour une plus grande surface de contact et peut se décliner de deux manières :

- Phase normale : la phase stationnaire est polaire et la phase mobile plutôt apolaire. Les composés interagissent avec la phase stationnaire notamment par liaison hydrogène, les composés polaires sont davantage retenus et les composés apolaires élués en premiers.
- Phase inverse : la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile plutôt polaire. Les composés interagissent alors avec la phase stationnaire notamment par interactions

hydrophobes lorsque la phase mobile comprend de l'eau, les solutés apolaires sont alors davantage retenus par et ce sont les composés polaires qui sont élués en premiers. Seule cette dernière méthode a été utilisée ici au vu de son caractère quasiment universel²⁵⁰, avec de la silice greffée avec des groupes apolaires octadécyles (C₁₈).

La mise au point de système d'élution, à savoir quels solvants dans quelles proportions, a été commencée en amont par des méthodes analytiques (CCM, HPLC) avant d'être optimisée directement sur les méthodes séparatives utilisées. Pour les chromatographies d'adsorption, des CCM ont été réalisées sur des plaques de gel de silice, tandis que pour les chromatographies de partage sur LC-Flash, des plaques de gel de silice greffée C₁₈ ont été utilisées. Les mélanges de solvants permettant la meilleure séparation avec les meilleurs temps de rétention (composé d'intérêt situé à un rapport frontal R_f d'environ 0,3) ont été retenus. Pour les chromatographies de partage sur HPLC semi-préparative, le système d'élution utilisé sur l'HPLC analytique « DOREMA » a été repris puis adapté.

5.3. Chromatographie en phase liquide sur colonne ouverte

La séparation sur colonne ouverte présentée dans cette thèse a été réalisée sur la fraction F2 de l'extrait AMMO1-EH, elle-même obtenue par LC-Flash. L'élution a été réalisée avec un système dichlorométhane DCM/ acétate d'éthyle EtOAc, initialement dans les proportions 95/5 (v/v) avec des paliers isocratiques de 2 volumes de colonne tous les 1% jusqu'à 90/10 (v/v).

5.4. Chromatographie en phase liquide sur Flash (LC-Flash)

La chromatographie en phase liquide sur Flash est aussi appelée chromatographie en phase liquide à moyenne pression. Là où sur la colonne ouverte la phase mobile traverse la phase stationnaire par gravité, en LC-Flash elle est poussée par une pompe au travers d'un gel de silice bien plus compact, permettant ainsi une meilleure séparation, plus rapide.

Les mêmes éluants qu'en colonne ouverte ont été utilisés, cette fois-ci par gradient en faisant augmenter la proportion du solvant avec la plus grande force éluante au cours du temps. Le débit était adapté en fonction du grammage de la colonne (5 mL/min pour 4 g de gel et 20 mL/min pour 12g). Les systèmes suivants ont été utilisés : (page suivante)

Tableau 47 – Méthode LC-Flash « *FLASH_AMMO_12G* »

Temps (min)	% Solvant A : EtOAc	% Solvant B : cyclohexane	%Solvant C : MeOH
0	20	80	0
8	20	80	0
10	30	70	0
15	30	70	0
16	50	50	0
22	50	50	0
23	100	0	0
26	100	0	0
27	90	0	10
32	90	0	10

Tableau 48 – Méthode LC-Flash « *FLASH_AMMO_F1* »

Volume de colonne	% Solvant A : EtOAc	% Solvant B : cyclohexane
0	5	95
2	7	93
7	10	90
12	10	90
17	15	85
22	15	85
27	20	80
32	20	80
35	30	70
38	30	70

5.5. Chromatographie en phase liquide à haute performance semi-préparative (HPLC semi-préparative)

Une colonne préparative Zorbax Eclipse SB-C₁₈ a été utilisée (5 µm, 21,2 x 250 mm, Agilent Technologies) sur une chaîne PLC équipée d'un détecteur DAD et d'une boucle d'injection de 5 mL (PLC 2050, Gilson). La chaîne est contrôlée par le logiciel Gilson Glider Prep et permet là aussi une

collection automatique en fonction de l'absorbance à une longueur d'onde donnée. L'élution s'est faite par gradient ACN/H₂O, avec ou sans acide (TFA ou acide acétique), en faisant augmenter la proportion d'acétonitrile au cours du temps. Les systèmes suivants ont été utilisés :

Tableau 49 - Méthode HPLC semi-préparative «**PLC_AMMO_F1** »

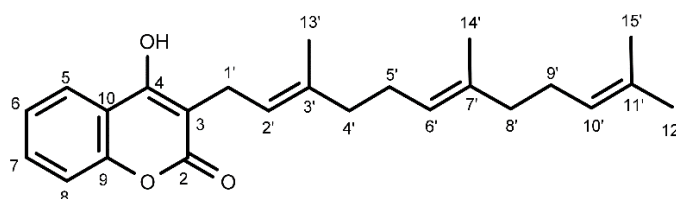
Temps (min)	% Solvant A : ACN	% Solvant B : H ₂ O
0	50	50
40	70	30
50	100	0
55	100	0

Tableau 50 - Méthode HPLC semi-préparative «**PLC_AMMO_F2** »

Temps (min)	% Solvant A : ACN	% Solvant B : H ₂ O
0	50	50
10	50	50
35	75	25
37	100	0
42	100	0
45	50	50
50	50	50

6. Données spectrales des composés isolés de la gomme ammoniacque AMMO1

6.1. Féruléol 36 (F1-C)



Aspect : huile translucide

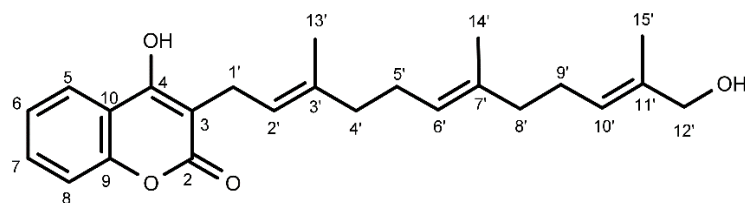
Formule brute : $C_{24}H_{30}O_3$

Masse molaire : 366 g/mol (HRMS-ESI+ (m/z) $[M+H]^+$ calculée : 367,2268, trouvée : 367,2306 ; HRMS-ESI- (m/z) $[M-H]^-$ calculée : 365,2122, trouvée : 365,2136)

1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.91 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, H-5), 7.56 (1H, td, $J = 7.9, 1.6$ Hz, H-7), 7.32 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 7.29 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8), 5.19 (1H, tq, $J = 6.9, 1.3$, H-2'), 5.05 (1H, tq, $J = 6.9, 1.5$, H-6'), 4.97 (1H, tq, $J = 6.9, 1.5$ Hz, H-10'), 3.28 (H2, d, $J = 7.1$ Hz, H-1'), 2.08 (2H, m, H-5'), 1.99 (2H, m, H-4'), 1.93 (2H, m, H-9'), 1.85 (2H, m, H-8'), 1.79 (3H, s, H-13'), 1.61 (3H, s, H-15'), 1.54 (3H, s, H-14'), 1.51 (3H, s, H-12').

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 166.33 (C-2), 162.58 (C-4), 153.64 (C-9), 137.31 (C-3'), 135.96 (C-7'), 132.58 (C-7), 131.89 (C-11'), 125.42 (C-10'), 125.20 (C-6'), 125.04 (C-6), 124.17 (C-5), 122.25 (C-2'), 118.22 (C-10), 117.34 (C-8), 106.11 (C-3), 40.78 (C-8'), 40.77 (C-4'), 27.76 (C-9'), 27.29 (C-5'), 25.84 (C-15'), 23.66 (C-1'), 17.66 (C-12'), 16.42 (C-13'), 16.10 (C-14').

6.2. ω -hydroxyl-ferulenol 43 (F2-A)



Aspect : huile translucide

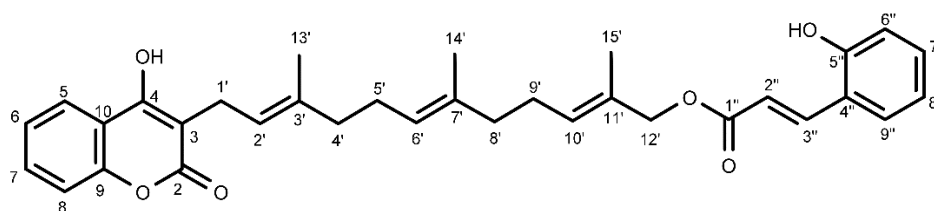
Formule brute : $C_{24}H_{30}O_4$

Masse molaire : 382 g/mol (HRMS-ESI+ (m/z) $[M+H]^+$ calculée : 383,2217, trouvée : 383,2228 ; HRMS-ESI- (m/z) $[M-H]^-$ calculée : 381,2071, trouvée : 381,2086)

1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.98 (1H, dd, $J = 8, 1.5$ Hz, H-5), 7.41 (1H, td, $J = 8, 1.5$ Hz, H-7), 7.17 (2x1H, m, H-6, 8), 5.33 (1H, tq, $J = 7, 1.4$ Hz, H-10'), 5.29 (1H, tq, $J = 6.9, 1.3$ Hz, H-2'), 5.10 (1H, td, $J = 7.2, 1.4$ Hz, H-6'), 3.88 (2H, s, H-12'), 3.24 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1'), 2.06 (2x2H, m, H-5', 9'), 1.90 (2x2H, m, H-4', 8'), 1.77 (3H, s, H-13'), 1.59 (3H, s, H-15'), 1.56 (3H, s, H-14')

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 174.6 (C-4), 169.2 (C-2), 154.6 (C-9), 135.7 (C-11'), 135.5 (C-7'), 134.6 (C-3'), 131.2 (C-7), 126.7 (C-10'), 125.9 (C-6'), 125.6 (C-5), 125.5 (C-2'), 123.8 (C-8), 123.7 (C-10), 116.9 (C-6), 102.0 (C-3), 69.0 (C-12'), 41.0 (C-4'), 40.5 (C-8'), 27.7 (C-5'), 27.3 (C-9'), 23.8 (C-1'), 16.5 (C-13'), 16.1 (C-14'), 13.7 (C-15').

6.3. Coumaryl 12-férulénol (F2-E, nouvelle 4-hydroxycoumarine sesquiterpénique)



Aspect : huile translucide

Formule brute : $C_{33}H_{36}O_6$

Masse molaire : 528 g/mol (HRMS-ESI⁺ (m/z) $[M+H]^+$ calculée : 529,2590, trouvée : 529,2594 ; HRMS-ESI⁻ (m/z) $[M-H]^-$ calculée : 527,2434, trouvée : 527,2443)

1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.99 (1H, dd, $J = 8.9, 1.7$ Hz, H-5), 7.97 (1H, d, $J = 16.6$ Hz, H-3''), 7.46 (1H, dd, $J = 8, 1.5$ Hz, H-9''), 7.39 (1H, td, $J = 8, 1.7$ Hz, H-7), 7.18 (1H, m, H-7''), 7.16 (1H, m, H-8), 7.15 (1H, m, H-6), 6.85 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-6''), 6.82 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8''), 6.59 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-2''), 5.41 (1H, td, $J = 7.1, 0.96$ Hz, H-10'), 5.27 (1H, td, $J = 6.7, 0.96$ Hz, H-2'), 5.09 (1H, td, $J = 6.9, 0.96$ Hz, H-6'), 4.52 (2H, s, H-12'), 3.24 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1'), 2.07 (2H, m, H-9'), 2.03 (2H, m, H-5'), 1.95 (2H, m, H-8'), 1.92 (2H, m, H-4'), 1.74 (3H, s, H-13'), 1.63 (3H, s, H-15'), 1.55 (3H, s, H-14').

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 174.3 (C-4), 169.5 (C-1''), 169.1 (C-2), 158.3 (C-5''), 154.5 (C-9), 142.4 (C-3''), 135.1 (C-7'), 134.7 (C-3'), 132.6 (C-7''), 131.3 (C-11'), 131.2 (C-7), 130.3 (C-10'), 130.1 (C-9''), 126.1 (C-6'), 125.7 (C-5), 125.5 (C-2'), 123.8 (C-6), 123.6 (C-10), 122.6 (C-4'), 120.7 (C-8''), 118.3 (C-2''), 117.1 (C-6''), 116.9 (C-8), 102.1 (C-3), 71.1 (C-12'), 40.9 (C-4'), 40.1 (C-8'), 27.7 (C-5'), 27.3 (C-9'), 23.8 (1'), 16.5 (C-13'), 16.1 (C-14'), 14.1 (C-15').

7. Activité antibactérienne des formulations traditionnelles par diffusion sur gélose

Les préparations traditionnelles des remèdes ont été reproduites au plus proche avant d'être testées sur tapis bactériens au sein de l'UMR7242 – Equipe *Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications* par l'ingénieur Régine Janel.

Les différentes drogues végétales ont été réduites en poudre individuellement au mortier avant d'être mélangées selon les proportions présentées dans le **Tableau 51**. L'acétate de cuivre (anhydre et pur à 97%, Strem Chemicals Inc., Massachusetts) a été utilisé sous sa formulation commerciale (poudre).

Tableau 51 – Formulation en laboratoire des remèdes et préparations intermédiaires

	Remède 1 R₁	Remède 2 R₂	Mélange des 4 drogues végétales RDV	Mélange de 3 drogues végétales 3DV	Acétate de cuivre Cu(OAc)₂
ALOF	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	∅
MYRR1	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	∅
SARC	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	∅
AMM01	100 mg	100 mg	100 mg	∅	∅
Cu(OAc)₂	100 mg	10 mg	∅	∅	100 mg

Drogues utilisées : ALOF suc commercial d'*A. ferox* ; MYRR1 myrrhe traditionnelle ; SARC gomme sarcocolle traditionnelle ; AMM01 gomme ammoniacale traditionnelle

Ces préparations, ainsi que l'acétate de cuivre seul, ont été testées sur des boîtes de gélose MHII inoculées avec les souches suivantes : *S. aureus* HG001, *S. epidermidis* isolat clinique, *C. striatum* isolat clinique, *E. coli* MG1655 et *P. aeruginosa* ATCC15692. Des disques commerciaux de 10 µg de gentamycine ont été utilisés comme témoins positifs (BBL™ Sensi-Disc™ Gentamicin GM-10, Becton Dickinson and Company, New Jersey). Les tapis bactériens sur gélose ont été préparés et incubés comme précédemment décrit en **Part. Exp-4.5**, à la différence près qu'une DO de 0,01 a été utilisé pour la densité de l'inoculum, pour toutes les souches.

Deux types de dépôts ont été faits : une masse minimale (S) et son quadruple (L), ces quantités ayant été définies de manière à ce que seule la masse d'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ et la masse de gomme ammoniacale AMM01 varient entre les différentes préparations (**Tableau 52**).

Tableau 52 – Masses (mg) des différents ingrédients dans les dépôts de masse minimale S, avec en gras les seuls drogues dont la masse déposée varie

Préparations	Dépôts S (mg)	Masses des drogues dans les dépôts S (mg)				
		ALOF	MYRR1	SARC	AMM01	Cu(OAc) ₂
3DV	3	1	1	1	-	-
RDV	4	1	1	1	1	-
Cu(OAc) ₂	1	-	-	-	-	1
R ₁	5	1	1	1	1	1
R ₂	4,1	1	1	1	1	0,1

Drogues utilisées : ALOF suc commercial d'*A. ferox* ; MYRR1 myrrhe traditionnelle ; SARC gomme sarcocolle traditionnelle ; AMM01 gomme ammoniacale traditionnelle

8. Etude de la potentielle synergie entre les différentes drogues

Cette étude a été réalisée sur les extraits hydroalcooliques des drogues végétales ainsi que sur l'acétate de cuivre solubilisé dans l'eau, combinés selon la méthode de l'échiquier et testées sur *S. aureus* HG001 au sein de l'UMR 7242 – Equipe Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications par l'ingénieur Régine Janel. Ces expériences ont été réalisées après le changement de myrrhe, les tests n'ont donc pas été réalisés sur l'extrait de la myrrhe commerciale COMA1-EH comme précédemment mais sur l'extrait de la myrrhe traditionnel MYRR1-EH.

8.1. Méthode de l'échiquier et calcul des indices FIC

Cette méthode est l'une des plus communément utilisée pour évaluer les interactions entre 2 composés antibactériens, mais également entre des matrices plus complexes comme des extraits. Elle consiste à croiser 2 gammes de concentrations entre 2 substances A et B (ici des extraits et l'acétate de cuivre) puis calculer des indices de concentration inhibitrice fractionnaire (*Fractional Inhibitory Concentration Indices* ou indices FIC, FICI) en fonction des combinaisons de concentrations permettant l'inhibition de la croissance bactérienne. Un indice FIC d'un puit dans un échiquier se calcul comme suit²⁵¹ :

$$FICI = \frac{\text{Concentration de la Substance A dans le puit}}{\text{CMI de la Substance A}} + \frac{\text{Concentration de la Substance B dans le puit}}{\text{CMI de la Substance B}}$$

Les échiquiers entre les extraits et l'acétate de cuivre ont ensuite été préparés selon le schéma présenté en **Figure 101**, la lecture se faisant au bout de 24 h, uniquement faite à l'œil nu. Seuls les puits constituant l'échiquier (**Figure 101** entouré en violet) et la colonne 11 ont été inoculés, la ligne H et la colonne 10 étant complétées avec du milieu MH-II et servant de référence. Le bon développement de la souche est vérifié avec le témoin négatif en colonne 11 (MH-II + inoculum), tandis que l'absence de contaminations dans la plaque est vérifiée à l'aide du blanc de la colonne 12 (MH-II). Les pré-cultures ont été préparées et les plaques ont été incubées comme précédemment décrit en **Part. Exp-4.6**.

