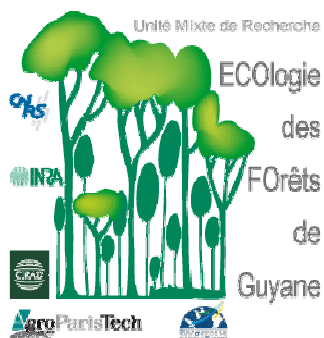

Recherche de nouvelles molécules antifongiques et mise en évidence de synergie dans l'activité antifongique

Charlie BASSET

Maitre de stage :

Didier STIEN

CNRS – UMR ECOFOG



Stage effectué du

15/01 au 20/06 2008

A l'UMR ECOFOG

Laboratoire des Matériaux et

Molécules en Milieu Amazonien (L3MA)

BP792 - 97337 Cayenne cedex

REMERCIEMENTS

Ce mémoire de Master 2 présente les travaux qui ont été effectués au Laboratoire des Matériaux et Molécules en Milieu Amazonien de Cayenne, faisant partie de l'unité mixte de recherche ECOFOG basée à Kourou.

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements aux personnes qui ont rendu ce stage possible et qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires, à commencer par Bernard Thibaut, directeur de l'UMR, et Christophe Roos, directeur du L3MA, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité de recherche.

Je remercie également chaleureusement Alice Maria de Souza Rodrigues, ma collègue doctorante dans le cadre du projet Fongicides, ainsi que Didier Stien pour leur sympathie, leur disponibilité et leurs conseils. Mes remerciements vont également à Armand Lecante, Marianna Royer, Raphaëlle Rinaldo, Molly Zang, Alice Lambouille, Emeline Houël, Julie-Anne Miller... enfin tous ceux du L3MA qui ont rendu ce stage plus qu'agréable et épanouissant.

Au campus agronomique de Kourou, je remercie Eliane Louisanna pour son accueil et ses conseils pertinents ; à l'exploitation KLR, Lucien Raguin et ses courageux bucherons. Sans oublier Lionel Chevolot de l'IRD de Cayenne, pour nous avoir prêté son broyeur, Julien Angel et César Delnate à l'herbier de Guyane pour leurs tuyaux en botanique.

Enfin, je remercie de tout cœur mes colocataires et Cie pour avoir rendu ce séjour et ces aventures en Guyane inoubliables, ainsi que mes parents et amis de métropole pour leur soutien constant malgré la distance.

**“Dans les sciences, le chemin est plus important que le but.
Les sciences n'ont pas de fin.”
Erwin Chargaff**

PRESENTATION DE L'UMR

L'UMR ECOFOG regroupe des moyens de l'ENGREF, école interne d'Agroparistech, de l'INRA et du CIRAD, du CNRS et de l'Université des Antilles et de la Guyane sur trois sites : le campus agronomique de Kourou, le laboratoire du Centre technique du Bois Guyanais de Pariacabo à Kourou, le Pôle Universitaire Guyanais à Cayenne avec le Laboratoire des Matériaux et Molécules en Milieu Amazonien (L3MA), où ce stage s'est essentiellement déroulé.

L'UMR travaille en collaboration étroite et structurée avec tous les autres organismes de recherche ou de développement présents en Guyane et concernés par la forêt et l'environnement grâce au GIS SILVOLAB créé en 1992, qui regroupe 9 instituts.

Les trois thématiques de recherche de L'UMR ECOFOG sont les suivantes :

- Structure, dynamique et fonctionnement de l'écosystème forestier guyanais
- Ecologie et diversité génétiques d'espèces particulières
- Molécules et Matériaux en Milieu Amazonien (L3MA)

La thématique fondamentale du L3MA, est centrée sur l'environnement amazonien dans lequel il est immergé. L'objectif est de mettre en place des recherches sur :

- Durée de vie des matériaux en ambiance amazonienne : corrosion atmosphérique des aciers et des alliages d'aluminium, dégradation et rupture des polymères - dégradation des bois au contact du sol
- Métabolites secondaires issus des forêts amazoniennes : extraction et caractérisation des molécules naturelles de bois, propriétés biologiques (antifongiques et anti-termite) des substances naturelles
- Diversité et valorisation des bois guyanais : contraintes internes, contraintes de croissance dans les arbres de la forêt, relations entre microstructure et propriétés des bois.

Les recherches développées au sein de ce laboratoire correspondent à des préoccupations régionales mais ont, de par leur originalité, un rayonnement international. Elles sont supportées par les collectivités et font l'objet de coopérations industrielles.

SOMMAIRE

Rapport bibliographique :

Evaluation de la capacité antioxydante de molécules et d'extraits d'origine naturelle

I.	Introduction	4
II.	Définition de l'activité antioxydante	4
III.	Méthodes chimiques d'évaluation de l'activité antioxydante	5
1.	Généralités	5
2.	Analyses basées sur le transfert d'un atome d'hydrogène	6
3.	Analyses basées sur le transfert d'un électron	9
4.	Analyses basées sur les deux mécanismes	11
IV.	Conclusions	13
	Références	14

Rapport de stage :

Recherche de nouvelles molécules antifongiques et mise en évidence de synergie dans l'activité antifongique