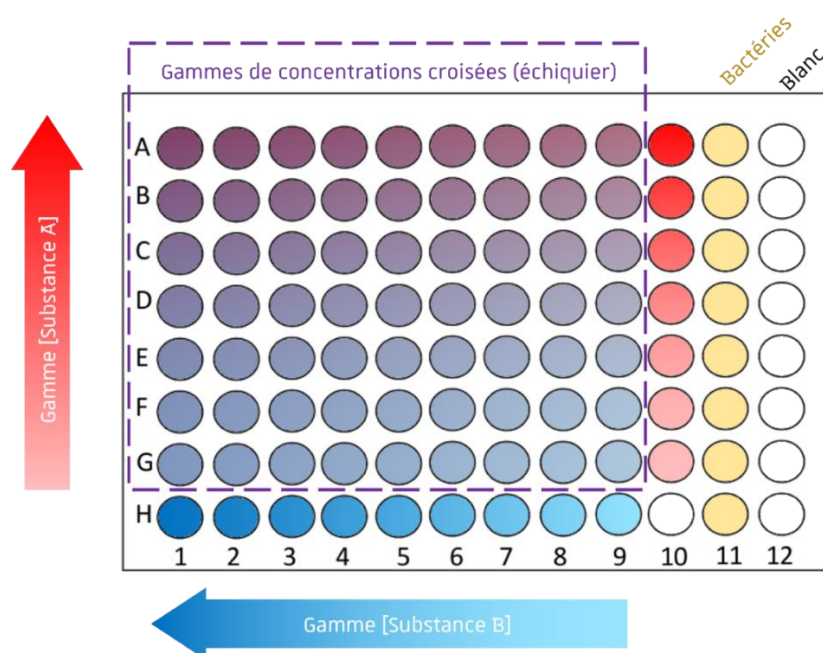


Figure 101 – Schéma de l'échiquier entre une **substance A** et une **substance B** (entouré en violet)

Il existe plusieurs manières de calculer le FICI final entre 2 substances, et plusieurs manières d'interpréter cet indice pour déterminer le type d'interactions entre ces substances. Dans cette étude, le FICI final a été calculé en faisant la moyenne des indices FIC des premiers puits clairs dans chaque colonne et ligne (sans développement bactérien visible à l'œil nu), c'est-à-dire le long de l'interface puits clairs/puits troubles dans la plaque, comme illustré dans la **Figure 102**²⁵². Son interprétation a été faite selon les intervalles suivants : $FICI \leq 0,5$ = synergie ; $0,5 < FICI \text{ final} < 1$ = addition ; $1 < FICI \text{ final} < 4$ pas d'interactions ; $4 \leq FICI \text{ final}$ = antagonisme²⁵¹.

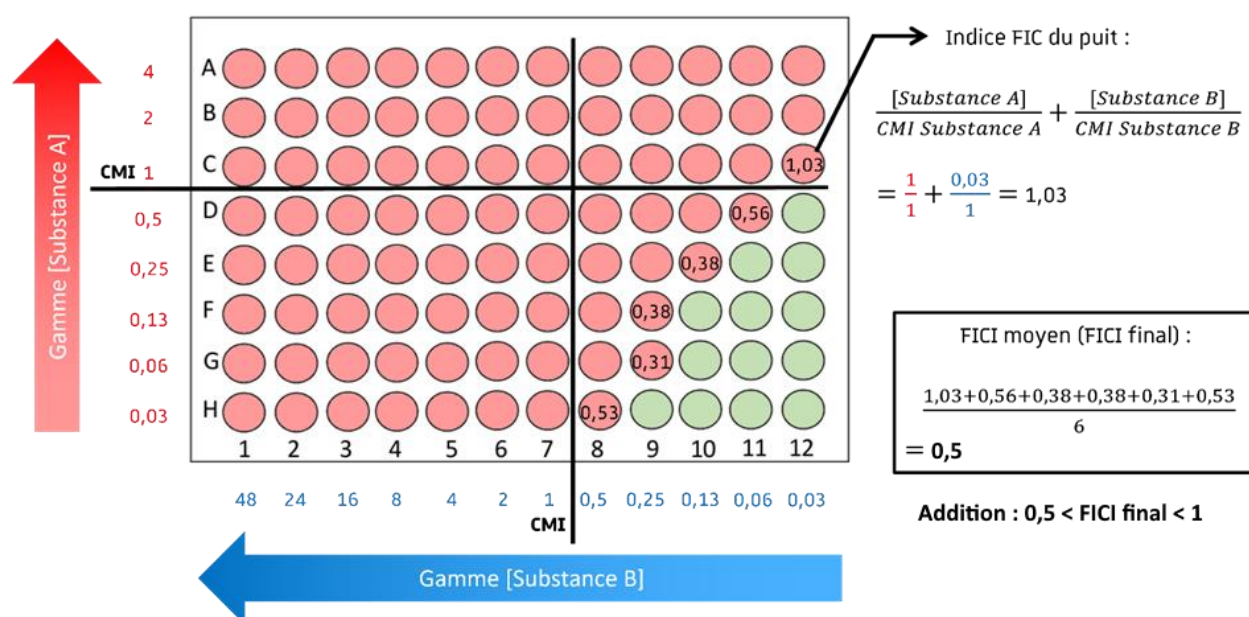


Figure 102 – Schéma de la lecture d'un échiquier, inspiré par les figures de l'étude de Bonapace et al, 2002²⁵²

8.2. Lecture de la densité optique pour l'interprétation des échiquiers

Dans le paragraphe précédent, le développement bactérien était estimé en fonction de la turbidité des puits visible à l'œil nu. Afin d'avoir une lecture plus fine de ce développement bactérien et donc de l'activité des substances testées, une lecture de la densité optique DO dans les puits à 600 nm a été mise en place à l'aide d'un lecteur de microplaques (Técan, modèle Infinite 200 pro avec le logiciel Magellan).

Un premier essai a été réalisé sur les plaques précédemment réalisées, en utilisant les puits contenant les extraits ou l'acétate de cuivre sans bactéries (**Figure 101** ligne H et colonne 10) comme références pour retrancher l'absorbance des substances testées dans chaque puit. La DO corrigée a été calculée comme suit :

$$DO_{\text{puits inoculé}} - (DO_{\text{témoin substance A}} + DO_{\text{témoin substance B}} - DO_{\text{milieu MH-II du Blanc}})$$

Cette lecture des plaques a cependant donné des résultats aberrants, le résultat de l'addition des DO des substances seules étant plus élevé que la DO réelle des associations de substances. La lecture à l'œil nu a donc été conservée pour l'interprétation des échiquiers réalisés comme décrits précédemment.

Une autre organisation de plaque a été testée afin d'utiliser la lecture de la DO pour l'interprétation des échiquiers. Ce test a été réalisé sur l'association de l'acétate d'éthyle $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ avec l'extrait hydroalcoolique du mélange de 4 drogues végétales RDV-EH selon le schéma en **Figure 103**. Les combinaisons des différentes concentrations dans l'échiquier (**Figure 103** entouré en vert) ont été préparées en double, l'un étant inoculé avec une préculture de *S. aureus* (**Figure 103** surligné en jaune) et la seconde servant de référence pour retrancher la DO du mélange. Le bon développement de la souche est vérifié avec le témoin négatif en ligne G (MHII + inoculum et témoin avec seulement le MHII), tandis que l'absence de contaminations dans la plaque est vérifiée à l'aide du blanc de la ligne H (MHII). La DO corrigée au cours du temps a été calculée comme suit :

$$DO_{\text{puit inoculé au cours du temps}} - DO_{\text{puit de référence au cours du temps}}$$

Ainsi des courbes de croissances de *S. aureus* ont ainsi pu être obtenues pour chaque combinaison. La DO mesurée dans la ligne G a permis de visualiser la croissance de la bactérie uniquement en présence de milieu MHII. Elle a été corrigée en soustrayant la DO du blanc (ligne H) afin de pouvoir être comparée aux courbes de l'échiquier et les 6 réplicats techniques ont été utilisés pour faire des boîtes à moustaches pour chaque point dans le temps.

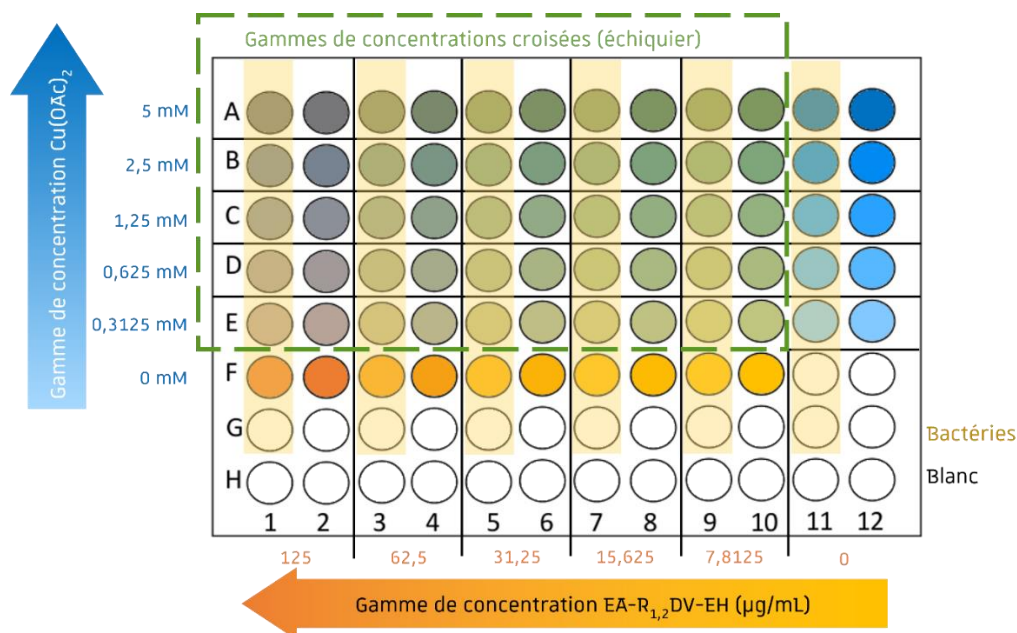


Figure 103 – Schéma de l'échiquier entre l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ et l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH lu à 600 nm sur 24h

Les puits inoculés sont surlignés en jaune afin de les distinguer des puits servant de référence

9. Synthèse verte de particules entre l'acétate de cuivre et les extraits RDV

La synthèse de particules et leur évaluation antibactérienne ont été réalisées au sein de l'UMR 7242 – *Equipe Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications*, par l'ingénieur Régine Janel.

9.1. Synthèse des particules par agitation en milieu liquide

Après plusieurs essais sur les solubilités respectives de l'acétate de cuivre et de l'extrait RDV-EH, les tests ont été menés soit dans l'eau, soit dans l'éthanol à 30% EtOH30%. Dans un premier temps, l'extrait RDV-EH et l'acétate de cuivre étaient solubilisés dans l'un ou l'autre de ces solvants, à 100 µg/mL et 100 mM (18,1 mg/mL), respectivement. Après 4 heures d'incubation à 37°C sur un agitateur rotatif, les solutions étaient centrifugées afin d'éliminer les composés non-solubles et les débris végétaux.

Ces solutions prétraitées étaient ensuite mélangées en fonction du solvant utilisé (H₂O ou EtOH30%) de manière à avoir un rapport RDV-EH/Cu(OAc)₂ de 4/1 ou 4/0,1 (m/m) (remède 1 ou remède 2). Ces mélanges aqueux ou hydroalcooliques ont ensuite été mis à incuber 18h à 37°C sur agitateur rotatif. Des tubes contenant les solutions prétraitées de RDV-EH et Cu(OAc)₂ seules, avant association, ont été utilisés comme témoins négatifs afin de vérifier qu'aucun précipité ne se formait chez l'une ou l'autre au bout de 18h. Les particules formées dans les différents mélanges ont été isolées par centrifugation.

Des particules ont également été obtenues en associant l'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ non pas à l'extrait RDV-EH mais aux extraits hydroalcooliques des drogues végétales seules : ALOF-EH, COMA1-EH, SARC-EH et AMMO1-EH. Les solutions ont été prétraitées comme décrits précédemment et ont été associées de manière à avoir un rapport extrait-EH/Cu(OAc)₂ de 1/1 (m/m). La même quantité d'extraits et d'acétate de cuivre a été utilisée pour toutes les expérimentations, à savoir 125 mg. Les mélanges ont ensuite été incubés dans les mêmes conditions que décrites précédemment.

9.2. Criblage antibactérien et antibiofilm des particules

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne : la diffusion sur gel d'agar, une méthode qualitative fréquemment utilisée pour le criblage, et l'inhibition de biofilms bactériens, une forme particulièrement résistante des bactéries pouvant être retrouvée dans les abcès infectieux.

Les tests ont été réalisés sur les souches suivantes :

- *Staphylococcus aureus* HG001 (Gram +)
- *Staphylococcus epidermidis* HUS (Gram +)
- *Escherichia coli* MG1655 (Gram -)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15692 (Gram -)

Les mêmes milieux de cultures et le même protocole de précultures qu'en **Part.Exp-4.2** et **Part.Exp-4.3** ont été utilisés.

9.2.1. Tests par diffusion sur gélose des différentes particules obtenues

Les tests par diffusion sur gélose ont été réalisés suivant le protocole explicité en **Part.Exp-4.5**, à part pour la densité bactérienne où une DO de 0,01 uA a été utilisée pour toutes les souches. Des dépôts de 25 µL ont été faits pour les solutions avant mélange, les mélanges non centrifugés et pour les suspensions des particules isolées, resolubilisées dans l'eau ou l'EtOH30% en concentrant 10 fois par rapport à leur concentration initiale dans le mélange.

9.2.2. Tests sur biofilms des particules formées dans le mélange RDV-EH/Cu(OAc)₂ aqueux

Les tests de l'activité antibiofilm des particules ont été menés sur des biofilms de *S. aureus* (Gram +), *E. coli* (Gram -) et *P. aeruginosa* (Gram -). Deux tests ont été réalisés : un sur l'initiation des biofilms, en ajoutant les particules, l'extrait ou le Cu(OAc)₂ dès le début de la culture, et un sur le développement de biofilms ayant déjà été initiés, en ajoutant les substances à tester après 24 h d'incubation.

Les différentes précultures ont été diluées dans du milieu MH-II jusqu'à avoir une densité optique DO de 0,01 uA. Ensuite, une plaque de culture pour microscopie confocale de 8 puits à fond plat a été inoculée en déposant 275 µL de la préculture dans chaque puit.

Les particules centrifugées et séchées du mélange RDV-EH/Cu(OAc)₂ aqueux ont été suspendues dans de l'eau. Deux gammes de concentrations ont été employées : l'une allant de 3,7 µg/mL à 2300 µg/mL pour les tests sur l'initiation des biofilms et une deuxième allant de 0,75 à 2300 µg/mL pour les tests sur le développement des biofilms déjà initiés (**Tableau 53**). Une gamme d'acétate de cuivre (repris dans l'eau) et d'extrait RDV-EH (repris dans le DMSO) a aussi été préparée (**Tableau 53** et **Tableau 54**) en tant que témoins. Ces gammes ont été réalisées dans du MH-II puis ont été ajoutées dans la plaque contenant les bactéries à raison de 20 µL par puit.

Tableau 53 – Gammes de concentrations utilisées sur les biofilms révélés au SYTO™ et observés au microscope confocal

Gammes	Concentration finale dans le puit (µg/mL et mM)						
Particules – Initiation biofilms	0	3,7	19	93	467	2300	-
Particules – Développement biofilms initiés	0	0,75	3,7	19	93	467	2300
Acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ SYTO™ + microscope confocal (gamme exprimée en µg/mL et en mM)	0	7,3	27	113	454	908	1816
	0	0,04	0,15	0,62	2,5	5	10

Tableau 54 – Gammes de concentrations utilisées sur les biofilms révélés au cristal violet

Gammes	Concentration finale dans le puit (µg/mL et mM)										
Extrait RDV-EH	1	2	3,9	7,8	15,6	31,3	62,5	125	250	500	
	4,5	9,1	18	36	73	145	291	563	114	227	
Acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ (gamme exprimée en µg/mL et en mM)	0,02	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,1	6,3	12,5	0
	5										

Pour le test de l'impact des particules et de l'acétate de cuivre sur l'initiation de biofilms, les gammes de concentration ont été ajoutées dès le départ. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C sans agitation pendant 30 heures, en renouvelant le milieu une fois par jour. Pour cela, le milieu était délicatement retiré dans chaque puit et remplacé par du milieu frais avec les mêmes concentrations de particules ou de Cu(OAc)₂.

Pour le test de l'impact des particules et de l'acétate de cuivre sur des biofilms déjà initiés, les plaques de culture pour microscopie confocale ont été inoculées par des bactéries, puis les plaques ont été incubées ont d'abord été incubées à 37°C sans agitation. Au bout de 24h, le milieu a été changé pour du milieu MH-II avec les gammes de concentrations des particules et du Cu(OAc)₂. Puis les plaques ont été incubées à 37°C sans agitation pendant encore 6h.

A la fin du temps de culture, une révélation au colorant SYTO™ a été effectuée. Ce colorant vert fluorescent est capable de passer les membranes cellulaires et de se fixer sur les acides nucléiques. Il permet de marquer les bactéries Gram + et Gram -, qu'elles soient vivantes ou non.

La révélation peut également se faire par marquage au cristal violet. Ce colorant violet est capable de se fixer aux protéines de l'ADN. Pour cela, le biofilm est fixé par séchage 1h à 60°C puis 200 µL de cristal violet à 0,1 % sont ajoutés dans chaque puit. Après 5 minutes à température ambiante, le surnageant est retiré et le biofilm est lavé 3 fois à l'eau ultrapure. Le colorant est fixé 1h à 37°C, puis 200 µL d'acide acétique à 33% sont ajoutés afin de resolubiliser le colorant contenu

dans le biofilm. Après 15 minutes à température ambiante, la densité optique DO à 492 nm est lue dans chaque puit à l'aide d'un lecteur de microplaques Tècan.

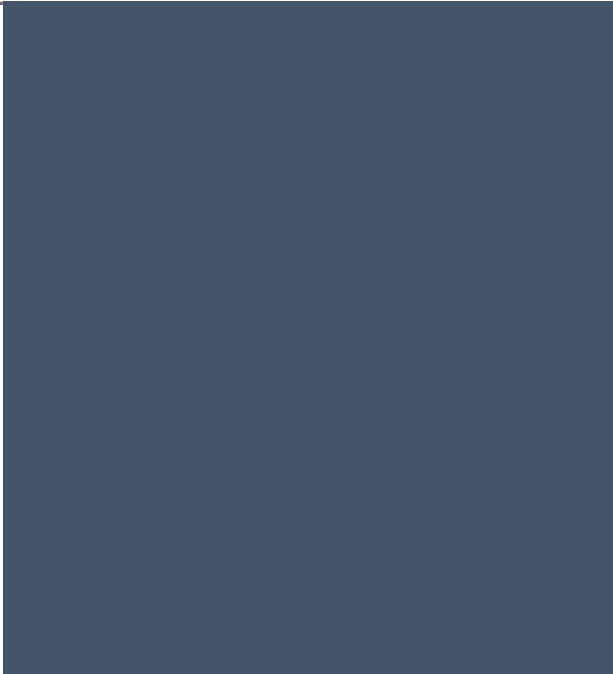
Au départ, nous avons voulu révéler l'activité antibiofilm de toutes ces substances au cristal violet mais les particules absorbaient par elles-mêmes, le lecteur de plaques n'était donc pas approprié. Nous avons alors observé au microscope confocal les biofilms coloré au cristal violet.

9.3. Caractérisation des particules

L'**ICP-AES** (*Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry*), ou spectrométrie d'émission atomique – plasma à couplage inductif en français, est une analyse permettant de doser les éléments présents dans tout type de matrice. Pour cela, les échantillons solides sont réduits à un état liquide grâce à un traitement acide ou par microondes (minéralisation), puis vaporisés sous forme d'aérosol dans la torche à un plasma d'Argon. L'échantillon entre alors en collision avec les électrons et les ions du plasma et est à son tour ionisé puis réduit en atomes. Ces atomes vont tour à tour perdre et retrouver leurs électrons, produisant ainsi une longueur d'onde caractéristique en fonction de l'élément. Cette technique a notamment permis de doser le cuivre présent dans les particules.

Des mélanges RDV-EH/Cu(OAc)₂ 4/1 (m/m) et ALOF-EH/Cu(OAc)₂ 1/1 (m/m), dans l'H₂O et l'EtOH30% ont été une nouvelle fois préparés. L'entièreté de chaque mélange a été centrifugé, lavé 2 fois à l'eau puis lyophilisé avant d'être pesé. Seul un mélange supplémentaire ALOF-EH/Cu(OAc)₂ dans l'EtOH30% a été filtré sur filtre polyéthersulfone (Millex GP) de 0,22 µm avant d'être centrifugé. De cette manière, 75,5 mg de précipité lyophilisé ont été obtenus. Un échantillon des différentes particules obtenues a été envoyé pour analyse ICP-AES à la Plateforme Analytique des Inorganiques à l'Institut (PAI, Cronenbourg), par l'intermédiaire du Dr. Anne Boos.

Des échantillons des mélanges dans l'EtOH30% non filtrés, du mélange ALOF-EH/Cu(OAc)₂ filtré mais aussi des extraits RDV-EH et ALOF-EH seuls ont également été envoyés au Laboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale (LAMS, Paris) à la Pr. Maguy JABER, afin de réaliser des analyses MET, DRX et RPE.



Bibliographie

p 239 à p 256



Bibliographie

1. Levy, S. B. & Marshall, B. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**, S122–S129 (2004).
2. O' Neil, J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev. Antibiot. Resist.* 1–16 (2014).
3. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **399**, 629–655 (2022).
4. Lemire, J. A., Harrison, J. J. & Turner, R. J. Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 371–384 (2013).
5. Abd-El-Aziz, A. S., Agatemor, C. & Etkin, N. Antimicrobial resistance challenged with metal-based antimicrobial macromolecules. *Biomaterials* **118**, 27–50 (2017).
6. Abdallah, B. *et al.* Past mastering of metal transformation enabled physicians to increase their therapeutic potential. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **71**, 126926 (2022).
7. Al-Kindī, A. Y. Y. ibn I. *The Medical Formulary or Aqrabadhin of Al-Kindi. Translated with a study of its materia medica by Martin Levey.* (Madison, Milwaukee, and London : University of Wisconsin Press, 1966).
8. Balasubramanian, D., Harper, L., Shopsis, B. & Torres, V. J. Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. *Pathog. Dis.* **75**, 1–13 (2017).
9. Campbell. Les procaryotes et l'origine de la diversité métabolique. in *Biologie* (ed. De Boeck - Wesmael) 515–532 (1995).
10. Horner-Devine, M. C., Carney, K. M. & Bohannan, B. J. M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **271**, 113–122 (2004).
11. Christensen, G. J. M. & Brüggemann, H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef. Microbes* **5**, 201–215 (2014).
12. Tortora, J. G., Funke, R. B. & Case, L. C. *Microbiology, an introduction.* (2021).
13. Coyette, J., Joseleau, J.-P. & Perraud, R. *Microbiologie de Prescott.* (2018).
14. Abramovitch, R. B. & Martin, G. B. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 356–364 (2004).
15. Taylor, P. W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* **42**, 195–201 (2013).
16. Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden & Maes, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 290–302 (2006).
17. Beers, M. H., Porter, R. S., Kaplan, J. L. & Berkwits, M. *Manuel Merck de diagnostic et thérapeutique.* ((Rahway (N.J, USA): Merck Research Laboratories), 2006).

18. Kobayashi, S. D., Malachowa, N. & Deleo, F. R. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *Am. J. Pathol.* **185**, 1518–1527 (2015).
19. Jiménez-Jiménez, C., Moreno, V. M. & Vallet-Regí, M. Bacteria-Assisted Transport of Nanomaterials to Improve Drug Delivery in Cancer Therapy. *Nanomaterials* **12**, 1–24 (2022).
20. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 322–332 (2010).
21. Hall, C. W. & Mah, T. F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 276–301 (2017).
22. Donlan, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 881–890 (2002).
23. Percival, S. L., Emanuel, C., Cutting, K. F. & Williams, D. W. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int. Wound J.* **9**, 14–32 (2012).
24. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S. & Pardesi, K. R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
25. Roe, D., Karandikar, B., Bonn-Savage, N., Gibbins, B. & Rouillet, J. baptiste. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 869–876 (2008).
26. Société Française d’Ethnopharmacologie. Société Française d’Ethnopharmacologie. <http://www.ethnopharmacologia.org/>.
27. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **83**, 770–803 (2020).
28. Atanasov, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1582–1614 (2015).
29. Watkins, F., Pendry, B., Corcoran, O. & Sanchez-Medina, A. Anglo-Saxon pharmacopoeia revisited: A potential treasure in drug discovery. *Drug Discov. Today* **16**, 1069–1075 (2011).
30. Harrison, F. *et al.* A 1,000-year-old antimicrobial remedy with antistaphylococcal activity. *MBio* **6**, 0–6 (2015).
31. Anonye, B. O. *et al.* The safety profile of Bald’s eyesalve for the treatment of bacterial infections. *Sci. Rep.* **10**, 1–13 (2020).
32. Furner-Pardoe, J. *et al.* Anti-biofilm efficacy of a medieval treatment for bacterial infection requires the combination of multiple ingredients. *Sci. Rep.* **10**, 1–14 (2020).
33. Institut du Monde Arabe. *A l’ombre d’Avicenne, la médecine au temps des califes : exposition organisée par l’IMA du 18/11/1996 au 02/03/1997.* (IMA, 1996).
34. Pitchon, V. La pharmacologie. in *La gastronomie arabe médiévale, entre diététique et plaisir* 95–221 (2018).
35. Pitchon, V. La médecine - Mise en place de nouvelles pratiques. in *La gastronomie arabe médiévale, entre diététique et plaisir* 63–92 (2018).

36. Saad, B., Azaizeh, H. & Said, O. Arab Herbal Medicine. in *Botanical Medicine in Clinical Practice* 31–39 (2008).
37. Edriss, H., Rosales, B. N., Nugent, C., Conrad, C. & Nugent, K. Islamic Medicine in the Middle Ages. *Am. J. Med. Sci.* **354**, 223–229 (2017).
38. Adamson, P. Life, Works and Influence. in *Al-Kindi* (ed. Oxford University Press) 3–4 (2006).
39. Levey, M. Mediaeval Arabic Bookmaking and Its Relation to Early Chemistry and Pharmacology. *Trans. Am. Philos. Soc.* **52**, 1–79 (1962).
40. DieBuche. Map of expansion of Caliphate. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Map_of_expansion_of_Caliphate.svg (2010).
41. Gallucci, S. & Matzinger, P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 114–119 (2001).
42. Cachat, J., Deffert, C., Hugues, S. & Krause, K. H. Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity. *Clin. Sci.* **128**, 635–648 (2015).
43. Enoch, S. & Leaper, D. J. Basic science of wound healing. *Surg.* **26**, 31–37 (2008).
44. Zelová, H. & Hošek, J. TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflamm. Res.* **62**, 641–651 (2013).
45. Coleman, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1397–1406 (2001).
46. Russo, A. *et al.* Current and future trends in antibiotic therapy of acute bacterial skin and skin-structure infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, S27–S36 (2016).
47. Liu, C. *et al.* Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin. Infect. Dis.* **52**, (2011).
48. Le Turnier, P., Boutoille, D., Joyau, C., Veyrac, G. & Asseray, N. Bacterial infections and NSAIDs exposure? Seek septic complications. *Eur. J. Intern. Med.* **41**, e33–e34 (2017).
49. Witte, W., Bräulke, C., Cuny, C., Heuck, D. & Kresken, M. Changing Pattern of Antibiotic Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From German Hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **22**, 683–686 (2001).
50. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3670–3695 (2013).
51. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661 (2016).
52. Badal, S. & Elufioye, T. O. Background to Pharmacognosy. *Pharmacogn. - Fundam. Appl. ans Strateg.* 4–13 (2017).
53. Ammon, H. P. T. & Müller, A. B. Forskolin: From an Ayurvedic remedy to a modern agent. *Planta Med.* **NO. 6**, 473–477 (1985).

54. Ghosh, A., Das, B. K., Roy, A., Mandal, B. & Chandra, G. Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *J. Nat. Med.* **62**, 259–262 (2008).
55. Prasannabalaji, N., Muralitharan, G., Sivanandan, R. N., Kumaran, S. & Pugazhvendan, S. R. Antibacterial activities of some Indian traditional plant extracts. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **2**, S291–S295 (2012).
56. Rubiolo, P. *et al.* Analytical discrimination of poisonous and nonpoisonous chemotypes of giant fennel (*Ferula communis* L.) through their biologically active and volatile fractions. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7556–7563 (2006).
57. Gault, G., Lefebvre, S., Benoit, E., Lattard, V. & Grancher, D. Variability of ferulenol and ferprenin concentration in French giant fennel (*Ferula* sp.) leaves. *Toxicon* **165**, 47–55 (2019).
58. Ahamad, S. R., Al-Ghadeer, A. R., Ali, R., Qamar, W. & Aljarboa, S. Analysis of inorganic and organic constituents of myrrh resin by GC–MS and ICP–MS: An emphasis on medicinal assets. *Saudi Pharm. J.* **25**, 788–794 (2017).
59. Rubina, L., Priyanka, T. & Ebenezer, J. Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from Aloe vera. *Brazilian J. Microbiol.* **40**, 906–915 (2009).
60. Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 564–82 (1999).
61. Subramani, R., Narayanasamy, M. & Feussner, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *3 Biotech* vol. 7 (2017).
62. Abreu, A. C., McBain, A. J. & Simões, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1007–1021 (2012).
63. Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O. & Lewis, K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3133–3141 (2002).
64. Lu, L. *et al.* Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chin. Med.* **14**, 1–17 (2019).
65. Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V. & Fazly Bazzaz, B. S. Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* vol. 8 (2019).
66. Mahizan, N. A. *et al.* Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. *Molecules* **24**, 1–21 (2019).
67. Venugopala, K. N., Rashmi, V. & Odhav, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res. Int.* **2013**, ID 963248 (2013).
68. Bocquet, L., Sahpaz, S. & Rivière, C. An Overview of the Antimicrobial Properties of Hop. in *Natural Antimicrobial Agents* (eds. Mérillon, J.-M. & Rivière, C.) 31–54 (Springer Cham, 2018). doi:10.1007/978-3-319-67045-4_2.
69. Abram, V. *et al.* A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Ind. Crops Prod.* **64**, 124–134 (2015).
70. Rozalski, M. *et al.* Antiadherent and antibiofilm activity of humulus lupulus L. derived

- products: New pharmacological properties. *Biomed Res. Int.* **2013**, (2013).
71. Garvey, M. I., Rahman, M. M., Gibbons, S. & Piddock, L. J. V. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37**, 145–151 (2011).
 72. Drelich, J., Li, B., Villeneuve, B. & Bowen, P. Inexpensive mineral copper materials with antibacterial surfaces. *Surf. Innov.* **1**, 15–26 (2013).
 73. Sarkar, P. K., Das, S. & Prajapati, P. K. Ancient concept of metal pharmacology based on Ayurvedic literature. *Anc. Sci. Life* **29**, 1–6 (2010).
 74. De Bonnechose, H. L'affaire du Stalino. *Rev. des Deux Mondes (1829 - 1971)* 486–493 (1958).
 75. Riva, M. A., Lafranconi, A., D'Orso, M. I. & Cesana, G. Lead poisoning: Historical aspects of a paradigmatic 'occupational and environmental disease'. *Saf. Health Work* **3**, 11–16 (2012).
 76. Parascandola, J. From mercury to miracle drugs: syphilis therapy over the centuries. *Pharm. Hist.* **51**, 14–23 (2009).
 77. Braithwaite, R. Heavy Metals and Herbal Medicines. in *Botanical Medicine in Clinical Practice* (eds. Watson, R. R. & Preedy, V. R.) 851–857 (CAB International, 2008).
 78. Spann, C. T., Tutrone, W. D., Weinberg, J. M., Scheinfeld, N. & Ross, B. Topical antibacterial agents for wound care: A primer. *Dermatologic Surg.* **29**, 620–626 (2003).
 79. Bankier, C. *et al.* Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations. *Sci. Rep.* **9**, 3–10 (2019).
 80. Vinuesa, V. & McConnell, M. J. Recent advances in iron chelation and gallium-based therapies for antibiotic resistant bacterial infections. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–19 (2021).
 81. Pitchon, V., Aubert, E., Vonthron, C. & Fechter, P. How history can help present research of new antimicrobial strategies: the case of cutaneous infections' remedies containing metals from the Middle Age Arabic pharmacopeia. in *Medicinal Plants As Anti-infectives* (ed. Chassagne, F.) 459–478 (Elsevier Academic Press, 2022).
 82. Ribeiro, M. & Simões, M. Advances in the antimicrobial and therapeutic potential of siderophores. *Environ. Chem. Lett.* **17**, 1485–1494 (2019).
 83. Hans, M., Mathews, S., Mücklich, F. & Solioz, M. Physicochemical properties of copper important for its antibacterial activity and development of a unified model. *Biointerphases* **11**, 018902 (2016).
 84. Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H. & Adibkia, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **44**, 278–284 (2014).
 85. Edis, Z., Haj Bloukh, S., Ashames, A. & Ibrahim, M. Copper-Based Nanoparticles, Their Chemistry and Antibacterial Properties: A Review. in *Chemistry for a Clean and Healthy Planet* (2019). doi:10.1007/978-3-030-20283-5.
 86. LewisOscar, F. *et al.* One pot synthesis and anti-biofilm potential of copper nanoparticles (CuNPs) against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* **31**, 379–391 (2015).

87. Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P. & Wuttke, S. Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Adv. Mater.* **31**, 1–26 (2019).
88. Chatterjee, A. K., Chakraborty, R. & Basu, T. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology* **25**, (2014).
89. Fulaz, S., Vitale, S., Quinn, L. & Casey, E. Nanoparticle–Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends Microbiol.* **27**, 915–926 (2019).
90. Song, J. Y. & Kim, B. S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **32**, 79–84 (2009).
91. Iravani, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* **13**, 2638–2650 (2011).
92. Mohanta, Y. K. *et al.* Anti-biofilm and Antibacterial Activities of Silver Nanoparticles Synthesized by the Reducing Activity of Phytoconstituents Present in the Indian Medicinal Plants. *Front. Microbiol.* **11**, 1–15 (2020).
93. Lee, H. *et al.* Biological synthesis of copper nanoparticles using plant extract. *NSTI-Nanotech* **1**, 371–374 (2011).
94. Siddiqi, K. S. & Husen, A. Current status of plant metabolite-based fabrication of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: A review. *Biomater. Res.* **24**, 1–15 (2020).
95. Umaiyal, M. P., Lakshmi, T., Kumar, S. R. & Roy, A. Green synthesis and antioxidant property of copper sulfate nanoparticles from Aloe vera extract. *Drug Invent. Today* **11**, 131–134 (2019).
96. Ramkumar, R., Sapru, S. & Archana, P. P. Synthesis and catalytic applications of ultrasmall Copper Nanoparticles using Aloe vera plant extract.
97. Sharma, S. & Kumar, K. Aloe-vera leaf extract as a green agent for the synthesis of CuO nanoparticles inactivating bacterial pathogens and dye. *J. Dispers. Sci. Technol.* **0**, 1–13 (2020).
98. Alwhibi, M. S. *et al.* Green biosynthesis of silver nanoparticle using Commiphora myrrh extract and evaluation of their antimicrobial activity and colon cancer cells viability. *J. King Saud Univ. - Sci.* **32**, 3372–3379 (2020).
99. Hosseinzadeh, N. *et al.* Green synthesis of gold nanoparticles by using Ferula persica Willd. gum essential oil: production, characterization and in vitro anti-cancer effects. *J. Pharm. Pharmacol.* **72**, 1013–1025 (2020).
100. WFO. *The World Flora Online. Published on Internet: www.worldfloraonline.org.* (Accessed on 2022.11.10, 2022).
101. Elsevier. ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/>.
102. NCBI. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>.
103. Bowen, W. G. JSTOR. <https://www.jstor.org/>.
104. Google. Google Livres. <https://books.google.fr/>.