I.	Introduction	15
II.	Projet fongicides	16
1.	Contexte	16
2.	Résultats préliminaires	16
III.	Fonction défensive des extractibles	17
IV.	Le genre <i>Qualea</i> et l'espèce <i>Qualea rosea</i>	18
V.	Partie expérimentale	20
1.	Récolte du matériel végétal	20
2.	Extraction	20
3.	Profils chromatographiques	20
4.	Fractionnement bioguidé	21
5.	Mesure de l'activité antioxydante	22
6.	Tests biologiques	25
VI.	Résultats et discussions	27
	Références	31
	Annexes I	32

RAPPORT BIBLIOGRAPHIQUE

« Evaluation de la capacité antioxydante de molécules et d'extraits d'origine naturelle. »

I. Introduction

Il a été démontré que l'activité antifongique des extractibles des bois durables résultait de la synergie de molécules à propriétés biocides d'une part et antioxydantes ^[1] d'autre part. En outre, il est largement admis que la consommation d'aliments contenant des composés à propriétés antioxydantes prévient du stress oxydatif responsable de maladies coronariennes et de certains cancers (plusieurs centaines de publications à ce jour, une vingtaine de projets financés par l'UE ^[2]). Egalement, des antioxydants synthétiques sont utilisés en industrie agro-alimentaire et cosmétique pour prévenir le rancissement des corps gras, leur utilisation étant controversée pour leur potentiel cancérigène ^[3].

De ce fait, de nombreuses méthodes ont été mises au point afin de quantifier l'activité antioxydante (AAO) de molécules, de produits alimentaires et de produits d'origine naturelle.

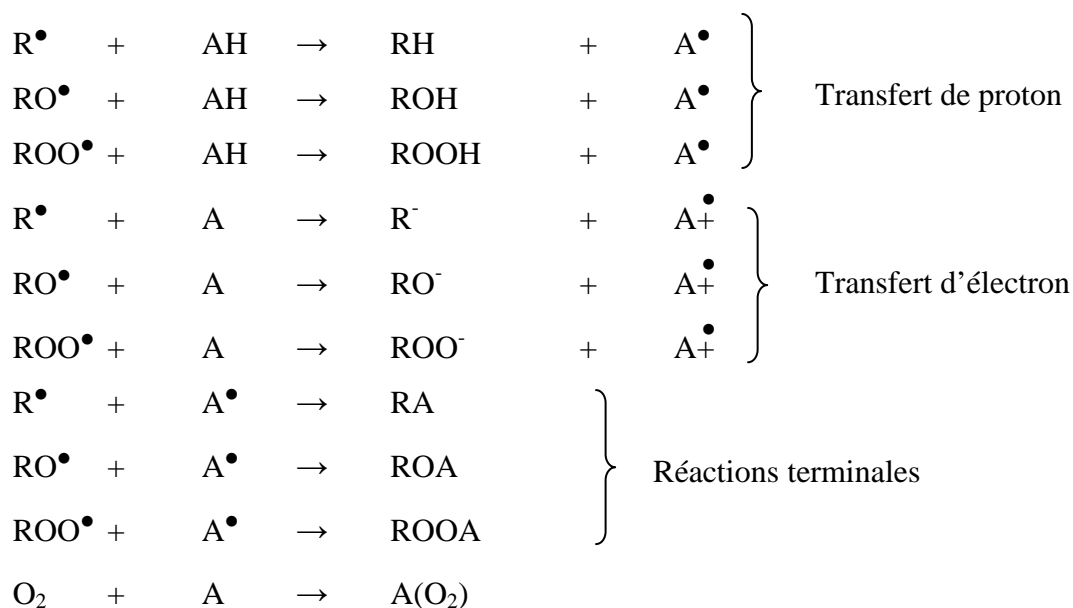
Dans le cas qui nous intéresse, à savoir l'évaluation de la capacité antioxydante d'extract de bois durables de Guyane, il sera intéressant d'étudier ces méthodes, ceci afin de sélectionner les plus pertinentes, pour une utilisation au laboratoire L3MA.

Nous rappellerons dans un premier temps les mécanismes généraux de l'activité antioxydante. Puis nous décrirons les méthodes couramment utilisées, en industrie agro-alimentaire et en laboratoire. Enfin nous discuterons du choix des méthodes présentées, en particulier pour une utilisation par le laboratoire L3MA.

II. Définition de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est considérée comme la capacité à piéger les radicaux libres, par l'apport d'un atome hydrogène ou d'un électron et la stabilisation des espèces formées. Une molécule antioxydante est une espèce chimique réductrice à bas potentiel d'oxydation, comportant des éléments tels que des hydrogènes phénoliques, des cycles aromatiques et des liaisons multiples.

Réactions ^[4] des antioxydants (A) :



Ainsi, les flavonoïdes sont considérés comme de très bons candidats pour leur activité antioxydante et sont majoritairement responsables de cette activité dans les produits naturels d'origine végétale.