105. Al-Oqail, M. M. ohamma. *et al.* In vitro anti-proliferative activities of Aloe perryi flowers extract on human liver, colon, breast, lung, prostate and epithelial cancer cell lines. *Pak. J. Pharm. Sci.* **29**, 723–729 (2016).
106. GBIF. Cartes des localisations des observations d'A. vera enregistrées. <https://www.gbif.org/species/2777724>.
107. Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Sendón, R. & Sanches-Silva, A. Aloe vera: Ancient knowledge with new frontiers. *Trends Food Sci. Technol.* **61**, 94–102 (2017).
108. Arunkumar, S. & Muthuselvam, M. Analysis of Phytochemical Constituents And Antimicrobial Activities of Aloe vera Against Pathogens. *World J. Agric. Sci.* **5**, 572–576 (2009).
109. Tan, B. & Vanitha, J. Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Some Traditional Chinese Medicinal Herbs: A Review. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1423–1430 (2012).
110. Anywar, G., Tugume, P. & Kakudidi, E. K. A review of Aloe species used in traditional medicine in East Africa. *South African Journal of Botany* vol. 147 1027–1041 (2022).
111. Direction Européenne de la Qualité du Médicament & soins de santé. *Pharmacopée Européenne*. (EDQM, 2022).
112. Baruah, A., Bordoloi, M. & Deka Baruah, H. P. Aloe vera: A multipurpose industrial crop. *Ind. Crops Prod.* **94**, 951–963 (2016).
113. Ahmed, H. M. Ethnopharmacobotanical study on the medicinal plants used by herbalists in Sulaymaniyah Province, Kurdistan, Iraq. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **12**, (2016).
114. Blakelock, R. A. The Rustam Herbarium, Iraq: Part 1. Systematic List. *Kew Bull.* **3**, 375–444 (1948).
115. Hooper, D. & Field, H. *Useful Plants and Drugs of Iran and Iraq*. (Field Museum of Natural History, 1937). doi:<https://doi.org/10.5962/bhl.title.2281>.
116. Jaiswal, S. K., Mahajan, S., Chakraborty, A., Kumar, S. & Sharma, V. K. The genome sequence of Aloe vera reveals adaptive evolution of drought tolerance mechanisms. *iScience* **24**, 102079 (2021).
117. Maan, A. A. *et al.* The therapeutic properties and applications of Aloe vera: A review. *J. Herb. Med.* **12**, 1–10 (2018).
118. Bruneton, J. Aloès du Cap, Aloe ferox Millre, Aloès des Bardades, A. vera (L.) Burm. f., Asphodelaceae. in *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales* (eds. Editions Tec&Doc & Editions Médicales Internationales).
119. Haque, S. D., Saha, S. K., Salma, U., Nishi, M. K. & Rahaman, M. S. Antibacterial Effect of Aloe vera (Aloe barbadensis) leaf gel against Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Mymensingh Med. J.* **28**, 490–496 (2019).
120. Vázquez, B., Ávila, G., Segura, D. & Escalante, B. Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. *J. Ethnopharmacol.* **55**, 69–75 (1996).
121. Reuter, J. *et al.* Investigation of the anti-inflammatory potential of Aloe vera gel (97.5%) in

- the ultraviolet erythema test. *Skin Pharmacol. Physiol.* **21**, 106–110 (2008).
122. Hegggers, J. P. *et al.* Wound healing effects of Aloe gel and other topical antibacterial agents on rat skin. *Phyther. Res.* **9**, 455–457 (1995).
 123. Langenhein, H. J. Substances confused or intermixed with resin. in *Plant Resins - Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany* (ed. Timber Press) 45–50 (Timber Press, 2003). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
 124. Gracz-Bernaciak, J., Mazur, O. & Nawrot, R. Functional studies of plant latex as a rich source of bioactive compounds: Focus on proteins and alkaloids. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
 125. Christaki, E. V. & Florou-Paneri, P. C. Aloe vera: A plant for many uses. *J. Food, Agric. Environ.* **8**, 245–249 (2010).
 126. Coopoosamy, R. M. & Magwa, M. L. Antibacterial activity of chrysophanol isolated from Aloe excelsa (Berger). *African J. Biotechnol.* **5**, 1508–1510 (2006).
 127. Gebremeskel, L., Bhounik, D., Sibhat, G. G. & Tuem, K. B. In vivo wound healing and anti-inflammatory activities of leaf latex of aloe megalacantha baker (Xanthorrhoeaceae). *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2018**, (2018).
 128. Guo, X. & Mei, N. Aloe vera: A review of toxicity and adverse clinical effects. *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **34**, 77–96 (2016).
 129. Boudreau, M. D. & Beland, F. A. An evaluation of the biological and toxicological properties of Aloe barbadensis (Miller), Aloe vera. *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **24**, 103–154 (2006).
 130. Shen, T., Li, G. H., Wang, X. N. & Lou, H. X. The genus Commiphora: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **142**, 319–330 (2012).
 131. Jahandideh, M., Hajimehdipoor, H., Mortazavi, S. A., Dehpour, A. & Hassanzadeh, G. A wound healing formulation based on Iranian traditional medicine and its HPTLC fingerprint. *Iran. J. Pharm. Res.* **15**, 149–157 (2016).
 132. Hull, B. Z. Frankincense, Myrrh, and Spices the Oldest Global Supply Chain? *J. Macromarketing* **28**, 275–288 (2008).
 133. GBIF. Carte des localisations des observations d'espèces du genre Commiphora enregistrées. <https://www.gbif.org/fr/species/2972896> (2022).
 134. Naqishbandi, A. Plants used in Iraqi traditional medicine in Erbil - Kurdistan region. *Zanco J. Med. Sci.* **18**, 811–815 (2015).
 135. The Royal Botanic Gardens Kew. Plants of the World Online - Commiphora Jacq. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:331509-2/general-information>.
 136. WFO. Commiphora Jacq. <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000009054>.
 137. Pereira, J., Farre, F. J., Bentley, R., Wood, H. C. & Warington, R. Myrrha, Myrrh. in *Manual of Materia Medica & Therapeutics* (ed. Lea, H. C.) 755–758 (Longmans, Green and Compagny, 1866).

138. Planche botanique de C. myrrha par Franz Eugen Köhler (cédé au domaine public). https://commons.wikimedia.org/wiki/Commiphora_myrrha#/media/File:Commiphora_myrrha_-_Köhler-s_Medizinal-Pflanzen-019.jpg (1897).
139. Commiphora capensis Engl., observé en Namibie par Nick Helme (sous licence CC BY-SA 4.0 <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>). <https://www.gbif.org/fr/occurrence/3747080702> (2022).
140. Myrrhe par Géo Trinity (sous licence CC BY 3.0 <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.en>). <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Myrrhe.jpg>.
141. Langenheim, J. H. Definitions of Resin. in *Plant Resins - Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany* (ed. Press, T.) 23–26 (Timber Press, 2003). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
142. Langenheim, J. H. Oleoresins. in *Plant Resins - Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany* (ed. Timber Press) 306–340 (Timber Press, 2003). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
143. Mohamed, A. A., Ali, S. I., EL-Baz, F. K., Hegazy, A. K. & Kord, M. A. Chemical composition of essential oil and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of Commiphora myrrha resin. *Ind. Crops Prod.* **57**, 10–16 (2014).
144. Su, S. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of Commiphora myrrha. *J. Ethnopharmacol.* **134**, 251–258 (2011).
145. Matsuda, H. *et al.* Absolute stereostructures of polypodane-type triterpenes, myrrhanol a and myrrhanone A, from guggul-gum resin (the resin of Balsamodendron mukul). *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 1200–1203 (2004).
146. Dolara, P. *et al.* Local anaesthetic, antibacterial and antifungal properties of sesquiterpenes from myrrh. *Planta Med.* **66**, 356–358 (2000).
147. Dolara, P. *et al.* Analgesic effects of myrrh [5]. *Nature* **379**, 29 (1996).
148. Connelly, E., Del Genio, C. I. & Harrison, F. Data mining a medieval medical text reveals patterns in ingredient choice that reflect biological activity against infectious agents. *MBio* **11**, (2020).
149. Société de Naturalistes et d'Agriculteurs. Sarcocollier. in *Nouveau Dictionnaire d'Histoire Naturelle, appliquée aux arts, à l'agriculture, à l'économie rurale et domestique, à la médecine, etc.* (ed. Deterville) 182–183 (1819).
150. Botanical Society of Edinburgh. Astragalus Sarcocolla, Dymock. Leguminosae. in *Transactions and Proceedings of the Botanical Society, Volume XVIII* 18–19 (1891).
151. Amiri, M. S., Joharchi, M. R., Nadaf, M. & Nasseh, Y. Ethnobotanical knowledge of Astragalus spp.: The world's largest genus of vascular plants. *Avicenna J. phytomedicine* **10**, 128–142 (2020).
152. GBIF. Carte des localisations des observations d'espèces du genre Astragalus enregistrées. <https://www.gbif.org/fr/species/2933951> (2022).

153. Ayubi-Rad, M. *et al.* Effects of *Astragalus fasciculifolius* gum on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. HerbMed Pharmacol.* **9**, 328–332 (2020).
154. Owfi, R. E. & Barani, H. Investigation of Backgrounds of Product, Supply and Use of *Astragalus* Genus Case Study : Fars Province , Iran. *Int. J. Progress. Sci. Technol.* **11**, 86–93 (2018).
155. Blakelock, R. A. The Rustam Herbarium, Iraq: Part V. Systematic List. *Kew Bull.* **8**, 207–229 (1953).
156. Lev, E. & Amar, Z. *Sarcocolla*. in *Practical Materia Medica of the Medieval Eastern Mediterranean According to the Cairo Genizah* (ed. Brill) 278–279 (2008).
157. Crinon, C. Les astragales à gomme adragante, par M. Planchon. in *Répertoire de Pharmacie, archives de pharmacie, recueil pratique fondé par le Professeur Bouchardat, troisième série, tome 4* 136 (1892).
158. Alshammari, T. M., Khalidah, ; & Alenazi, A. Anzaroot (*Astragalus sarcocolla* dymock) is associated with Acute hepatitis and hepatic encephalopathy in children. *Open J Clin Med Case Rep* **3**, 1–6 (2017).
159. Usama Mazhar, M. *et al.* In-vitro anticoagulant activity of three extracts of *Astragalus sarcocolla*. *Pakistan J. Med. Heal. Sci.* **14**, 393–396 (2020).
160. Kalam, A., Alam, M. T. & Farooq, F. Management of Non-Healing Ulcer with topical application of Marham-i-'Asal - A case study. *Int. J. AYUSH Case Reports* **5**, 78–83 (2021).
161. Al-Fuhaid , Nawal Abdulaziz, Al-Fuhaid, N. A. Repellency and Fumigant Toxicity of Aloe vera, *Astragalus sarcocolla* , *Commiphora myrrha* and *Ferula assa-foetida* L Gum Resin Powders and Methanol Extracts against *Trogoderma granarium* Everts. *Int. J. Agric. Sci. Res.* **7**, 597–604 (2017).
162. *Astragallus sarcocolla* par Rizorius (sous licence CC BY-SA 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>). <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Anzurut.jpg> (2020).
163. *Astragalus fasciculifolius* observé en Émirats Arabes Unis par Altaf Habib (sous licence CC BY-NC 4.0 <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). 2022 <https://www.gbif.org/fr/occurrence/3747213508>.
164. Ababutain, I. M. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *sarcocolla* gum resin. *Pakistan J. Biol. Sci.* **20**, 571–576 (2017).
165. Ríos, J. L. & Waterman, P. G. A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus*. *Phyther. Res.* **11**, 411–418 (1997).
166. Tang, W. & Eisenbrand, G. *Astragalus membranaceus* (Fish.) Bge. in *Chinese Drugs of Plant Origin - Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine* (ed. Springer-Verlag) 195 (1992).
167. Dechambre, A. Ammoniaque (Gomme). in *Dictionnaire Encyclopédique des Sciences Médicales - Tome Troisième (ALH - AMP)* (eds. Masson, G. & Asselin, P.) 716–721 (1865).

168. Leared, A. Exudations. Umbellifere. in *Marocco and the Moors: an beoing an account of travels, with a general description of the country and its people* (ed. Burton, R. F.) 345–347 (Scribner & Welford, 1891).
169. American Pharmaceutical Association. Umbelliferae. African Ammoniacum. in *Proceedings of the American Pharmaceutical Association at the Twenty-First Annual Meeting* (ed. American Pharmaceutical Association) 230–232 (Sherman & Co, 1874).
170. Stapf, O. The Gums Ammoniac of Morocco and the Cyrenaica. (*Ferula communis*, L., var. *brevifolia*, Mariz; *Ferula marmarica*. Aschers. and Taub.). *Bull. Misc. Informations (Royal Bot. Gard. Kew)* **10**, 375–388 (1907).
171. Howes, F. N. Age-Old Resins of the Mediterranean Region and Their Uses. *Econ. Bot.* **4**, 307–316 (1950).
172. Hanbury, D. African Ammoniacum. *Pharm. J. Trans.* **3**, 741–742 (1872).
173. Pitchon, V. La médecine - Traduction et appropriation. in *La gastronomie arabe médiévale, entre diététique et plaisir* 31–39 (2018).
174. Langenhein, J. H. Umbelliferous Resins. in *Plant Resins - Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany* (ed. Timber Press) 412–417 (Timber Press, 2003). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
175. Morteza, Y. et al. In vitro cytotoxic activity of the essential oil of *Dorema ammoniacum* D. Don. **7**, 511–514 (2011).
176. Pereira, J., Farre, F. J., Bentley, R., Wood, H. C. & Warrington, R. *Dorema ammoniacum*. in *Manual of Materia Medica & Therapeutics* (ed. Lea, H. C.) 667–669 (Longmans, Green and Compagny, 1866).
177. Boghrati, Z. & Iranshahi, M. *Ferula* species: A rich source of antimicrobial compounds. *Journal of Herbal Medicine* vol. 16 (2019).
178. Elibol, Z., Menemen, Y., Sağiroğlu, M. & Duman, H. A molecular phylogenetic study on some Turkish *Ferula* L. (apiaceae) species using nrDNA its sequences. *Pakistan J. Bot.* **44**, 589–594 (2012).
179. GBIF. Carte des localisations des observations d'espèces du genre *Ferula* enregistrées. <https://www.gbif.org/fr/species/3034682> (2022).
180. Delnavazi, M. R., Tavakoli, S., Rustaie, A., Batooli, H. & Yassa, N. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils and extracts of *Dorema ammoniacum* roots and aerial parts. *Res. J. Pharmacogn.* **1**, 11–18 (2014).
181. Ahmadi, E., Rezadoost, H., Alilou, M., Stuppner, H. & Moridi Farimani, M. Purification, structural characterization and antioxidant activity of a new arabinogalactan from *Dorema ammoniacum* gum. *Int. J. Biol. Macromol.* **194**, 1019–1028 (2022).
182. Zaheri Abdevand, Z., Siahpoosh, A., Malayeri, A., Salami, A. & Khorsandi, L. Determination the Effectiveness of a selected formulations of Iranian Traditional Medicine Ushaq poultice• (ammoniacum gum ointment) on Wound Healing: an experimental study. *J. Contemp. Med.*

- Sci.* **6**, 39–49 (2020).
183. Kurzyna-Młynik, R. *et al.* Phylogenetic position of the genus *Ferula* (Apiaceae) and its placement in tribe Scandiceae as inferred from nrDNA ITS sequence variation. *Plant Syst. Evol.* **274**, 47–66 (2008).
 184. The Royal Botanic Gardens Kew. *Ferula* Tourn. ex. L. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30105171-2/general-information>.
 185. Rajani, M., Saxena, N., Ravishankara, M. N., Desai, N. & Padh, H. Evaluation of the antimicrobial activity of ammoniacum gum from *Dorema ammoniacum*. *Pharm. Biol.* **40**, 534–541 (2002).
 186. Bagheri, S. M., Hedesh, S. T., Mirjalili, A. & Dashti-R, M. H. Evaluation of Anti-inflammatory and Some Possible Mechanisms of Antinociceptive Effect of *Ferula assa foetida* Oleo Gum Resin. *J. Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **21**, 271–276 (2016).
 187. Mandegary, A., Mandegary, A., Sayyah, M. & Heidari, R. *Antinociceptive and Anti-inflammatory Activity of the Seed and Root Extract of Ferula gummosa Boiss in Mice and Rats*. vol. 12 (2004).
 188. Ghasemi, Z., Rezaee, R., Aslani, M. R. & Boskabady, M. H. Anti-inflammatory, anti-oxidant, and immunomodulatory activities of the genus *Ferula* and their constituents: A review. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **24**, 1613–1623 (2021).
 189. Huang, L., Wang, M., Ebrahimzadeh, M. A., Jafari, A. & Jiang, K. Stereological and molecular studies on the effects of *Ferula persica* extract on wound healing in rats. *Vet. Med. Sci.* **8**, 318–327 (2022).
 190. Zhou, Y. *et al.* Recent Advances on Bioactive Constituents in *Ferula*. *Drug Dev. Res.* **78**, 321–331 (2017).
 191. Mohammadhosseini, M., Venditti, A., Sarker, S. D., Nahar, L. & Akbarzadeh, A. The genus *Ferula*: Ethnobotany, phytochemistry and bioactivities – A review. *Ind. Crops Prod.* **129**, 350–394 (2019).
 192. Arnoldi, L. *et al.* HPLC-DAD-MS identification of bioactive secondary metabolites from *Ferula communis* roots. *Fitoterapia* **75**, 342–354 (2004).
 193. Leuchs, J. C. Vert-de-gris. in *Traité complet des propriétés, de la préparation et de l'emploi des matières tinctoriales et des couleurs - Deuxième partie, Fabrication des couleurs* (ed. Malther et Compagnie) 296–306 (1829).
 194. Scott, D. A., Taniguchi, Y. & Koseto, E. The verisimilitude of verdigris: a review of the copper carboxylates. *Stud. Conserv.* **46**, 73–91 (2001).
 195. Ryding, K. C. Islamic alchemy according to Al-Khwarizmi. *Ambix* **41**, 121–134 (1994).
 196. Arendsen, L. P., Thakar, R. & Sultan, A. H. The use of copper as an antimicrobial agent in health care, including obstetrics and gynecology. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, 1–28 (2019).
 197. Moellering, R. C. Past, Present, and Future of Antimicrobial Agents. *Am. J. Medicine* **99**, 11–

- 18 (1995).
198. Cope, Z. The Treatment of Wounds Through the Ages. *Med. Hist.* **2**, 163–174 (1958).
 199. Borkow, G., Okon-Levy, N. & Gabbay, J. Copper Oxide Impregnated Wound Dressing: Biocidal and Safety Studies. *Wounds* **22**, 301–310 (2010).
 200. Begg, S. L. The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 77–87 (2019).
 201. Zanzen, U., Bovenkamp-Langlois, L., Klysubun, W., Hormes, J. & Prange, A. The interaction of copper ions with *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*: an X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy study. *Arch. Microbiol.* **200**, 401–412 (2018).
 202. van Wyk, B. E., van Rheede van Oudtshoorn, M. C. B. & Smith, G. F. Geographical Variation in The Major Compounds of *Aloe ferox* Leaf Exudate. *Planta Med.* **61**, 250–253 (1995).
 203. Lee, S. *et al.* Mass spectrometry-based metabolite profiling and antioxidant activity of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) in different growth stages. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 11222–11228 (2012).
 204. Zhong, J. S., Wan, J. Z., Ding, W. J., Wu, X. F. & Xie, Z. Y. Multi-responses extraction optimization combined with high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and chemometrics techniques for the fingerprint analysis of *Aloe barbadensis* Miller. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **107**, 131–140 (2015).
 205. Ulrich, J. *et al.* Phytochemical Composition of *Commiphora Oleogum* Resins and Their Cytotoxicity against Skin Cancer Cells. *Molecules* **27**, 1–20 (2022).
 206. Asif, A., Asif Saeed, M. & Owaid, M. N. Cytotoxic effect of some furanosesquiterpenes from *balsamodendron myrrha* nees. Oleo-gum-resin on brine shrimp (*artemia salina*) larvae. *Acta Pharm. Sci.* **58**, 433–451 (2020).
 207. Heinz Brieskorn, C. & Noble, P. Furanosesquiterpenes from the essential oil of myrrh. *Phytochemistry* **22**, 1207–1211 (1983).
 208. Heinz Brieskorn, C. & Noble, P. Two furanosesquiterpenes from the essential oil of myrrh. *Phytochemistry* **22**, 187–189 (1983).
 209. Ubillas, R. P. *et al.* Antihyperglycemic Furanosesquiterpenes from *Commiphora myrrha*. *Planta Med.* **65**, 778–779 (1999).
 210. Khalil, N., Fikry, S. & Salama, O. Bactericidal activity of Myrrh extracts and two dosage forms against standard bacterial strains and multidrug-resistant clinical isolates with GC/MS profiling. *AMB Express* **10**, (2020).
 211. Hanuš, L. O., Řezanka, T. & Dembitsky, V. M. Myrrh - *Commiphora* Chemistry. *Biomed. Pap.* **149**, 3–28 (2005).
 212. ChemAxon. Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification 4.0. <https://cfmid.wishartlab.com/>.

213. Hu, X. & Goff, H. D. Fractionation of polysaccharides by gradient non-solvent precipitation: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **81**, 108–115 (2018).
214. Lamnaouer, D., Bodo, B., Martin, Am.-T. & Molho, D. Ferulenol and w-hydroxyferulenol, toxic coumarins from *Ferula communis* car. genuina. *Phytochemistry* **26**, 1613–1615 (1987).
215. Appendino, G., Tagliapietra, S., Gariboldi, P., Nano, G. M. & Piccit, V. w-oxygenated prenylated coumarins from *Ferula communis*. **27**, 3619–3624 (1988).
216. Appendino, G., Tagliapietra, S., Nano, G. M. & Picci, V. Ferprenin, a prenylated coumarin from *Ferula communis*. *Phytochemistry* **27**, 944–946 (1988).
217. Liu, B., Raeth, T., Beuerle, T. & Beerhues, L. A novel 4-hydroxycoumarin biosynthetic pathway. *Plant Mol. Biol.* **72**, 17–25 (2010).
218. Gliszczyńska, A. & Brodelius, P. E. Sesquiterpene coumarins. *Phytochem. Rev.* **11**, 77–96 (2012).
219. Akaberi, M., Iranshahy, M. & Iranshahi, M. Review of the traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of giant fennel (*Ferula communis* l. subsp. *communis*). *Iran. J. Basic Med. Sci.* **18**, 1050–1062 (2015).
220. Nazari, Z. E. & Iranshahi, M. Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species. *Phyther. Res.* **25**, 315–323 (2011).
221. Ahmed, A. A. *et al.* Rare trisubstituted sesquiterpenes daucanes from the wild *Daucus carota*. *Phytochemistry* **66**, 1680–1684 (2005).
222. Howard, C. *et al.* DNA authentication of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) commercial products targeting the ITS region. *Genes (Basel)*. **10**, 1–20 (2019).
223. El Alaoui, M. A. *et al.* Extraction of High Quality DNA from Seized Moroccan Cannabis Resin (Hashish). *PLoS One* **8**, 1–6 (2013).
224. Somma, M. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. (2006).
225. White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. & Taylor, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 315–322 (1990). doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
226. Chen, S. *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* **5**, 1–8 (2010).
227. Tzika, E., Ferrara, D., Trellu, L. T. & Barouti, N. Surinfection de plaie chronique par *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Med Suisse* **11**, 768–72 (2015).
228. Indrayanto, G., Putra, G. S. & Suhud, F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. in *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* vol. 46 273–307 (Elsevier Inc., 2021).
229. Guijarro-Muñoz, I., Compte, M., Álvarez-Cienfuegos, A., Álvarez-Vallina, L. & Sanz, L. Lipopolysaccharide activates toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF-κB signaling pathway

- and proinflammatory response in human pericytes. *J. Biol. Chem.* **289**, 2457–2468 (2014).
230. Yunna, C., Mengru, H., Lei, W. & Weidong, C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* **877**, 173090 (2020).
 231. Sapudom, J. *et al.* 3D in vitro M2 macrophage model to mimic modulation of tissue repair. *NPJ Regen. Med.* **6**, 1–13 (2021).
 232. Pham, T. N. *et al.* Identification and antialgal properties of o-coumaric acid isolated from *Eupatorium fortunei* Turcz. *J. Vietnamese Environ.* **9**, 228–234 (2018).
 233. Al-Yahya, M. A., Muhammad, I., Mirza, H. H. & El-Feraly, F. S. Antibacterial constituents from the rhizomes of *Ferula communis*. *Phyther. Res.* **12**, 335–339 (1998).
 234. Appendino, G. *et al.* Antimycobacterial coumarins from the Sardinian giant fennel (*Ferula communis*). *J. Nat. Prod.* **67**, 2108–2110 (2004).
 235. Stefanović, O. D., Stanojević, D. D. & Čomić, L. R. Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **69**, 457–463 (2012).
 236. Fratini, F. *et al.* A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiol. Res.* **195**, 11–17 (2017).
 237. Wright, G. D. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends Microbiol.* **24**, 862–871 (2016).
 238. Tippayawat, P., Phromviyo, N., Boueroy, P. & Chompoosor, A. Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ* **2016**, 1–15 (2016).
 239. Baláž, M. *et al.* Mechanochemistry as an alternative method of green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity: A comparative study. *Nanomaterials* **11**, (2021).
 240. Surmawar, N. V., Thakare, S. R. & Khaty, N. T. One-pot, single step green synthesis of copper nanoparticles: SPR nanoparticles. *Int. J. Green Nanotechnol. Biomed.* **3**, 302–308 (2011).
 241. Jepps, O. G., Dancik, Y., Anissimov, Y. G. & Roberts, M. S. Modeling the human skin barrier - Towards a better understanding of dermal absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 152–168 (2013).
 242. Wagner, H. & Bladt, S. Appendix A, Spray Reagents. in *Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas* 364 (Springer Berlin, Heidelberg, 2001). doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>.
 243. ChemCalc. Find molecular formula from a monoisotopic mass. <https://www.chemcalc.org/mf-finder>.
 244. Ajani, Y., Ajani, A., Cordes, J. M., Watson, M. F. & Downie, S. R. Phylogenetic analysis of nrDNA ITS sequences reveals relationships within five groups of Iranian Apiaceae subfamily Apioidae. *Taxon* **57**, 383–401 (2008).

245. Panahi, M. *et al.* Phylogenetic relationships among *Dorema*, *Ferula* and *Leutea* (Apiaceae: Scandiceae: Ferulinae) inferred from nrDNA ITS and cpDNA noncoding sequences. *Taxon* **64**, 770–783 (2015).
246. Panahi, M. *et al.* Taxonomy of the traditional medicinal plant genus *Ferula* (Apiaceae) is confounded by incongruence between nuclear rDNA and plastid DNA. *Bot. J. Linn. Soc.* **188**, 173–189 (2018).
247. Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **3**, 163–175 (2008).
248. Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibnsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **6**, 71–79 (2016).
249. Wadhwani, T. *et al.* Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. **7**, 1–6 (2008).
250. Barnes, J. D., Denney, R. C., Mendham, J. & Thomas, M. J. K. Chromatographie en phase liquide. in *Analyse chimique quantitative de Vogel* 283–313 (De Boeck Supérieur, 2006).
251. Pillai, S. K., Eliopoulos, G. M. & Moellering, R. C. Antimicrobial combination. in *Antibiotics in Laboratory Medicine* (ed. Lorian, V. M. D.) 365–409 (Lippincott, 2005).
252. Bonapace, C. R., Bosso, J. A., Friedrich, L. V. & White, R. L. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**, 363–366 (2002).



Annexes

P 257 à p 264



Annexe 1. Monographie de la Ph. Eur. 11.0¹¹¹ pour les extraits d’aloès

Aloès (extrait sec titré d’)

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 11.0

DOSAGE

Effectuez le dosage à l’abri d’une lumière vive.
Dans une fiole conique de 250 mL, introduisez 0,400 g de drogue végétale pulvérisée (180) (2.9.12). Humectez avec 2 mL de méthanol R, ajoutez 5 mL d’eau R chauffée au préalable à environ 60 °C et mélangez. Ajoutez encore 75 mL d’eau R chauffée à la même température et agitez le mélange pendant 30 min. Refroidissez et filtrez dans une fiole jaugée. Rincez la fiole conique et le filtre avec 20 mL d’eau R. Ajoutez l’eau de lavage dans la fiole jaugée et complétez à 1000,0 mL avec de l’eau R. Introduisez 10,0 mL de cette solution dans un ballon à fond rond de 100 mL contenant 1 mL d’une solution de chlorure ferrique R à 600 g/L et 6 mL d’acide chlorhydrique R. Chauffez à reflux dans un bain-marie pendant 4 h en prenant soin que le niveau de l’eau soit toujours au-dessus de celui du liquide dans le ballon. Laissez refroidir. Introduisez la solution dans une ampoule à décanter. Lavez successivement le ballon avec 4 mL d’eau R, 4 mL d’hydroxyde de sodium 1 M et 4 mL d’eau R et ajoutez les solutions de lavage au contenu de l’ampoule. Agitez le contenu de l’ampoule à décanter avec 3 fois 20 mL d’éther R. Réunissez les phases étherées, lavez-les avec 2 fois 10 mL d’eau R et rejetez les eaux de lavage. Complétez la phase organique à 100,0 mL avec de l’éther R. Prélevez-en 20,0 mL et évaporez-les avec précaution à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL d’une solution d’acétate de magnésium R à 5 g/L dans le méthanol R. Mesurez l’absorbance (2.2.25) à 512 nm, en utilisant du méthanol R comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloine, à l’aide de l’expression suivante :

$$\frac{A \times 19,6}{m}$$

en prenant 255 comme valeur de l’absorbance spécifique de la barbaloine.

A = absorbance à 512 nm,

m = masse de la prise d’essai, en grammes.

CONSERVATION

En récipient étanche.



ALOÈS (EXTRAIT SEC TITRÉ D’)

Aloes extractum siccum normatum

DÉFINITION

Extrait sec titré préparé à partir d’Aloès des Barbades (0257) ou d’Aloès du Cap (0258) ou d’un mélange des 2.

Teneur : 19,0 pour cent à 21,0 pour cent de dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloine (C₂₁H₁₂O₉; M_r 418,4), ajustée si nécessaire (extrait desséché).

PRODUCTION

L’extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l’eau bouillante.

CARACTÈRES

Aspect : poudre brune ou brun-jaune.

Solubilité : assez soluble dans l’eau bouillante.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

Solution à examiner. Chauffez dans un bain-marie jusqu’à ébullition 0,25 g d’extrait à examiner avec 20 mL de méthanol R. Agitez pendant quelques minutes, prélevez la solution et maintenez-la à environ 4 °C; la solution doit être utilisée dans les 24 h.

Solution témoin. Dissolvez 2 mg d’aloe-émuline R et 2 mg de barbaloine R dans du méthanol R et complétez à 1 mL avec le même solvant.

Plaque : plaque au gel de silice pour CCM R (5-40 µm) [ou plaque au gel de silice pour CCM R (2-10 µm)].

Phase mobile : eau R, méthanol R, acétate d’éthyle R (13:17:100 V/V/V).

Dépôt : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 20 mm [ou 8 mm].

Développement : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

Séchage : à l’air.

Détection A : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

Résultats A : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d’autres bandes de faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Haut de la plaque		
Aloe-émuline : une bande de fluorescence jaune		Une bande de fluorescence bleue
		Une bande de fluorescence bleue
Barbaloine : une bande de fluorescence orange	Une bande de fluorescence orange (barbaloine)	Une bande de fluorescence orange (barbaloine)
		Une bande de fluorescence blanc-bleu
	Une bande de fluorescence vert-bleu	Une bande de fluorescence blanc-bleu
Solution témoin	Solution à examiner (aloès de Barbades)	Solution à examiner (aloès du Cap)

Détection B : traitez avec de la solution d’hydroxyde de potassium R à 100 g/L dans du méthanol R et chauffez à 110 °C pendant 5 min ; examinez à la lumière du jour.

Résultats B : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d’autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Haut de la plaque		
Aloe-émuline : une bande violette		
Barbaloine : une bande brune	Une bande brune (barbaloine) Une bande violette	Une bande brune (barbaloine)
Solution témoin	Solution à examiner (aloès de Barbades)	Solution à examiner (aloès du Cap)

ESSAI

Perte à la dessiccation (2.8.17) : au maximum 4,0 pour cent.

Cendres totales (2.4.16) : au maximum 2,0 pour cent.

DOSAGE

Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.

Dans une fiole conique de 250 mL, introduisez 0,400 g d'extrait à examiner. Humectez avec 2 mL de méthanol R, ajoutez 5 mL d'eau R chauffée au préalable à environ 60 °C et mélangez. Ajoutez encore 75 mL d'eau R à 60 °C et agitez le mélange pendant 30 min. Refroidissez et filtrez dans une fiole jaugée. Rincez la fiole conique et le filtre avec 20 mL d'eau R. Ajoutez l'eau de lavage dans la fiole jaugée, puis complétez à 1,0 L avec de l'eau R. Introduisez 10,0 mL de cette solution dans un ballon à fond rond de 100 mL contenant 1 mL d'une solution de chlorure ferrique R à 600 g/L et 6 mL d'acide chlorhydrique R. Chauffez à reflux dans un bain-marie pendant 4 h en veillant à ce que le niveau de l'eau soit toujours au-dessus de celui du liquide dans le ballon. Laissez refroidir. Introduisez la solution dans une ampoule à décanter. Lavez successivement le ballon avec 4 mL d'eau R, 4 mL d'hydroxyde de sodium 1 M et 4 mL d'eau R, puis ajoutez les solutions de lavage au contenu de l'ampoule. Agitez le contenu de l'ampoule à décanter avec 3 fois 20 mL d'éther R. Réunissez les phases étherées, lavez avec 2 fois 10 mL d'eau R et rejetez les solutions de lavage. Complétez la phase organique à 100,0 mL avec de l'éther R. Prélevez 20,0 mL et évaporez-les avec précaution à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'acétate de magnésium R à 5 g/L dans le méthanol R. Mesurez l'absorbance (2.2.25) à 512 nm, en utilisant du méthanol R comme liquide de compensation. Calculez la teneur pour cent en dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 19,6}{m}$$

en prenant 255 comme valeur de l'absorbance spécifique de la barbaloine.

A = absorbance à 512 nm,

m = masse de la prise d'essai, en grammes.

est fin et mou. Les graines sont agglomérées en 3 amas de 5-25 graines, divisées par des cloisons blanchâtres. Les graines dures, de 2-3 mm de diamètre, sont irrégulièrement polyédriques, à surface brun-rouge ou brun-noir, finement ridées, entourées d'un arille membraneux transparent et brun pâle ; l'albumen est gris-blanc.

A. longiligulare. Le fruit est une capsule indéhiscence, allongée, ovoïde ou elliptique, trigone, à côtes marquées, pouvant atteindre 2 cm de long et 1,2 cm de diamètre. La surface externe, brune, cannelée longitudinalement, est écailleuse et porte de nombreuses protubérances molles, parfois ramifiées, en forme d'épine. L'apex porte un stylopode proéminent. La base du fruit montre la cicatrice du pédoncule. Le péricarpe est épais et dur. Les graines sont agglomérées en 3 amas relativement petits, d'environ 2-24 graines, séparés par des cloisons incomplètes. Chaque graine, de petite taille (1,5-2 mm de diamètre), est polyédrique, à angles émoussés, à surface brun-rouge ou brun-noir, finement ridée et entourée d'un arille membraneux transparent et brun pâle ; l'albumen est blanchâtre.

B. A. villosum. Examen microscopique (2.8.23). La poudre est brun-gris. Examinez au microscope en utilisant de la solution d'hydrate de chloral R. La poudre présente les éléments caractéristiques suivants : des fragments d'épicarpe composé de cellules orange-brun, polyédriques, contenant des microcristaux et des prismes d'oxalate de calcium, nettement visibles en lumière polarisée, et parfois de longs poils tecteurs d'environ 250 µm de long, généralement unicellulaires, droits ou courbés, à paroi légèrement et régulièrement épaissie ; des fragments de mésocarpe composé de cellules polygonales à paroi fine et de cellules à huile essentielle, rondes, à contenu orangé à brun foncé ; des faisceaux vasculaires comportant des vaisseaux majoritairement spiralés et des fibres à paroi épaissie et ponctuée ; des fragments du tégument externe de la graine constitué d'une assise de cellules, fusiformes vues de face, à paroi légèrement et régulièrement épaissie, généralement accompagnée par une assise de cellules rectangulaires ou polyédriques perpendiculaires aux précédentes et, parfois, par des cellules à huile essentielle sous-jacentes ; des fragments rouge-brun du tégument interne de la graine, vu de face, composé de cellules à paroi fortement épaissie et lumière punctiforme, très régulièrement polyédriques ; des fragments du tégument interne, rouge-brun, vu en section transversale, composé de cellules palissadiques à parois latérales et inférieures fortement épaissies. Examinez au microscope en utilisant une solution de glycérol R à 50 pour cent V/V. La poudre présente de nombreux fragments composés de cellules sub-rectangulaires ou irrégulières remplies de petits grains d'amidon agglomérés ; certaines de ces cellules contiennent en plus de petits prismes d'oxalate de calcium ; quelques agglomérats de petits grains d'amidon sont également présents.

A. longiligulare. Examen microscopique (2.8.23). La poudre est brun-gris. Examinez au microscope en utilisant de la solution d'hydrate de chloral R. La poudre présente les éléments caractéristiques suivants : des fragments d'épicarpe composé de cellules orange-brun, polyédriques ou allongées, contenant des microcristaux et des prismes d'oxalate de calcium, nettement visibles en lumière polarisée ; des fragments de mésocarpe composé de cellules polygonales à paroi fine et de rares cellules à huile essentielle, rondes, à contenu orangé à brun foncé ; des faisceaux vasculaires comportant des vaisseaux spiralés ou réticulés et des fibres à paroi épaissie et nettement ponctuée ; des fragments de l'arille à cellules allongées à paroi très fine, dont certaines contiennent des prismes et des microcristaux nettement visibles en lumière polarisée ; des fragments du tégument externe de la graine constitué d'une assise de cellules, fusiformes



AMOMUM (FRUIT D')

Amomi fructus

DÉFINITION

Fruit mûr, séché, entier ou fragmenté, mondé ou non, d'*Amomum villosum* Lour. ou d'*Amomum longiligulare* T.L.Wu.

Teneur :

- huile essentielle : au minimum 30 mL/kg pour *A. villosum* (drogue anhydre) et au minimum 10 mL/kg pour *A. longiligulare* (drogue anhydre) ;
- acétate de bornyle ($C_{17}H_{26}O_2$; M_r 196,3) : au minimum 30,0 pour cent de l'huile essentielle.

IDENTIFICATION

A. villosum. Le fruit est une capsule indéhiscence, ovoïde ou elliptique, trigone, à côtes peu marquées, pouvant atteindre 2 cm de long et 1,5 cm de diamètre. La surface externe est brune et couverte de protubérances molles en forme d'épine. L'apex porte des restes de périanthe et la base est le plus souvent prolongée par le pédoncule. Le péricarpe

Annexe 2. Monographie de la Ph. Eur. 11.0¹¹¹ pour le suc d'*A. ferox*

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 11.0

Aloès du Cap

DOSAGE

Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.

Dans une fiole conique de 250 mL, introduisez 0,300 g de drogue végétale pulvérisée (180) (2.9.12). Humectez avec 2 mL de méthanol R, ajoutez 5 mL d'eau R chauffée au préalable à environ 60 °C et mélangez. Ajoutez encore 75 mL d'eau R chauffée à la même température et agitez le mélange pendant 30 min. Refroidissez et filtrez dans une fiole jaugée. Rincez la fiole conique et le filtre avec 20 mL d'eau R. Ajoutez l'eau de lavage dans la fiole jaugée et complétez à 1,0 L avec de l'eau R. Introduisez 10,0 mL de cette solution dans un ballon à fond rond de 100 mL contenant 1 mL d'une solution de chlorure ferrique R à 600 g/L et 6 mL d'acide chlorhydrique R. Chauffez à reflux dans un bain-marie pendant 4 h en prenant soin que le niveau de l'eau soit toujours au-dessus de celui du liquide dans le ballon. Laissez refroidir. Introduisez la solution dans une ampoule à décanter. Lavez successivement le ballon avec 4 mL d'eau R, 4 mL d'hydroxyde de sodium 1 M et 4 mL d'eau R et ajoutez les solutions de lavage au contenu de l'ampoule. Agitez le contenu de l'ampoule à décanter avec 3 fois 20 mL d'éther R. Réunissez les phases étherées, lavez-les avec 2 fois 10 mL d'eau R et rejetez les solutions de lavage. Complétez la phase organique à 100,0 mL avec de l'éther R. Prélevez-en 20,0 mL et évaporez-les avec précaution à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'acétate de magnésium R à 5 g/L dans du méthanol R. Mesurez l'absorbance (2.2.25) à 512 nm, en utilisant du méthanol R comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 19,6}{m}$$

en prenant 255 comme valeur de l'absorbance spécifique de la barbaloine.