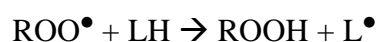
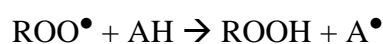
III. Méthodes chimiques d'évaluation de l'activité antioxydante

1. Généralités

La majorité des méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante peut être divisée en deux catégories ^[5] suivant les réactions mises en jeu:

- Basées sur le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT)

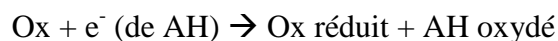
Mesure cinétique dans lequel l'antioxydant (A) et le substrat (L) sont en compétition pour les radicaux peroxydes ROO^\bullet engendrés indirectement par la décomposition de composés azo :



Par exemple : ORAC, TRAP

- Basées sur le transfert d'un électron (SET)

Mesure de la capacité d'un antioxydant (AH) à réduire un oxydant (Ox), qui change de couleur quand il est réduit :



Par exemple: FRAP, FCR

Il n'existe pas de test *in vitro* de référence pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon, sachant que cet échantillon peut présenter divers mécanismes d'action. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires pour avoir une indication de la capacité antioxydante de l'échantillon. De plus, l'activité antioxydante d'un composé chimique est sans signification si l'on ne précise pas les conditions réactionnelles telles que la pression, la température, le milieu réactionnel, les co-réactifs et les composés de référence (le Trolox en particulier, l'analogue hydrosoluble de l' α -tocophérol, cf. Fig. I).

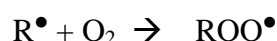
2. Analyses basées sur le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT)

Diverses analyses colorimétriques et fluorimétriques ont été développées ; où l'on utilise un générateur de radicaux pour engendrer un flux supposé constant de radicaux peroxydes dans une solution saturée en air. L'antioxydant ajouté rentre alors en compétition avec la sonde, inhibant ou retardant l'oxydation de celle-ci.

Ces analyses utilisent les réactifs suivants : un initiateur de radicaux, une sonde moléculaire (détectable en UV ou en fluorescence) pour le suivi de la réaction, un antioxydant ; cela permet de mesurer des paramètres cinétiques pour la quantification de l'activité antioxydante.

2.1 Considérations cinétiques^[5]

Généralement, une sonde (notée PH) est en compétition avec un antioxydant (AH) pour piéger un flux supposé constant de radicaux peroxydes (ROO^\bullet) provenant de la décomposition thermique d'un composé diazo (R_2N_2), selon le mécanisme suivant :



Et les réactions élémentaires sont, en considérant qu'elles soient dans un état stable :





Alors, la vitesse de la réaction d'oxydation V de la sonde peut être exprimée par l'équation :

$$V = -\frac{d[PH]}{dt} = \frac{k_1 R_i [PH]}{2k_1 [PH] + 2k_3 [AH]} \quad (i)$$

Avec k_1 , k_3 les constantes de vitesse des réactions (1) et (3) et R_i la vitesse de formation des radicaux peroxydes.

Lorsqu'il n'y a pas d'antioxydant ($[AH] = 0$), la vitesse de la réaction est $V_0 = 0.5R_i$. Ainsi

$$\frac{V_0}{V} = 1 + \frac{k_3 [AH]}{k_1 [PH]} \quad (ii)$$

Cette équation implique trois scénarii au cours de la réaction :

(a) Au début de la réaction, si $100k_1 [PH] < k_3 [AH]$, alors $V_0/V > 100$. Ceci signifie soit que AH est un antioxydant ($k_3 \gg k_1$), ou bien AH est un retardant introduit en large excès ($k_3 \approx k_1$). Il n'y a pas de modification significative de la colorimétrie, c'est la phase de latence (*lag phase*).

(b) Au cours de la réaction, l'antioxydant est consommé par les radicaux peroxydes, de même que la sonde est également oxydée, mais à une vitesse plus faible que V_0 ($[AH] \neq 0$). On observe une modification de la colorimétrie.

(c) Lorsque tout l'antioxydant est consommé, la vitesse de réaction retourne à la valeur V_0 .

L'apparition et la durée de ces phases dépendent de la nature de l'antioxydant et sa concentration, ainsi que de la réactivité de la sonde vis-à-vis des radicaux.

Les courbes cinétiques des analyses ORAC et TRAP suivent ce modèle cinétique d'une manière satisfaisante pour une interprétation des résultats, bien que l'exploitation des mesures diverge selon la méthode, que l'on explicitera ci-après.

2.2 Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC)

Cette méthode a été développée par Cao et al, qui utilisaient le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH, cf. fig. II) ^[6] comme générateur de radicaux et la B-phycoérythrine (B-PE), protéine isolée de *Porphyridium cruentum*, comme sonde moléculaire, en opérant à 37°C. Mais l'utilisation de la B-PE comme sonde présente des

limites du fait de sa réactivité variable suivant le radical peroxy ^[7] et de sa photolabilité. Plus récemment, Ou et al. ont rapporté l'utilisation de la fluorescéine ^[8] (FL, cf. fig III) comme sonde fluorescente.

D'une manière générale, on prépare diverses solutions aqueuses tamponnées à pH 7.4, contenant soit l'échantillon soit le standard à différentes concentrations (du Trolox le plus souvent, permettant la réalisation d'une courbe de calibration) et la fluorescéine, puis on ajoute la solution d'AAPH pour initier la réaction. La mesure d'intensité de la fluorescence (longueur d'onde d'excitation : 493 nm, filtre d'émission : 515 nm) est effectuée toutes les minutes pendant 30 mn. Au cours de la réaction, la fluorescéine est consommée et l'intensité de sa fluorescence décroît ; en présence d'antioxydant, cette décroissance est inhibée. Une courbe cinétique d'une analyse ORAC classique est montrée en figure IV.