A = absorbance à 512 nm,

m = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

En récipient étanche.



01/2017:0258

ALOÈS DU CAP

Aloe capensis

DÉFINITION

Suc concentré et séché provenant des feuilles d'*Aloe ferox* Mill.

Teneur : au minimum 18,0 pour cent de dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloine ($C_{21}H_{22}O_9$; M_r 418,4) (drogue desséchée).

CARACTÈRES

Aspect : masses brun foncé à reflets verdâtres et à cassure conchoïdale brillante, ou poudre brun-vert.

Solubilité : partiellement soluble dans l'eau bouillante et soluble à chaud dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai Aloès des Barbades.

Résultats A : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Haut de la plaque	
Aloe-émordine : une bande de fluorescence jaune	
	Une bande de fluorescence bleue
	Une bande de fluorescence bleue
Barbaloine : une bande de fluorescence orange	Une bande de fluorescence orange (barbaloine)
	Une bande de fluorescence blanc-bleu
Solution témoin	Solution à examiner

Résultats B : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Haut de la plaque	
Aloe-émordine : une bande violette	
Barbaloine : une bande brune	Une bande brune (barbaloine)
Solution témoin	Solution à examiner

ESSAI

Aloès des Barbades. Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

Solution à examiner. Chauffez au bain-marie jusqu'à ébullition 0,25 g de drogue végétale pulvérisée avec 20 mL de méthanol R. Agitez pendant quelques minutes, décantez la solution et maintenez-la à environ 4 °C ; la solution doit être utilisée dans les 24 h.

Solution témoin. Dissolvez 2 mg d'aloé-émordine R et 2 mg de barbaloine R dans du méthanol R et complétez à 1 mL avec le même solvant.

Plaque : plaque au gel de silice F₂₅₄ pour CCM R (5-40 µm) [ou plaque au gel de silice F₂₅₄ pour CCM R (2-10 µm)].

Phase mobile : eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R (13:17:100 V/V/V).

Dépôt : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 20 mm [ou 8 mm].

Développement : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

Séchage : à l'air.

Détection A : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

Résultats A : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence vert-bleu marquée située au-dessous de la bande blanc-bleu du tiers inférieur.

Détection B : traitez avec de la solution d'hydroxyde de potassium R à 100 g/L dans du méthanol R et chauffez à 110 °C pendant 5 min. Examinez à la lumière du jour.

Résultats B : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande violette située immédiatement au-dessous de la bande due à la barbaloine.

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 10,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de drogue végétale pulvérisée.

Cendres totales (2.4.16) : au maximum 2,0 pour cent.

Drogues végétales

Aloès (extrait sec titré d')

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 11.0

DOSAGE

Effectuez le dosage à l'abri d'une lumière vive.

Dans une fiole conique de 250 mL, introduisez 0,400 g de drogue végétale pulvérisée (180) (2.9.12). Humectez avec 2 mL de méthanol R, ajoutez 5 mL d'eau R chauffée au préalable à environ 60 °C et mélangez. Ajoutez encore 75 mL d'eau R chauffée à la même température et agitez le mélange pendant 30 min. Refroidissez et filtrez dans une fiole jaugée. Rincez la fiole conique et le filtre avec 20 mL d'eau R. Ajoutez l'eau de lavage dans la fiole jaugée et complétez à 1000,0 mL avec de l'eau R. Introduisez 10,0 mL de cette solution dans un ballon à fond rond de 100 mL contenant 1 mL d'une solution de chlorure ferrique R à 600 g/L et 6 mL d'acide chlorhydrique R. Chauffez à reflux dans un bain-marie pendant 4 h en prenant soin que le niveau de l'eau soit toujours au-dessus de celui du liquide dans le ballon. Laissez refroidir. Introduisez la solution dans une ampoule à décanter. Lavez successivement le ballon avec 4 mL d'eau R, 4 mL d'hydroxyde de sodium 1 M et 4 mL d'eau R et ajoutez les solutions de lavage au contenu de l'ampoule. Agitez le contenu de l'ampoule à décanter avec 3 fois 20 mL d'éther R. Réunissez les phases étherées, lavez-les avec 2 fois 10 mL d'eau R et rejetez les eaux de lavage. Complétez la phase organique à 100,0 mL avec de l'éther R. Prélevez-en 20,0 mL et évaporez-les avec précaution à siccité au bain-marie. Dissolvez le résidu dans 10,0 mL d'une solution d'acétate de magnésium R à 5 g/L dans le méthanol R. Mesurez l'absorbance (2.2.25) à 512 nm, en utilisant du méthanol R comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloine, à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{A \times 19,6}{m}$$

en prenant 255 comme valeur de l'absorbance spécifique de la barbaloine.

- A = absorbance à 512 nm,
- m = masse de la prise d'essai, en grammes.

CONSERVATION

En récipient étanche.

Solution à examiner. Chauffez dans un bain-marie jusqu'à ébullition 0,25 g d'extrait à examiner avec 20 mL de méthanol R. Agitez pendant quelques minutes, prélevez la solution et maintenez-la à environ 4 °C ; la solution doit être utilisée dans les 24 h.

Solution témoin. Dissolvez 2 mg d'aloë-émodine R et 2 mg de barbaloine R dans du méthanol R et complétez à 1 mL avec le même solvant.

Plaque : plaque au gel de silice pour CCM R (5-40 µm) [ou plaque au gel de silice pour CCM R (2-10 µm)].

Phase mobile : eau R, méthanol R, acétate d'éthyle R (13:17:100 V/V/V).

Dépôt : 10 µL [ou 2 µL] en bandes de 20 mm [ou 8 mm].

Développement : sur un parcours de 10 cm [ou 6 cm].

Séchage : à l'air.

Détection A : examinez en lumière ultraviolette à 365 nm.

Résultats A : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible fluorescence peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Haut de la plaque		
Aloë-émodine : une bande de fluorescence jaune		Une bande de fluorescence bleue
		Une bande de fluorescence bleue
Barbaloine : une bande de fluorescence orange	Une bande de fluorescence orange (barbaloine)	Une bande de fluorescence orange (barbaloine)
		Une bande de fluorescence blanc-bleu
	Une bande de fluorescence blanc-bleu	Une bande de fluorescence blanc-bleu
	Une bande de fluorescence vert-bleu	
Solution témoin	Solution à examiner (aloès de Barbades)	Solution à examiner (aloès du Cap)

Détection B : traitez avec de la solution d'hydroxyde de potassium R à 100 g/L dans du méthanol R et chauffez à 110 °C pendant 5 min ; examinez à la lumière du jour.

Résultats B : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Haut de la plaque		
Aloë-émodine : une bande violette		
Barbaloine : une bande brune	Une bande brune (barbaloine)	Une bande brune (barbaloine)
	Une bande violette	
Solution témoin	Solution à examiner (aloès de Barbades)	Solution à examiner (aloès du Cap)

01/2015:0259 corrigé 10.0



ALOÈS (EXTRAIT SEC TITRÉ D')

Aloes extractum siccum normatum

DÉFINITION

Extrait sec titré préparé à partir d'Aloès des Barbades (0257) ou d'Aloès du Cap (0258) ou d'un mélange des 2.

Teneur : 19,0 pour cent à 21,0 pour cent de dérivés hydroxyanthracéniques, exprimés en barbaloine (C₂₁H₂₂O₉ ; M_r 418,4), ajustée si nécessaire (extrait desséché).

PRODUCTION

L'extrait est produit à partir de la drogue végétale, par une méthode appropriée, avec de l'eau bouillante.

CARACTÈRES

Aspect : poudre brune ou brun-jaune.
Solubilité : assez soluble dans l'eau bouillante.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

Annexe 3. Monographie de la Ph. Eur. 11.0¹¹¹ pour la myrrhe, la gomme résine de *Commiphora* sp.

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 11.0 Myrrhe (teinture de)



07/2017:1349
corrigé 10.0

MYRRHE

Myrrha

DÉFINITION

Gomme résine, durcie à l'air, obtenue par incision ou par exsudation spontanée du tronc et des rameaux de *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. (syn. *Commiphora molmol* (Engl.) Engl. ex Tschirch) ou d'autres espèces de *Commiphora*.

CARACTÈRES

Saveur amère.

IDENTIFICATION

A. La myrrhe se présente sous forme de grains ou de fragments brun orangé clair ou foncé, irréguliers ou arrondis, de taille variable, constitués de composants de couleurs variées ; la surface des grains ou fragments est en général couverte d'une poussière grise ou brun-jaune.

B. Examen microscopique (2.8.23). La poudre est jaune-brun ou brun-rouge. Examinez au microscope en utilisant de la solution d'hydrate de chloral R. La poudre présente les éléments caractéristiques suivants : quelques fragments de tissus végétaux comprenant des fragments d'écorce brun-rouge ; des cellules scléreuses simples ou groupées, de forme polyédrique ou allongée, à paroi lignifiée et ponctuée fortement épaissie par endroits et à contenu brunâtre ; des fragments de cellules parenchymateuses à paroi mince et de fibres sclérénchymateuses ; des cristaux d'oxalate de calcium irréguliers, de forme prismatique ou polyédrique, mesurant environ 10-25 µm.

C. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai de *Commiphora mukul*.

Résultats B : voir ci-après la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

Haut de la plaque	
Anéthole : une bande violette	Une bande violet-rouge
Thymol : une bande orange	Une bande rouge
	Une bande violette
	Une bande marron
Solution témoin	Solution à examiner

ESSAI

Commiphora mukul. Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

Solution à examiner. A 0,2 g de myrrhe pulvérisée (355) (2.9.12), ajoutez 4,0 mL d'éthanol à 96 pour cent R. Traitez aux ultrasons pendant 10 min, puis filtrez.

Solution témoin. Dissolvez 10 mg de thymol R et 40 µL d'anéthole R dans 10 mL d'éthanol à 96 pour cent R.

Plaque : plaque au gel de silice F₂₅₄ pour CCM R (2-10 µm).

Phase mobile : acide acétique glacial R, éther isopropylique R, cyclohexane R (10:40:60 V/V/V).

Dépôt : 5 µL en bandes de 8 mm.

Développement : sur un parcours de 6 cm.

Séchage : à l'air.

Détection A : examinez en lumière ultraviolette à 366 nm.

Résultats A : le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner ne présente pas de bande de fluorescence bleue ou violette dans son tiers inférieur.

Détection B : traitez avec de la solution d'aldéhyde anisique R et chauffez à 100 °C pendant 2 min. Examinez à la lumière du jour.

Matières insolubles dans l'éthanol : au maximum 75 pour cent.

Introduisez 1,00 g de myrrhe pulvérisée (250) (2.9.12) dans un ballon. Ajoutez 30 mL d'éthanol à 96 pour cent R et agitez vigoureusement pendant 10 min. Filtrez le surnageant sur un filtre de verre fritté (16) (2.1.2) taré, en évitant d'entraîner le résidu du ballon. Répétez l'extraction avec 2 fois 20 mL d'éthanol à 96 pour cent R. Transférez le résidu quantitativement sur le filtre par rinçage du ballon avec de l'éthanol à 96 pour cent R. Séchez le filtre et le résidu à l'étuve à 100-105 °C. Pesez le résidu.

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 15,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C pendant 2 h sur 1,000 g de myrrhe pulvérisée (355) (2.9.12).

Cendres totales (2.4.16) : au maximum 7,0 pour cent.

07/2017:1877
corrigé 10.0



MYRRHE (TEINTURE DE)

Myrrhae tinctura

DÉFINITION

Teinture produite à partir de Myrrhe (1349).

PRODUCTION

La teinture de myrrhe est produite à partir de 1 partie de drogue et de 5 parties d'éthanol à 90 pour cent V/V, par une méthode appropriée.

CARACTÈRES

Aspect : liquide limpide, brun-jaune à brun orangé.

IDENTIFICATION

Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

Solution à examiner. Prélevez 5 mL de teinture de myrrhe et complétez à 10 mL avec de l'éthanol à 96 pour cent R.

Solution témoin. Dissolvez 10 mg de thymol R et 40 µL d'anéthole R dans 10 mL d'éthanol à 96 pour cent R.

Plaque : plaque au gel de silice F₂₅₄ pour CCM R (2-10 µm).

Phase mobile : acide acétique glacial R, éther isopropylique R, cyclohexane R (10:40:60 V/V/V).

Dépôt : 5 µL en bandes de 8 mm.

Développement : sur un parcours de 6 cm.

Séchage : à l'air.

Détection : traitez avec de la solution d'aldéhyde anisique R et chauffez à 100 °C pendant 2 min. Examinez à la lumière du jour.

Drogues végétales

Les Prescriptions Générales (1) s'appliquent à toutes les monographies et autres textes 1755

Elora Aubert

Identification de nouvelles associations antibactériennes issues de la Pharmacopée Médiévale Arabe

263

Table des figures

Figure 1 – Différences entre les parois des bactéries Gram+ et Gram- (tiré de Jiménez-Jiménez et al, 2022 ¹⁹).....	10
Figure 2 – Différents mécanismes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries (à partir de Levy and Marshal, 2004 ¹)	11
Figure 3 – Biofilms : A. Photographie au microscope à balayage d'un biofilm de <i>S. aureus</i> à la surface d'un dispositif médical (tirée de Donlan, 2002 ²²) ; B. Schéma des différents mécanismes de résistances aux antibiotiques au sein d'un biofilm bactérien (tiré de Hall and Mah, 2017 ²¹).....	12
Figure 4 – Carte simplifiée de l'expansion des Califats Islamiques : 622-632 expansion sous Mahomet ; 632-661 expansion pendant le Califats des patriarches ; 661-750 expansion pendant le Califat des Omeyyades (à partir d'une carte cédée au domaine publique ⁴⁰).....	16
Figure 5 – Schéma de la formation d'un abcès cutané induit par <i>S. aureus</i> (tiré de Kobayashi et al, 2015 ¹⁸).....	18
Figure 6 – Structures d'antibiotiques auxquels de nombreuses souches <i>S. aureus</i> sont devenues résistantes : la méticilline 1 (noyau β -lactame, famille des β -lactamines, inhibe la synthèse de l'enveloppe), l'oxytétracycline 2 (famille des cyclines, inhibe la synthèse des protéines), l'érythromycine 3 (famille des macrolides, inhibe la synthèse des protéines) et la gentamicine 4 (famille des aminosides, inhibe la synthèse des protéines)	20
Figure 7 – Structure de la mupirocine 5 , un antibiotique d'application topique et locale contre des infections cutanées par des staphylocoques (antibiotique produit par fermentation de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , inhibe la synthèse des protéines)	20
Figure 8 – Structures d'antibiotiques actuellement utilisés contre des infections causées par <i>S. aureus</i> (voies orale ou intraveineuse) : la vancomycine 6 (famille des glycopeptides, inhibe la synthèse de l'enveloppe), la télavancine 7 (famille des glycopeptides, inhibe la synthèse de l'enveloppe), le linézolide 8 (famille des oxazolidinones, inhibe la synthèse des protéines), la clindamycine 9 (famille des lincosamides, inhibe la synthèse des protéines) et la daptomycine 10 (famille des lipopeptides, inhibe la synthèse de l'enveloppe)	21
Figure 9 – Deux familles phytochimiques comportant des composés antibactériens : A. Les terpènes dont le thymol 11 (monoterpène C10), le nérolidol 12 et le farnésol 13 (sesquiterpènes C15) ; B. Les coumarines dont l'aegelinol 14 (noyau coumarine).....	24
Figure 10 – Composés phénoliques prénylés actifs des cônes femelles d' <i>H. lupulus</i> ⁶⁸ : A. acylphloroglucinols prénylées (dérivés d'humulone 15 et dérivés de lupulone 16) ; B. chalcones prénylées (xanthohumol 17).....	25
Figure 11 – Différents mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries (à partir de Lemire, Harrison et Turner, 2013 ⁴).....	29

Figure 12 – Stratégies antibactériennes actuellement utilisées impliquant des métaux (modifiée à partir de Pitchon et al, 2022 ⁸¹)	29
Figure 13 – Carte simplifiée de l’expansion des Califats Islamiques : 622-632 expansion sous Mahomet ; 632-661 expansion pendant le Califats des patriarches ; 661-750 expansion pendant le Califat des Omeyyades (à partir d’une carte cédée au domaine publique ⁴⁰)	36
Figure 14 – Présence mondiale de l’ <i>A. vera</i> (carte GBIF sur la base des observations recensées, consultée le 10.11.2022 ¹⁰⁶)	37
Figure 15 – A. Plant d’ <i>Aloe vera</i> ; B. Inflorescence d’ <i>Aloe vera</i> ; C. Suc séché et pulvérisé d’ <i>Aloe ferox</i> de chez Cailleau Herboristerie ; D. Schéma d’une coupe de feuille d’ <i>Aloe vera</i> (modifié à partir de Maan et al, 2018 ¹¹⁷)	38
Figure 16 – A. Composés majoritaires du suc d’ <i>A. vera</i> : aloïne A 18 , aloïne B 19 , aloèsine 20 et aloèrésine A 21 ; B. Noyaux des principales familles de composés présentes dans le suc d’ <i>A. vera</i> ^{125,128}	40
Figure 17 – Présence mondiale du genre <i>Commiphora</i> (carte GBIF sur la base des observations recensées, consultée le 10.11.2022 ¹³³)	42
Figure 18 – A. Planche botanique de <i>C. myrrha</i> ¹³⁸ ; B. Myrrhe exsudant du tronc d’un spécimen de <i>C. capensis</i> Engl. (1883, Burseraceae) ¹³⁹ ; C. Myrrhe sous forme de larmes ¹⁴⁰ ; D. Myrrhe séchée et pulvérisée de <i>C. abyssinica</i> (Cailleau Herboristerie)	43
Figure 19 – Furanosesquiterpènes de la myrrhe de <i>C. myrrha</i> présentant une activité antibactérienne (cycle furane) : la curzérénone 22 , le furanodiène-6-one 23 et le 2-méthoxyfuranoguaia-9-ène-8-one 24 ^{130,146}	44
Figure 20 – A. Sesquiterpénoïdes antiinflammatoires isolés de la myrrhe de <i>C. wightii</i> ¹³⁰ : le myrrhanol A 25 , le myrrhanone A 26 , l’E-guggulstérone 27 et le Z-guggulstérone 28 ; B. Furanosesquiterpénoïdes analgésiques isolés de la myrrhe de <i>C. myrrha</i> ^{130,147} : le curzérène 29 et le furanoeudesma-1,3-diène 30	45
Figure 21 – Présence mondiale du genre <i>Astragalus</i> (carte GBIF sur la base des observations recensées, consultée le 10.11.2022 ¹⁵²)	46
Figure 22 – A. Arbuste d’ <i>A. sarcocolla</i> ¹⁶² ; B. Fleurs et branches épineuses d’ <i>A. fasciculifolius</i> ¹⁶³ ; C. Gomme sarcocolle achetée chez un tradithérapeute au Pakistan, sous forme de larmes	48
Figure 23 – Composés du genre <i>Astragalus</i> : A. Exemple de saponine : l’astramembrainnine I 31 ^{165,166} ; B. Exemple d’alcaloïde indolizidinique : le swainsonine 32 ¹⁶⁵	49
Figure 24 – Présence mondiale (hors continent américain et australien) du genre <i>Ferula</i> (carte GBIF sur la base des observations recensées, consulté le 10.11.2022 ¹⁷⁹)	52
Figure 25 – A. Plant de <i>Ferula communis</i> ; B. Planche botanique de <i>Ferula ammoniacum</i> ; C. Gomme ammoniac achetée sous forme de masse chez un tradithérapeute à Rabat, Maroc.	53
Figure 26 – Sesquiterpènes antibactériens isolés de différentes <i>Ferula</i> : A. Le kuhistanol A 33 et le kuhistanol D 34 isolés de <i>F. kuhistania</i> ¹⁹⁰ ; B. La dshamirone 35 isolée de <i>F. feruloides</i> ¹⁷⁷	54