L'interprétation des données de l'analyse ORAC est obtenue par :

- le calcul de l'aire sous la courbe cinétique (Area Under the Curve : AUC) et l'aire réduite (net AUC : $AUC_{\text{éch}} - AUC_{\text{blanc}}$)
- l'obtention d'une courbe de calibration $AUC = f([Trolox])$
- le calcul de l'activité antioxydante de l'échantillon, en équivalent Trolox, suivant la courbe de calibration.

Notons qu'il existe dans certains cas une dispersion des valeurs obtenues, due aux interférences de la matrice, principalement lorsque la mesure nécessite une faible ou une forte concentration de l'échantillon.

L'intérêt de l'approche AUC est qu'elle ne prend pas en compte la phase de latence, qui peut varier suivant les échantillons. Ceci est particulièrement intéressant pour les échantillons alimentaires, riches en composés et ayant des cinétiques complexes, comme les extraits de fruits ou de légumes.

L'inconvénient majeur est le caractère peu liposoluble de la fluorescéine, impliquant une intensité de fluorescence faible dans les solvants organiques, rendant alors l'analyse de composés liposolubles délicate, voir irréalisable.

2.3 Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter Assay (TRAP)

L'analyse TRAP proposée en 1985 par Wayner et al. ^[9] a été la méthode la plus utilisée pour la mesure de la capacité antioxydante du plasma sanguin. Dans cette méthode, la mesure de l'activité antioxydante ne se faisait pas en sonde moléculaire, mais par mesure de la

consommation de l'oxygène dissout. DeLange et al. ^[10] proposent plus tard l'utilisation d'une sonde externe, la R-phycoérythrine (R-PE), une protéine extraite de *Corallina officinalis*, afin de suivre la réaction d'oxydation par fluorescence.

Plus récemment, Ghiselli et al. ^[11] proposent une méthode de choix pour mesurer l'activité antioxydante du plasma sanguin, méthode utilisée également pour des extraits de plantes ou de boissons : l'échantillon est dissout dans une solution tampon (pH 7.4, 38°C), à laquelle on ajoute la R-phycoérythrine et l'AAPH. La fluorescence est suivie pendant 45 min (longueur d'onde d'excitation : 493 nm, filtre d'émission : 515 nm).

A la fin de la phase de latence, alors que les antioxydants de l'échantillon ont été consommés, la R-phycoérythrine commence à être oxydée et son intensité décroît. Les résultats sont quantifiés en standardisant la phase de latence de l'échantillon par celle d'une quantité connue de Trolox, 30 à 40 min après le début de la réaction. Lorsque la valeur de la fluorescence est à 50% de la valeur initiale, du Trolox est ajouté et la réaction est suivie jusqu'à linéarité de la courbe. Une courbe cinétique d'une analyse TRAP classique est montrée en figure V.

La capacité antioxydante d'un échantillon est exprimée en Trolox équivalent (X) par l'équation :

$$\frac{C_{Trolox}}{T_{Trolox}} = \frac{X}{T_{Ech}} \quad (iii)$$

Où C_{Trolox} est la concentration en Trolox, T_{Trolox} est le temps de latence de la courbe cinétique de la R-phycoérythrine en présence de Trolox, X est la capacité antioxydante de l'échantillon, et T_{Ech} est le temps de latence de la courbe cinétique en présence de l'échantillon. X est ensuite multiplié par 2, le facteur stœchiométrique du Trolox, et par le facteur de dilution de l'échantillon pour donner alors la valeur TRAP, en $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

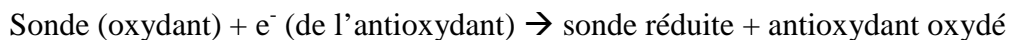
La réalisation de cette mesure peut uniquement s'effectuer si l'échantillon est hydrosoluble, et présente une phase de latence (cf. équation ii, § III.2.1), c'est à dire si l'antioxydant réagit au moins cent fois plus vite avec les radicaux peroxydes que ne le fait la R-phycoérythrine.

3. Analyses basées sur le transfert d'un électron

Ces analyses incluent peut être celle la plus courante, et souvent mal comprise : l'analyse des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu Reagent, FCR). On place

également dans cette catégorie l'analyse du pouvoir antioxydant par réduction de l'ion ferrique (Ferric ion Reducing antioxidant Power assay, FRAP).

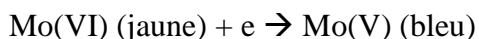
Ces méthodes mettent en jeu deux composés dans le milieu réactionnel, un antioxydant (l'échantillon) et un oxydant (la sonde), suivant la réaction :



La sonde est un oxydant qui arrache un électron de l'antioxydant, provoquant un changement de couleur de la sonde, proportionnel à la concentration en antioxydant. La fin de la réaction est atteinte lorsque la couleur ne varie plus. La variation de l'absorbance (ΔA) est relevée en fonction de la concentration en antioxydant pour donner une droite, dont la pente représente la capacité de réduction de l'antioxydant qui peut être exprimée en Trolox équivalent (TE) ou en acide gallique équivalent (GAE).