Figure 27 – Coumarines sesquiterpéniques bioactives d'espèces du genre <i>Ferula</i> : A. Férulénol 36 , 4-hydroxycoumarine prénylée antibactérienne isolée de <i>F. communis</i> ¹⁷⁷ ; B. Ombelliprénine 37 , antiinflammatoire et isolée de <i>F. szowitsiana</i> ^{188,191}	55
Figure 28 – Esters de daucane bioactifs isolés de <i>F. hermonis</i> ¹⁸⁸ : A. La férutinine 38 , antibactérienne et antiinflammatoire ; B. La téféridine 39 et la téférine 40 , antiinflammatoires.....	56
Figure 29 – A. Vert-de-gris formé sur une pièce de monnaie (acier cuivré) enveloppée pendant 3 jours dans un papier régulièrement imbibé de vinaigre de vin (pièce non-traitée en référence); B. Acétate de cuivre	57
Figure 30 – CCM contrôle du suc d' <i>A. ferox</i> ALOF réalisée selon la monographie analytique (Ph. Eur. ¹¹¹ Annexe 2), observée sous UV 365 nm : A. CCM avec la solution témoin d'aloé-émodyne + barbaloine (Témoins) et l'extrait de suc (ALOF), gel de silice avec un système H ₂ O/MeOH/EtOAc 13/10/100 v/v/v ; B. Résultats attendus par la monographie de la Ph. Eur.	64
Figure 31 – Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits hydroalcoolique (EH) et acétate d'éthyle (A) du suc d' <i>A. ferox</i> commercial ALOF (méthode REFERENCE)	65
Figure 32 – Chromatogrammes HPLC-HRMS/ESI (base peak) de l'extrait hydroalcoolique de suc d' <i>A. ferox</i> commercial ALOF-EH (méthode ALOES) : A. HPLC-HRMS/ESI+ ; B. HPLC-HRMS/ESI-	66
Figure 33 – CCM contrôle de la myrrhe de <i>C. abyssinica</i> commerciale réalisée selon la monographie analytique (Ph. Eur. ¹¹¹ Annexe 3) après révélation à la solution d'anisaldéhyde : A. CCM avec l'extrait de myrrhe (COMA1), la solution témoin (Témoins) et l'extrait de myrrhe 8 fois concentré (COMA1x8), gel de silice avec un système acide acétique glacial/éther isopropylique/cyclohexane 10/40/60 (v/v/v) ; B. Résultats attendus par la monographie de la Ph. Eur.	68
Figure 34 – Comparaison des CCM de la myrrhe <i>C. abyssinica</i> commerciale COMA1 et de référence COMA2, selon la Ph. Eur. ¹¹¹ (Annexe 3), gel de silice avec un système acide acétique glacial/éther isopropylique/ cyclohexane 10/40/60 (v/v/v) : A. sous UV à 365 nm ; B. après révélation à la solution d'anisaldéhyde.....	69
Figure 35 – Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits hydroalcoolique (EH) et à l'acétate d'éthyle (A) (chromatogramme de l'extrait au DCM similaire) de la myrrhe de <i>C. abyssinica</i> commerciale COMA1 (méthode DOREMA)	69
Figure 36 –Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits acétate d'éthyle des myrrhe de <i>C. abyssinica</i> commerciale (Cailleau Herboristerie) COMA1-A et de référence (droguier UMR7200 Strasbourg) COMA2-A (méthode DOREMA)	70
Figure 37 – Chromatogramme HPLC-HRMS/ESI+ (base peak) de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe de <i>C. abyssinica</i> de référence (droguier UMR7200) COMA2-A (méthode DOREMA)	71
Figure 38 – CCM contrôle de la myrrhe traditionnelle MYRR1 et de référence MYRR2 réalisées selon la Ph. Eur. (Annexe 3), après révélation à la solution d'anisaldéhyde : A. CCM avec l'extrait de MYRR1, la solution témoin et l'extrait de MYRR2, gel de silice avec un système acide acétique glacial/éther isopropylique/cyclohexane 10/40/60 (v/v/v) ; B. Description des résultats attendus par la Ph. Eur. ...	73

Figure 39 – Chromatogrammes HPLC-DAD à 254 nm des extraits acétate d'éthyle de la myrrhe traditionnelle (Maroc) MYRR1-A (représentatif des 3 extraits) et de la myrrhe de référence (droguier Tours) MYRR2-A (méthode DOREMA)	73
Figure 40 – Chromatogramme HPLC-HRMS/ESI+ (base peak) de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe traditionnelle (Maroc) MYRR1-A , représentatif des 3 extraits (méthode DOREMA)	75
Figure 41 – Chromatogramme HPLC-HRMS/ESI+ (base peak) de l'extrait acétate d'éthyle (A) de la myrrhe de référence du droguier de tours MYRR2 (méthode DOREMA)	76
Figure 42 – Structure des deux furanosesquiterpènes chez la myrrhe pouvant correspondre au composé majoritaire de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe traditionnelle MYRR1-A	77
Figure 43 – Proposition de fragmentation du 2-acétoxyfuranodiène 41 en ionisation ESI+	78
Figure 44 – Chromatogrammes HPLC-DAD à 254 nm des extraits hydroalcooliques (EH) et à l'acétate d'éthyle (A) (chromatogramme de l'extrait dichlorométhane similaire) de la gomme sarcocolle SARC (méthode REFERENCE)	80
Figure 45 – Chromatogrammes HPLC-HRMS/ESI+ et ESI- (base peak) des extraits hydroalcoolique (EH , méthode SARCOCOLLE-HYDRO) et acétate d'éthyle (A , méthode SARCOCOLLE-LIPO) de la gomme sarcocolle SARC	81
Figure 46 – Chromatogrammes HPLC-DAD à 254 nm des extraits acétate d'éthyle de la gomme ammoniacque traditionnelle (Maroc) AMMO1-A (représentatif des 3 extraits) et de la gomme ammoniacque de référence (droguier Tours) AMMO3-A (méthode DOREMA)	82
Figure 47 – Chromatogrammes HPLC-HRMS/ESI (base peak) de l'extrait acétate d'éthyle de « gomme ammoniacque » AMMO1-A (méthode DOREMA) : A . HPLC-HRMS/ESI+ ; B . HPLC-HRMS/ESI-	83
Figure 48 – Chromatogrammes HPLC-HRMS/ESI (base peak) des extraits acétate d'éthyle de la gomme ammoniacque traditionnelle AMMO1-A et de la gomme ammoniacque de référence (droguier Tours) AMMO3-A (méthode DOREMA)	85
Figure 49 – Structures chimiques de deux 4-hydroxycoumarines sesquiterpéniques du chémotype toxique de <i>Ferula communis</i> : A . Féculénol 36 ; B . ω -hydroxyféculénol 43	86
Figure 50 – Cytotoxicité des extraits acétate d'éthyle (A) des drogues végétales, exprimée en % d'activité mitochondriale en fonction de la concentration en extrait : A . sur des macrophages murins ; B . sur des fibroblastes murins	96
Figure 51 – Cytotoxicité de l'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ sur des macrophages murins, exprimée en % d'activité mitochondriale en fonction de la concentration en extrait	96
Figure 52 – Zones d'inhibitions obtenues pour les dépôts d'extraits de suc d' <i>A. ferox</i> (ALOF) et de myrrhe commerciale de <i>C. abyssinica</i> (COMA1) sur la souche <i>S. epidermidis</i> ATCC35983	99
Figure 53 – Zones d'inhibitions obtenues pour les différents dépôts d'extrait à l'acétate d'éthyle de gomme ammoniacque traditionnelle AMMO1-A (représentatif de l'activité des autres extraits d' AMMO1) sur les 7 souches bactériennes testées	100

Figure 54 – Dosage en nitrite reflétant la production en NO des macrophages murins en fonction de la concentration en extrait acétate d'éthyle des drogues végétales	108
Figure 55 – Dosage des TNF- α produits par des macrophages murins en présence des extraits à l'acétate d'éthyle (A) des drogues végétales à 125 $\mu\text{g/mL}$ (échelle logarithmique)	109
Figure 56 – Dosage en nitrites (μM) dans le surnageant des macrophages murins en fonction de la concentration en extrait à l'acétate d'éthyle (A) des drogues végétales.....	112
Figure 57 – Dosage des TNF- α produits par des macrophages murins activés par LPS, en présence des extraits à l'acétate d'éthyle des drogues végétales : A. à 125 $\mu\text{g/mL}$; B. à 62,5 $\mu\text{g/mL}$	112
Figure 58 – Photographies au microscope optique des tapis fibroblastique scindés en 2, avec la mesure en pixels de la coupure aux grossissements x4 et x10	113
Figure 59 – Moyenne en pixel de la taille de la coupure entre des fibroblastes murins, incubés 24h avec du surnageant de macrophages ayant été cultivés 3 jours avec les extraits à l'acétate d'éthyle des drogues végétales, à 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (n = 2) ou 125 $\mu\text{g/mL}$ (n = 2)	115
Figure 60 – Photographies sur microscope optique des tapis fibroblastiques scindés, après incubation avec le surnageant des macrophages, eux-mêmes incubés 3 jours avec du LPS (gauche) ou sans LPS (droite)	116
Figure 61 – Fractionnement par partition liquide/liquide sur l'extrait hydroalcoolique de la gomme ammoniacale traditionnelle AMMO1-EH : A. Rendement R de chaque fraction ; B. Profils HPLC-DAD des fractions cyclohexane et dichlorométhane, mes signaux communs surlignés	122
Figure 62 – Fractionnement par LC-Flash sur l'extrait hydroalcoolique de la gomme ammoniacale traditionnelle AMMO1-EH : A. Chromatogramme à 254 nm avec le système d'élution, les 5 fractions dont les fractions F1 et F2 surlignées (méthode FLASH_AMMO_12G avec Cyclohexane/EtOAc/MeOH) ; B. Rendement de chaque fraction	124
Figure 63 – Superposition des chromatogrammes HPLC-DAD à 254 nm de l'extrait AMMO1-EH et de ses fractions obtenues par séparation sur LC-Flash (FLASH_AMMO-12G) avec les signaux des fractions F1 et F2 surlignés (méthode DOREMA)	125
Figure 64 – Profil de la fraction F1 en HPLC-DAD à 254 nm (méthode DOREMA)	126
Figure 65 – Séparation par LC-Flash de la fraction F1 : A. Chromatogramme LC-Flash UV 254 nm avec le système d'élution et la sous-fraction contenant le composé majoritaire surlignée (méthode FLASH_AMMO_F1 avec Cyclohexane/EtOAc) ; B. Chromatogramme HPLC-DAD 254 nm de la sous-fraction contenant le composé majoritaire F1-C (méthode DOREMA)	127
Figure 66 – Purification par HPLC semi-préparative du composé majoritaire de la fraction F1 : A. Chromatogramme HPLC semi-préparative UV avec le système d'élution et le composé majoritaire F1-C surligné (méthode PLC_AMMO_F1) ; B. Chromatogramme HPLC-DAD 254 nm du composé majoritaire F1-C isolé (méthode DOREMA)	127
Figure 67 – Profil de la fraction F2 en HPLC-DAD à 254 nm et 360 nm (méthode DOREMA)	128

Figure 68 – Suivi par CCM de la séparation de la fraction F2 sur colonne ouverte par palier isocratique avec un système DCM/EtOAc 95/5 (v/v) jusqu'à 90/10 (v/v) [conditions d'élution CCM : DCM/EtOAc 75/25 (v/v)]• : A. sous UV 365 nm ; B. après révélation à la vanilline sulfurique	129
Figure 69 – Purification par HPLC semi-préparative des composés F2-A et F2-E de la fraction F2 : A. Chromatogramme HPLC semi-préparative UV avec les composés F2-A et F2-E surlignés (méthode PLC_AMMO_F2) ; B. Chromatogramme HPLC-DAD 254 nm des composés F2-A et F2-E isolés (méthode DOREMA).....	130
Figure 70 – Structure numérotée du féruléol 36 et spectre de RMN ¹ H du composé F1-C (500 MHz, CD ₃ OD, 16 scans).....	132
Figure 71 – Structure numérotée du féruléol 36 et spectre de RMN ¹³ C du composé F1-C (500 MHz, CD ₃ OD, 4096 scans).....	133
Figure 72 – Structure numérotée du féruléol 36 et spectre de RMN HSQC du composé F1-C (500 MHz, CD ₃ OD).....	134
Figure 73 – Hypothèse de structures et corrélations observées pour la partie sesquiterpéniques du composé F1-C en : A. COSY pour les protons éthyléniques ; B. HMBC pour les carbones « quaternaires »	134
Figure 74 – Corrélations observées en HSQC pour les carbones et protons aromatiques du noyau 4-hydroxycoumarine du composé F1-C	135
Figure 75 – Hypothèse de structure du noyau 4-hydroxycoumarine du composé F1-C et corrélations observées en COSY pour les protons aromatiques	136
Figure 76 – Hypothèse de structure du noyau 4-hydroxycoumarine du composé F1-C et corrélations observées en HMBC pour les carbones aromatiques quaternaires C-9 et C-10	137
Figure 77 – Hypothèse de structure du composé F1-C et corrélations observées en HMBC pour les carbones C-4 , C-3 et C-2 du cycle lactone dans le noyau 4-hydroxycoumarine	138
Figure 78 – Hypothèse de structure du composé F2-A : l'ω-hydroxyféruléol 43	141
Figure 79 – Hypothèse de structure de la partie correspondant au féruléol dans le composé F2-E	144
Figure 80 – Hypothèse de structure du substitut en bout de chaîne sesquiterpénique du composé F2-E : l'ester d'acide o-coumarique.....	145
Figure 81 – Spectre de RMN ¹ H et hypothèse de structure numérotée du composé F2-E (500 MHz, CD ₃ OD, 16 scans).....	145
Figure 82 – Hypothèse de structure numérotée du et spectre de RMN ¹³ C du composé F2-E (500 MHz, CD ₃ OD, 4096 scans).....	146
Figure 83 – Hypothèse de structure de l'ester d'acide o-coumarique du composé F2-E et corrélations observées en COSY pour les protons aromatiques en rose et violet et le proton éthylénique en vert	147

Figure 84 – Hypothèse de structure de l'ester d'acide o-coumarique du composé F2-E et corrélations observées en HMBC pour les protons aromatiques C-4'' et C-5''	148
Figure 85 – Hypothèse de structure du composé F2-E, dérivé du féruléol, et corrélations observées en HMBC pour le carbone C-1'' de l'ester reliant l'acide o-coumarique au féruléol.....	149
Figure 86 – Coumarines sesquiterpéniques antibactériennes de <i>F. communis</i> : féruléol 36 , ω -hydroxyféruléol 43 et ω -acétoxyféruléol 44 ^{233,234}	152
Figure 87 – Principales familles phytochimiques responsable de la toxicité de <i>F. communis</i> ⁵⁶ : A. les 4-hydrocoumarines avec l'exemple du féruléol 36 ; B. les pyrano-[3,2-C]-coumarines avec l'exemple de la ferprénine 45	153
Figure 88 – Principales familles d'esters de daucanes présentes dans le chémotype non-toxique de <i>F. communis</i> ⁵⁶ , dérivées: A. du jaeschkeanadiol 46 ; B. du siol 47	153
Figure 89 – Sesquiterpénoïdes antibactériens de <i>F. communis</i> ²³³ : A. le 14-(o-hydroxycinnamoyloxy)-dauc-4,8-diène 48 , un ester de daucane ; B. le ferchromone 49 , une chromane sesquiterpénique.....	154
Figure 90 – Dépôts des masses minimales S des différentes préparations et de la gentamycine 10 μ g (centre) sur <i>P. aeruginosa</i> : A. avant incubation ; B. après incubation	160
Figure 91 – Zone d'inhibition des dépôts L des remèdes R₁ et R₂ après diffusion sur géloses et 24h d'incubation : A. <i>S. aureus</i> ; B. <i>S. epidermidis</i> ; C. <i>C. striatum</i> ; D. <i>E. coli</i> ; E. <i>P. aeruginosa</i>	161
Figure 92 – Zones d'inhibition des dépôts L des remèdes R₁, R₂, du mélange RDV et de l'acétate de cuivre Cu(OAc)₂ après diffusion sur géloses et 24h d'incubation : A. <i>S. aureus</i> ; B. <i>E. coli</i>	163
Figure 93 – Activités antibactériennes des extraits RDV et des extraits AMM01 exprimées en moyenne de n° de puits correspondant à la CMI, la variabilité étant représentée par une bulle ayant pour diamètre 0,1 + l'écart-type standard	167
Figure 94 – Courbes de croissance de <i>S. aureus</i> en présence de milieu MHII (boîtes à moustaches), en présence de l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH à 7,812 μ g/mL en présence d'acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ à 1,25 mM et en présence de l'association des deux.....	171
Figure 95 – Solutions après agitation à 37°C pendant 18h : A. Solutions témoins de l'extrait hydroalcoolique des 4 drogues végétales RDV-EH et de l'acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ ; B. Changement d'aspect après incubation pour des mélanges RDV-EH/Cu(OAc) ₂ (expérience antérieure, le changement d'aspect y étant plus net) ; C. Mélanges RDV-EH/Cu(OAc) ₂ 4/0,1 (m/m) et 4/1 (m/m), avant et après centrifugation.....	177
Figure 96 – Zones d'inhibition des dépôts (25 μ L) des solutions témoins de l'extrait hydroalcoolique des 4 drogues végétales RDV-EH (40 mg/mL) et de l'acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ (55 mM) sur les souches <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i> (n=1)	178
Figure 97 – Zones d'inhibition des dépôts (25 μ L) des mélanges RDV-EH/Cu(OAc) ₂ 4/1 (m/m) (Mix) et des particules isolées de ces mélanges par centrifugation et concentrées 10 fois (Prcpt) sur les souches <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i>	179