3.1 Analyse des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR)

Folin et Ciocalteu développèrent ce réactif en 1927, pour l'analyse de la tyrosine ^[12]. Le réactif est préparé en faisant bouillir pendant dix heures un mélange de tungstate de sodium (Na_2WO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$, 100g), de molybdate de sodium (Na_2MoO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$, 25g), de l'acide chlorhydrique concentré (100 mL), de l'acide phosphorique 85% (50 mL) et de l'eau (700 mL). Après ébullition, du sulfate de lithium (Li_2SO_4 , $4\text{H}_2\text{O}$, 150 g) est ajouté au mélange pour donner une solution de couleur jaune intense, le réactif de Folin et Ciocalteu. L'échantillon dilué (1 mL) est ajouté au réactif (5 mL) dans de l'eau (60 mL), puis l'on ajoute du carbonate de sodium Na_2CO_3 (15 mL) pour déprotoner les phénols (pH~10). Une réaction de réduction réversible, à un ou deux électrons, conduit à la formation d'espèces de couleur bleue, probablement $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$, et peut être suivie à 745-750 nm. Le transfert d'électron a lieu lors de la réduction du molybdène selon :



Plusieurs années après, Singleton et Rossi modifièrent et spécifièrent cette méthode à l'analyse des phénols totaux ^[13] dans le vin ; depuis cette méthode a trouvé de nombreuses applications. Ils améliorèrent la méthode avec l'utilisation d'un hétéropolyanion molybdotungstophosphorique ($3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 13\text{WO}_3 - 5\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$ et $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 14\text{WO}_3 - 4\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$) comme réactif, et en suivant un mode opératoire précis : (1) un rapport volumique en base et en réactif approprié, (2) un temps et une température de réaction

optimaux pour l'évolution de la couleur, (3) un suivi de la réaction par densité optique à 765 nm et (4) l'utilisation de l'acide gallique comme référence.

Le réactif de Folin et Ciocalteu n'est pas spécifique des composés phénoliques et peut être réduit par d'autres composés tel que les sucres, les amines aromatiques, le dioxyde de soufre, les acides organiques, la vitamine C, le Cu(I) et le Fe(II) ^[14]. Le réactif amélioré par Singleton et Rossi est plus spécifique des phénols, et la méthode développée permet d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles.

3.2 Analyse du pouvoir antioxydant par réduction de l'ion ferrique (Ferric ion Reducing antioxidant Power assay, FRAP)

L'analyse FRAP a été développée par Benzie et Strain ^[15] pour mesurer le pouvoir réducteur dans le plasma sanguin, elle a ensuite été adaptée pour l'analyse de la capacité antioxydante de substances naturelles. On réalise la réduction de l'ion ferrique 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) en un dérivé ferreux de couleur bleue intense en milieu acide (pH 3.6). L'absorbance est mesurée à 593 nm (cf. Fig. VII). La méthode est la suivante : on mélange du TPTZ (2.5 mL, 10 mM dans 40 mM d'HCl) à 25 mL d'une solution tampon et 2.5 mL de FeCl₃, H₂O (20 mM). Pour la réalisation de la mesure, 300 µL de réactif FRAP sont chauffés à 37°C avec lesquels on enregistre un blanc à 593 nm, puis l'on ajoute 10 µL de l'échantillon et 30 µL d'eau. L'absorbance est lue après 0.5 s et toutes les 15 s pendant 4 min. Dans certains cas (polyphénols en particulier), il est nécessaire de poursuivre l'expérience pendant plusieurs heures ^[17]. La variation de l'absorbance ($\Delta A = A_{4\text{min}} - A_{0\text{min}}$), proportionnelle à la concentration en antioxydant, est calculée et reportée au ΔA de solutions de concentrations croissantes en Fe(II). Une unité FRAP est définie par la réduction d'une mole de Fe(III) en Fe(II).

Tout comme l'analyse TEAC, l'analyse FRAP se base sur l'hypothèse que les réactions sont si rapides qu'elles sont finies en moins de quatre minutes, or ce n'est pas toujours vrai. Les résultats peuvent donc varier suivant le temps de l'analyse. Par contre, cette méthode d'analyse est simple, rapide, peu coûteuse et robuste.

4. Analyses basées sur les deux mécanismes

Bien que les analyses TEAC et DPPH soient couramment classées comme des réactions basées sur le transfert d'électrons (SET), les réactions semblent plus complexes et suivent l'un ou l'autre mécanisme (SET ou HAT) selon la structure des antioxydants ou la nature du

milieu réactionnel (pH, solvant protique) ^[17]. La réactivité et les mécanismes sont en effet difficiles à interpréter sans des informations détaillées de la composition et de la structure des antioxydants testés.

4.1 Analyse de la capacité antioxydante en équivalent Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC)

L'analyse TEAC a été proposée par Miller et Rice-Evans ^[19] en 1993, puis améliorée en 1999^[19] par Re et al. Dans la version améliorée, l'oxydant ABTS^{•+} (cf. Fig. VII) est produit par l'oxydation de l'acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic), l'ABTS²⁻ en présence de persulfate de potassium. 7 mmol d'ammonium ABTS sont dissoutes dans l'eau et traitées avec 2.45 mmol de persulfate de potassium, que l'on laisse à température ambiante pendant 12 à 16h pour donner une solution bleue-noire. La solution est ensuite diluée dans l'éthanol ou une solution tampon (pH 7,4) jusqu'à obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm. Un millilitre de cette solution est mélangé avec 10 µL de l'échantillon, on lit alors l'absorbance 1, 4 et 6 minutes après, à 30°C. La variation de l'absorbance est reportée en fonction de la concentration en antioxydant pour donner une droite. Alors, la concentration en antioxydant donnant la même variation d'absorbance que 1 mM de trolox est la valeur en Trolox équivalent de l'échantillon.

Du fait de sa simple mise en œuvre, l'analyse TEAC a trouvé de nombreuses applications en recherche et en industrie. De plus, l'ABTS est soluble en milieux aqueux et organique et peut être utilisé dans différents milieux pour évaluer la capacité antioxydante d'extraits.

4.2 Analyse au DPPH

Le DPPH (cf. Fig. VIII) est l'un des radicaux organiques azotés disponible dans le commerce le plus stable ; il possède un maximum d'absorption à 515 nm. L'analyse est faite en mélangeant une solution de DPPH (3,9 mL, 25 mg.L⁻¹ dans le méthanol) à l'échantillon (0.1 mL), puis en suivant la variation de l'absorbance pendant 30 min à 515 nm. La solution se décolore, et le pourcentage de DPPH restant est donné par :

$$\%DPPH_{restant} = 100 \times [DPPH]_{restant} / [DPPH]_{t=0}$$

$\%DPPH_{restant}$ est proportionnel à la concentration en antioxydant, et la concentration conduisant à une diminution de moitié de la concentration initiale en DPPH est nommée l'EC₅₀. Le temps de réaction nécessaire à l'obtention d'un état stable, avec la concentration

EC₅₀, est défini comme le T_{EC50}. Une courbe cinétique typique d'une analyse DPPH est montrée figure IX. Sanchez-Moreno et al. ont classé les comportements cinétiques des antioxydants selon : < 5 min (rapide), 5-30 min (intermédiaire) et > 30 min (lent). Ils ont également proposé un paramètre, l'efficacité antiradicalaire (antiradical efficiency, AE) ^[20], pour exprimer la capacité antioxydante de certains antioxydants selon :

$$AE = 1/EC_{50}T_{EC50}$$

L'analyse DPPH est simple, rapide et ne nécessite qu'un spectrophotomètre UV-visible. Elle comporte néanmoins un certain nombre d'inconvénients, en particulier dus à l'encombrement stérique et la stabilité du DPPH, induisant une meilleure accessibilité et une plus forte réactivité des antioxydants de petites tailles. Il en découle parfois une surévaluation de leur activité antioxydante vis-à-vis des grosses molécules. Toutefois, cette méthode est très utilisée et de nombreuses références permettent une évaluation *a priori* de l'échantillon.

IV. Conclusion

Nous avons analysé diverses méthodes de mesure de la capacité antioxydante de molécules et d'extraits d'origine naturelle, réalisables à l'échelle du laboratoire de recherche ou à l'échelle industrielle. Il n'existe pas de méthode de référence, mais de nombreuses méthodes qu'il faut sélectionner et standardiser selon le problème posé. D'autres méthodes existent mais sont généralement adaptées à l'analyse de fluides biologiques et n'ont pas été décrites ici.

Les facteurs à considérer dans le choix des méthodes sont : (1) les mécanismes impliqués dans la réaction de la mesure de l'activité antioxydante, en relation avec ceux de l'activité antioxydante de l'échantillon lui-même ; (2) la solubilité des réactifs et des extraits dans le solvant d'analyse ; (3) l'existence de données consultables et suffisamment exhaustives, afin de vérifier les valeurs à celles décrites dans la littérature.

REFERENCES

- (1) P. Schultz & D. D. Nicholas, *Phytochemistry*, **54**, 47-52 (2000)
- (2) K. Pelli & M. Lyly, *les antioxydants dans l'alimentation*, Flair FLOW EUROPE 4, (2003)
- (3) IARC, *Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation*, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 40 (1998)
- (4) D.B. Min, *Antioxidants*, Course schedule of FST, College of food, agricultural, and environmental sciences, OHIO (2001)
- (5) D. Huang *et al*, *J. of Agric. and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856 (2005)
- (6) Cao *et al*, *Free radical Biol. Med*, **14**, 303-311 (1993)
- (7) Cao *et al*, *Methods Enzymol*, **299**, 50-62 (1999)
- (8) Ou *et al*, *J. of Agric. and Food Chemistry*, **49**, 4619-4626 (2001)
- (9) D. D. Wayner *et al*, *FEBS Lett*, **187**, 33-37 (1985)
- (10) R. J. DeLange *et al*, *Anal. Biochem*, **177**, 300-306 (1989)
- (11) A. Ghiselli *et al*, *Free Radical Biol. Med*, **29**, 1106-1114 (2000)
- (12) O. Folin & V. Ciocalteu, *J. Biol. Chem*, **73**, 627 (1927)
- (13) V. L. Singleton *et al*, *Methods Enzymol*, **299**, 152-178 (1999)
- (14) R. L. Prior *et al*, *J. Agric. Food Chem*, **53**, 4290-4302 (2005)
- (15) I. F. F. Benzie & J. J. Strain, *Anal. Biochem*, **239**, 70-76 (1996)
- (16) R. Pulido, *J. Agric. Food Chem*, **48**, 3396-3402 (2000)
- (17) A. Jiménez, *Org. Lett*, **6**, 4583-4586 (2004)
- (18) N. J. Miller & C. A. Rice-Evans, *Clin. Sci*, **84**, 407-412 (1993)
- (19) R. Re *et al*, *Free Radical Biol. Med*, **26**, 1231-1237 (1999)
- (20) C. Sanchez-Moreno *et al*, *J. Sci. Food Agric*, **80**, 1686-1690 (2000)

RAPPORT DE STAGE

I. Introduction

Les infections fongiques ou mycoses sont les affections humaines les plus fréquentes. Elles sont particulièrement répandues en zone intertropicale. Aujourd'hui, *Trichophyton rubrum* est le champignon pathogène le plus fréquemment isolé cliniquement dans le monde et au Brésil^[1,2]. Depuis le très courant « pied d'athlète » jusqu'à des infections systémiques graves et débilitantes, on assiste actuellement à l'émergence ou la réémergence de pathologies fongiques liées à l'augmentation de la population immunodéprimée ou à l'apparition de chimiorésistances^[3,4,5].