Figure 98 – A. Solutions aqueuses à 100 mg/mL des extraits hydroalcooliques des drogues végétales et d'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, après prétraitement (37°C, agitation rotative, 4 h) ; B. Mélanges des extraits avec de sel $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ après incubation (37°C, agitation rotative, 18 h) et les précipités obtenus après centrifugation des mélanges.....	186
Figure 99 – Organisation des ADN ribosomiaux eucaryotes nucléaires : les gènes codant l'ARN ribosomal sont organisés en tandem, chaque cluster contenant le gène codant l'ARN 18S de la petite sous-unité du ribosome, l'Internal Transcribed Spacer ITS1, le gène codant l'ARN 5,8S de la grande sous-unité du ribosome, l'Internal Transcribed Spacer ITS2 et le gène codant l'ARN 26 ou 28S de la grande sous-unité du ribosome	210
Figure 100 – Exemple d'organisation d'une plaque 96 puits pour la détermination des CMI d'un extrait	220
Figure 101 – Schéma de l'échiquier entre une substance A et une substance B (entouré en violet)	231
Figure 102 – Schéma de la lecture d'un échiquier, inspiré par les figures de l'étude de Bonapace et al, 2002 ²⁵²	232
Figure 103 – Schéma de l'échiquier entre l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ et l'extrait hydroalcoolique du mélanges des 4 drogues végétales RDV-EH lu à 600 nm sur 24h	233

Table des tableaux

Tableau 1 – Composition des deux remèdes retenus pour l'étude, issus de l'aqrābādhīn d'Al-Kindī ⁷ ...	4
Tableau 2 – Rappel des ingrédients et de leur teneur respective (exprimée en parts) dans les deux remèdes d'Al-Kindī sélectionnés, R1 et R2	35
Tableau 3 – Résumé des drogues végétales utilisées dans les deux remèdes d'Al-Kindī étudiés	59
Tableau 4 – <i>Drogues végétales utilisées dans l'étude</i>	60
Tableau 5 – Drogues végétales de référence utilisées dans l'étude	61
Tableau 6 – Extraits des drogues végétales : masses (m) et rendements (R) (- : rendements trop faibles)	62
Tableau 7 – Extraits du mélange des 4 drogues végétales des remèdes RDV : masses (m) et rendements (R)	63
Tableau 8 – Données HPLC-HRMS/MS des pics majoritaires de l'extrait hydroalcoolique du suc d'A. ferox commercial ALOF-EH (méthode DOREMA)	67
Tableau 9 – Ions protonés et déprotonés des pics majoritaires en HPLC-HRMS/ ESI+ de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe de C. abyssinica de référence (droguier UMR7200) COMA2-A (méthode DOREMA)	71
Tableau 10 – Ions protonés des pics majoritaires en HPLC-HRMS/ ESI+ de l'extrait acétate d'éthyle de la myrrhe provenant d'un tradithérapeute marocain MYRR1-A (méthode DOREMA)	75
Tableau 11 – Ions protonés des pics majoritaires en HPLC-HRMS/ ESI+ de l'extrait acétate d'éthyle (A) de la myrrhe provenant d'un tradithérapeute marocain MYRR2 , représentatif des 3 extraits (méthode DOREMA)	76
Tableau 12 – Ions protonés et déprotonés des pics majoritaires en HPLC-HRMS/ ESI+ et HPLC-HRMS/ ESI- de l'extrait acétate d'éthyle de la gomme ammoniacque AMMO1 (méthode DOREMA)	84
Tableau 13 – Résumé de l'identification, l'approvisionnement et les contrôles d'identité des drogues utilisées dans les deux remèdes d'Al-Kindī étudiés	89
Tableau 14 – Cytotoxicité des extraits à l'acétate d'éthyle (A) des drogues végétales et de l'acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ sur les macrophages RAW264.7 et les fibroblastes 3T3, exprimée en CI ₅₀ (µg/mL et mM)	95
Tableau 15 – Criblage antibactérien des extraits des différentes drogues végétales par diffusion sur gel d'agar (n = 1,) exprimé en dépôts à partir duquel on observe une zone d'inhibition	98
Tableau 16 – Activité antibactérienne des témoins positifs : l'érythromycine (n = 3) et l'extrait méthanolique de cônes de houblon H. lupulus HUML-MeOH (n = 2), exprimée en moyenne des CMI +/- l'écart-type (µg/mL)	102
Tableau 17 – Activité antibactérienne de l'acétate de cuivre par microdilution en bouillon	103
Tableau 18 – Activité antibactérienne des extraits des différentes drogues végétales, exprimée en moyenne des CMI +/- l'écart-type (µg/mL)	104

Tableau 19 - Indices de sélectivité IC ₅₀ /CMI de l'acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ , de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la gomme ammoniacque traditionnelle (AMMO1-A) et de l'extrait à l'acétate d'éthyle du mélange des 4 drogues végétales (RDV-A), calculés à partir de la toxicité sur les macrophages murins RAW 264.7 (n = 3) et sur les fibroblastes murins 3T3 (n = 2).....	105
Tableau 20 - Activité antibactérienne des fractions obtenues par partition liquide/liquide de l'extrait hydroalcoolique de gomme ammoniacque traditionnelle AMMO1-EH , exprimée en moyenne des CMI (µg/mL) +/- l'écart-type (n = 3)	123
Tableau 21 - Activité antibactérienne des fractions obtenues par LC-Flash (FLASH_AMMO-12G) de l'extrait hydroalcoolique de gomme ammoniacque traditionnelle AMMO1-EH , exprimée en moyenne des CMI (µg/mL) +/- l'écart-type (n = 2).....	125
Tableau 22 - Comparaison des déplacements chimiques RMN ¹ H et ¹³ C entre les travaux de Lamnaouer (1987) ²¹⁴ sur le féruléol 36 (62,5 MHz, CDCl ₃) et nos données expérimentales (500 MHz, CD ₃ OD)	139
Tableau 23 - Comparaison des déplacements chimiques RMN ¹ H et ¹³ C entre nos données expérimentales pour le féruléol (F1-C) et l'ω-hydroxyféruléol (F2-A) (500 MHz, CD ₃ OD), les différences indiquées en rouge et violet, et les travaux de Lamnaouer (1987) ²¹⁴ sur l'ω-hydroxyféruléol 43 (62,5 MHz, CDCl ₃)	141
Tableau 24 - Comparaison des déplacements chimiques RMN ¹ H et ¹³ C entre les données expérimentales de l'ω-hydroxyféruléol (F2-A) et du dérivé du féruléol (F2-E) (500 MHz, CD ₃ OD), les différences sont indiquées en rouge.....	144
Tableau 25 - Comparaison des déplacements chimiques RMN ¹ H et ¹³ C entre les travaux de Pham et al ²³² en 2018 sur l'acide o-coumarique (125 MHz, CD ₃ OD) et les données expérimentales de l'ester d'acide o-coumarique du composé F2-E (500 MHz, CD ₃ OD), les différences sont indiquées en rouge	149
Tableau 26 - Activité antibactérienne du composé F2-E (n = 3), exprimée en moyenne des CMI +/- l'écart-type (µg/mL et µM) et comparée à celle de l'érythromycine (témoin positif, n = 3)	150
Tableau 27 - Diamètres des zones d'inhibition observées pour les différentes préparations : remèdes R₁ et R₂ ; remèdes sans acétate de cuivre RDV ni gomme ammoniacque 3DV ; acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ , exprimés en moyenne en mm +/- écart-type standard (n = 3).....	161
Tableau 28 - FICI moyen des échiquiers entre les extraits hydroalcooliques (EH) des drogues végétales (n = 3).	168
Tableau 29 - Schéma de l'échiquier entre l'extrait hydroalcoolique du mélange des 4 drogues végétales RDV-EH et l'acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ après 24h, avec les indices FIC calculés indiqués dans les premiers puits sans croissance bactérienne.....	172
Tableau 30 - FICI moyen entre l'acétate de cuivre Cu(OAc) ₂ et les extraits hydroalcooliques (EH) des drogues végétales (n = 1 à 3)	172

Tableau 31 - Absorbance à 492 nm après marquage au cristal violet des biofilms de S. aureus (n = 3) et E. coli (n = 3) incubés 30 h avec une gamme de concentrations de l'extrait RDV-EH	181
Tableau 32 - Absorbance à 492 nm après marquage au cristal violet des biofilms de S. aureus (n = 1) et E. coli (n = 1) incubés 30 h dont 6h avec une gamme de concentrations de l'extrait RDV-EH	181
Tableau 33 - Absorbance à 492 nm après marquage au cristal violet des biofilms de S. aureus (n = 3) et E. coli (n = 3) incubés 30 h avec une gamme de concentrations de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$	181
Tableau 34 - Photographies au microscope confocal de biofilms de S. aureus (n = 3) et P. aeruginosa (n = 3) incubés 30 h avec une gamme de concentrations de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (marquage SYTO™)	182
Tableau 35 - Absorbance à 492 nm après marquage au cristal violet des biofilms de S. aureus (n = 3) et E. coli (n = 3) incubés 30 h dont 6h avec une gamme de concentrations de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$	182
Tableau 36 - Photographies au microscope confocal de biofilms de S. aureus (n = 2) et P. aeruginosa (n = 2) incubés 30 h dont 6h avec une gamme de concentrations de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (marquage colorant SYTO™)	182
Tableau 37 - Photographies au microscope confocal de biofilms de S. aureus (n = 3) incubés 30 h avec une gamme de concentrations des particules formées dans les mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 4/1 (m/m) dans l'eau (n = 2) ou l'éthanol à 30% (n = 2) (marquage SYTO™).....	184
Tableau 38 - Photographies au microscope confocal de biofilms de P. aeruginosa (n = 2) incubés 30 h avec une gamme de concentrations des particules formées dans les mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 4/1 (m/m) dans l'eau (n = 2) ou l'éthanol à 30% (n = 2) (marquage SYTO™).....	184
Tableau 39 - Photographies au microscope confocal de biofilms de S. aureus (n = 3) et P. aeruginosa (n = 3) incubés 30 h dont 6 h avec une gamme de concentrations de particules formées dans le mélange RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ 4/1 (m/m) aqueux (marquage colorant SYTO™).....	184
Tableau 40 - Concentration de la fraction aqueuse de l'extrait hydroalcoolique des différentes drogues végétales (exprimée en équivalent de concentration de l'extrait même) et de l'acétate de cuivre $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ dans les mélanges et masse de précipités récupérés après incubation (37°C, agitation rotative, 18h), centrifugation et lyophilisation	186
Tableau 41 - Dosage du cuivre dans les particules obtenues à partir des différents mélanges RDV-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ et ALOF-EH/ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$	188
Tableau 42 - Caractéristiques techniques des analyses HPLC-DAD et HPLC-HRMS.....	202
Tableau 43 - Paramètres utilisés pour les analyses en spectrométrie de masse	203
Tableau 44 - Méthodes HPLC utilisées pour chaque extrait	208
Tableau 45 - Facteurs de corrélations DO/densité bactérienne pour chacune des souches testées et $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ correspondantes aux densités bactériennes préconisée pour les différents tests utilisés. .	218
Tableau 46 - Gammes de concentrations utilisées en fonction des éléments testés	220
Tableau 47 - Méthode LC-Flash « FLASH_AMMO_12G »	224
Tableau 48 - Méthode LC-Flash « FLASH_AMMO_F1 »	224
Tableau 49 - Méthode HPLC semi-préparative « PLC_AMMO_F1 »	225

Tableau 50 – Méthode HPLC semi-préparative « PLC_AMMO_F2 »	225
Tableau 51 – Formulation en laboratoire des remèdes et préparations intermédiaires	229
Tableau 52 – Masses (mg) des différents ingrédients dans les dépôts de masse minimale S, avec en gras les seuls drogues dont la masse déposée varie	230
Tableau 53 – Gammes de concentrations utilisées sur les biofilms révélés au SYTO [™] et observés au microscope confocal.....	236
Tableau 54 – Gammes de concentrations utilisées sur les biofilms révélés au cristal violet	236

Index des codes utilisés pour les différentes drogues et préparations

- **Types d'extraits pour une drogue XXXX :**

XXXX-**EH** : extrait à l'éthanol 70% EtOH70%

XXXX-**A** : extrait à l'acétate d'éthyle EtOAc

XXXX-**D** : extrait au dichlorométhane DCM

XXXX-**MeOH** : extrait au méthanol MeOH

- **Drogues :**

ALOF : suc commercial d'*A. ferox* (Cailleau Herboristerie)

AMM01 : gomme ammoniacale traditionnelle (Rabat, Maroc)

AMM03 : gomme ammoniacale traditionnelle de référence (droguier de l'Université de Tours)

COMA1 : myrrhe commerciale de *C. abyssinica* (Cailleau Herboristerie)

COMA2 : myrrhe de *C. abyssinica* de référence (droguier de l'UMR7200)

HUML : houblon de *H. lupulus* récolté (Illkirch, France)

MYRR1 : myrrhe traditionnelle (Rabat, Maroc)

MYRR2 : myrrhe traditionnelle de référence (droguier de l'Université de Tours)

SARC : gomme sarcocolle traditionnelle (Pakistan)

- **Préparations :**

R1 : remède 1, mélange des 4 drogues végétales (ALOF, MYRR1, SARC, AMM01) et de l'acétate de cuivre dans les proportions 1/1/1/1/1 m/m/m/m/m

Médicament pour les abcès pour lequel le bistouri n'est pas préconisé : « *Tout est broyé, mélangé et saupoudré sur la plaie. On met un linge dessus, si Dieu veut.* »

R2 : remède 2, mélange des 4 drogues végétales (ALOF, COMA1, SARC, AMM01) et de l'acétate de cuivre dans les proportions 1/1/1/1/0,1 m/m/m/m/m

Médicament de Abū Mihjan contre les abcès et les mauvais furoncles : « *Chaque ingrédient est broyé et tamisé. On humidifie l'abcès avec. On humidifie un tissu fin en lin avec de l'eau et on saupoudre le médicament dessus et on applique sur la blessure. Cet emplâtre ne s'enlèvera pas (tout seul) tant que (l'abcès ou le furoncle) ce n'est pas guéri, avec l'aide de Dieu.* »

3DV : mélange des 3 drogues végétales sans la gomme ammoniacale (ALOF, MYRR1, SARC)

RDV : mélange des 4 drogues végétales (ALOF, MYRR1, SARC, AMM01) dans les proportions 1/1/1/1 m/m/m/m (pour les extraits RDV, réalisés avant le nouvel approvisionnement en myrrhe, COMA1 a été utilisé au lieu de MYRR1)

Rappel : Pour plus de clarté dans la lecture, les conclusions et éléments les plus importants sont mis en orange tandis que les conclusions intermédiaires et certaines notions clefs sont en bleu dans le manuscrit.

INDEX

Veillez ouvrir la double page pour garder l'index sous les yeux durant votre lecture

Identification de nouvelles associations antibactériennes issues de la Pharmacopée Médiévale Arabe

Résumé

L'étude porte sur deux remèdes issus de la pharmacopée d'Al-Kindī, tout deux prescrits contre des infections cutanées et associant 5 drogues : 4 exsudats végétaux à de l'acétate de cuivre. L'évaluation *in vitro* des drogues isolées a permis d'établir la forte activité antibactérienne d'extraits à l'éthanol 70%, à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane de gomme ammoniacque traditionnelle sur des bactéries Gram+ (CMI de 3,91 µg/mL sur *S. aureus*) ; l'activité antibactérienne de l'acétate de cuivre sur des bactéries Gram- ; l'activité anti-inflammatoire des extraits à l'acétate d'éthyle de latex d'*A. ferox*, de myrrhe traditionnelle et de gomme sarcocolle traditionnelle.

L'activité antibactérienne de la gomme ammoniacque traditionnelle a été imputée à la présence de coumarines sesquiterpéniques. Trois de ces composés ont été isolés : le férulénol, l' ω -hydroxyférulénol et un composé nouvellement décrit, le coumaryl 12-férulénol (CMI 2,47 µM sur *S. aureus*).

Les drogues ont également été testées combinées pour leur activité antibactérienne. La reproduction de l'un des remède a permis d'obtenir des zones d'inhibition par diffusion sur gélose sur des souches Gram+ comme Gram-, confirmant la complémentarité de spectre antibactérien entre l'acétate de cuivre et les drogues végétales. Sur la base d'un protocole de synthèse verte de nanoparticules de cuivre, des particules ont été obtenues à partir du sel de cuivre et des extraits du mélange des 4 drogues végétales. Si leur caractérisation est encore en cours, leur activité antibactérienne et antibiofilm contre des souches Gram+ et Gram- a déjà été établie.

Mots-clefs : ethnopharmacologie – remède – antibactérien – *Staphylococcus aureus* – *Ferula* – coumarine sesquiterpénique – association plante métal

Identification of new antibacterial combinations from Arab Medieval Pharmacopoeia

Abstract

This study focuses on two remedies from Al-Kindī pharmacopoeia, both prescribed against skin infections and combining 5 drugs: 4 plant exudates with copper acetate. The *in vitro* evaluation of the drugs alone established a strong antibacterial activity of extracts of traditional ammoniacum (ethanol 70%, ethyl acetate and dichloromethane extracts) on Gram+ bacteria (CMI of 3.91 µg/mL on *S. aureus*); antibacterial activity of copper acetate on Gram- bacteria; anti-inflammatory activity of *A. ferox* latex, traditional myrrh and traditional sarcocolla gum ethyl acetate extracts.

The antibacterial activity of traditional ammoniacum was attributed to the presence of sesquiterpene coumarins. Three of these compounds were isolated: ferulenol, ω -hydroxyferulenol and a new compound of this family (to our knowledge), coumaryl 12-ferulenol (MIC 2.47 µM on *S. aureus*).

The drugs were also tested in combination for antibacterial activity. The reproduction of one of the remedies made inhibition zones on Gram+ and Gram- strains by diffusion on agar, confirming the complementarity of the antibacterial spectrum between copper acetate and botanical drugs. Based on a protocol for the green synthesis of copper nanoparticles, particles were obtained from the copper salt and mixture of the 4 herbal drugs extracts. While their characterization is still in progress, their antibacterial and antibiofilm activity on Gram+ and Gram- stains has already been established.

Keywords: ethnopharmacology – remedy – antibacterial – *Staphylococcus aureus* – *Ferula* – sesquiterpene coumarins – plant metal combination