En effet, l'apparition de phénomènes de chimiorésistance n'épargne pas les pathologies fongiques. L'émergence des infections invasives dues à certains *Candida* résistants au fluconazol (agent antifongique plus utilisé pour le traitement de candidoses) est un problème récurrent déjà observé dans plusieurs hôpitaux^[6,7]. Il a été montré que les taux de résistance d'isolats sanguins de *Candida glabrata* au fluconazol peuvent atteindre des niveaux de 7 à 14% en hôpital aux Etats-Unis et 3,7 à 40% dans certains hôpitaux européens^[6,8]. L'apparition de chimiorésistances à l'amphotéricine B a même été observée avec plusieurs champignons filamenteux (*Pseudallescheria boydii*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*) et certaines levures (*Candida lusitanae* e *Candida guilliermondii*)^[7,9].

Malgré les travaux entrepris pour rechercher de nouveaux composés à activité antifongique, l'arsenal thérapeutique reste limité et une nouvelle approche, bioinspirée, peut apporter des réponses nouvelles et originales. Elle consisterait à rechercher des composés antifongiques naturels dans les organismes qui doivent se protéger contre les champignons. Or, les plantes ont appris à se défendre contre leurs agresseurs naturels, et ces agresseurs, en tout premier lieu, sont des champignons^[10]. Outre les données ethnopharmacologiques classiques, l'autre source d'information relative à la stabilité des végétaux est la durabilité des bois. Il n'existe aujourd'hui pas d'exemples de recherche pharmacologique bioinspirée utilisant comme source d'information des données technologiques.

Ce stage s'inscrit dans le cadre du projet FONGICIDES faisant partie du programme de recherche CNRS AMAZONIE phase II.

II. Projet FONGICIDES

1. Contexte

Les affections fongiques humaines de la peau et des muqueuses sont largement répandues, surtout en zone intertropicale, et les dermatophytes et les *Candida* sont les pathogènes les plus fréquemment rencontrés ^[11]. Le laboratoire de pharmacognosie de l'Université de Brasília (UnB), membre du Pole Universitaire guyanais et collaborateurs de l'UMR Ecofog dans le cadre du projet FONGICIDES, a mis en place un laboratoire expérimental de tests biologiques sur un certain nombre de champignons parasites humains.

Quant à elle, l'équipe chimie de l'UMR Ecofog travaille depuis quatre ans en Guyane dans le domaine de la chimie des substances naturelles (analyse, aspects fonctionnels et valorisation), et l'équipe a reçu le soutien de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), notamment pour évaluer les potentialités du transfert de la durabilité des bois très durables vers des bois non durables. Dans ce programme XYLOTECH, elle étudie les possibilités d'utilisation des déchets issus d'espèces ligneuses en vue de les présenter comme matières actives pouvant entrer dans la conception de produits de préservation des bois. Les végétaux récoltés et les extraits produits dans le cadre de XYLOTECH correspondent au critère de sélection pour la découverte de nouveaux traitements antifongiques et peuvent donc bénéficier au projet FONGICIDES.

2. Résultats préliminaires

La question primordiale était d'évaluer le caractère informatif de la durabilité naturelle pour la recherche de composés à activité antifongique. Dans le cadre de XYLOTECH, Alice Maria de Souza Rodrigues a réalisé pour l'instant 150 extraits des différents organes (duramen, aubier, écorce, feuilles) de 18 essences d'arbres spécialisant un bois durable. 36 de ces extraits ont déjà été testés *in vitro* à la fois sur des champignons lignivores (*Pycnoporus sanguineus* et *Gloeophyllum trabeum*) et sur les champignons dermatophytes précités ^[12]; 13 sont actifs sur les champignons lignivores et 3 sont actifs sur les champignons dermatophytes. Bien qu'on ne puisse pas considérer cet échantillon comme statistiquement représentatif, on peut souligner que cette dernière valeur (3 sur 36, soit environ 10%) est supérieure à celle obtenue généralement dans un criblage au hasard (environ 1‰ dans le cas de végétaux). Il est surtout très important de constater que les extraits actifs sur les champignons dermatophytes sont également actifs sur les champignons lignivores, ce qui semble indiquer que les principes

actifs contenus dans ces extraits exploitent des voies métaboliques communes – et donc sans doute spécifiques – à tous les champignons. Ces essais préliminaires tendent donc effectivement à montrer que la sélection d'espèces spécialisant un bois durable peut orienter le criblage positivement pour la recherche de composés à activité antifongique.

Les extraits méthanoliques des feuilles et de l'écorce de *Qualea rosea* (Vochysiaceae) ont été sélectionnés lors de ce criblage préliminaire pour leur activité sur le champignon lignivore *Gloeophyllum trabeum*, sur le dermatophyte *Trichophyton rubrum* et sur *Candida parapsilosis*. Dans le cadre de ce stage, nous avons cherché à réaliser l'isolement bioguidé et la caractérisation d'une nouvelle molécule antifongique. Nous nous sommes également intéressés à l'étude de la synergie entre les biocides et les antioxydants, afin de mieux comprendre les mécanismes de l'activité antifongique et de pouvoir interpréter une diminution éventuelle de l'activité d'une molécule biocide lorsqu'elle est isolée.

III. Fonction défensive des extractibles

Schultz *et al* ^[13] ont proposé que les extractibles de bois durables protégeaient ceux-ci contre les champignons et la dégradation par deux mécanismes : les extractibles ont certaines propriétés fongicides et sont également des pièges de radicaux libres (antioxydants). Cette hypothèse de double défense est basée sur le fait que les champignons lignivores *Gloeophyllum trabeum* et *Trametes versicolor* sont connus pour utiliser des espèces radicalaires afin de modifier les parois cellulaires ^[14]. C'est espèces radicalaires augmenteraient suffisamment la taille des pores afin que les enzymes fongiques extracellulaires puissent pénétrer dans la paroi des cellules végétales. Cependant, les extractibles phénoliques sont d'excellent antioxydants. Ainsi, bien que les mécanismes et les enzymes par lesquels *G. trabeum* et *T. versicolor* dégradent le bois diffèrent, l'étape initiale est supposée mettre en jeu des espèces radicalaires perturbant la paroi cellulaire. Cette étape du processus de dégradation du bois peu être inhibée par les propriétés antioxydantes des extractibles du bois.

Dans des tests préliminaires, Shultz *et al* ^[13] ont montré que la combinaison de l'antioxydant BHT (2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol) (cf. Fig. X), n'ayant pas de propriétés antifongiques avec des biocides organiques, qui ne sont pas phénoliques et n'ont pas de propriétés antioxydantes augmente l'efficacité contre les champignons précités par rapport au biocide seul. Le choix de l'antioxydant s'est porté vers un produit synthétique et non vers un produit

isolé à partir de plantes ligneuses qui pourrait avoir cette double propriété biocide/antioxydante.

Le wapa, ou *Eperua Falcata*, famille des cesalpinaceae, est un arbre très durable de Guyane française. Il en a été isolé des composés diterpénoïques, dont l'acide épéruique ^[15] (cf. Fig. XI) qui a montré une activité antifongique sur *Coriolus Versicolor* ; ainsi que de la (+)-catéchine (cf. Fig. XII), antioxydant fréquemment rencontré chez les végétaux. Dans le cadre de ce stage, nous avons cherché à évaluer et quantifier la capacité antioxydante de la (+)-catéchine et du BHT vis-à-vis d'un référent, le trolox. Mais également de mettre en évidence une synergie d'action entre l'acide épéruique et la catéchine dans l'activité antifongique. L'objectif de cette partie du travail était de mettre en place un test *in vitro* de synergie afin de rendre compte au mieux du mécanisme d'autoprotection des végétaux – *Qualea rosea* pour ce qui concerne le travail décrit ici.

IV. Le genre *Qualea* et l'espèce *Qualea rosea*

Le genre *Qualea* fait partie de la famille des *Vochysiaceae*, ordre des *Myrtales* ; clade des *Rosidées vraies II*. Cette famille semble se trouver exclusivement en Amérique du sud, principalement en zone Amazonienne, et est très voisine génétiquement de la famille des *Myrtaceae*. Le genre *Qualea* est constitué de 60 espèces dont certaines sont utilisées en médecine traditionnelle ou en bois de construction pour leur durabilité et revêt donc une importance économique. On peut noter en particulier :

- *Qualea Parviflora*, ou *pau-terra-mirim*, utilisé comme antiseptique, antiulcéreux et contre les désordres gastro-intestinaux au Brésil ^[16]. Il en a été isolé des nor-seco-triterpènes intéressant pour leurs propriétés pharmacologiques antibactériennes et hepatoprotectrices ^[17].
- *Qualea grandiflora*, dont les extraits hydro-alcooliques sont largement utilisés dans le *Cerrado* Brésilien pour ses activités anti ulcéreuses ^[18].
- *Qualea paraensis*, utilisé comme cicatrisant en Amazonie bolivienne par les indiens Chacobo et ayant montré des propriétés antimalariques intéressantes *in vivo* ^[19].

Le Gonfolo rose, ou *Qualea rosea*, est un arbre de l'étage dominant, pouvant atteindre 35 m de hauteur avec des diamètres variant de 50 à 100 cm. Les fleurs, hermaphrodites, sont pourvues d'un pétale blanc à base rose et avec une tache jaune clair. En Guyane, les pics de floraison ont lieu de novembre à décembre et la fructification de janvier à avril. C'est une

espèce assez commune en Guyane et héliophile dont la croissance est relativement rapide. Son système racinaire pivotant se développe particulièrement bien dans les sols sableux et lui garanti un approvisionnement en eau optimal, notamment en saison sèche.

Au Brésil, on l'appelle *mandioqueira rosa* qui est aussi son nom commercial international. Le nom de genre *Qualea* provient du Caribe (tribu amérindienne des Caraïbes et du nord-est amazonien) *qualé*, synonyme de *kwali* en Aluku (tribu bushinengué du fleuve Maroni) mot qui désigne des arbres de la famille des *Vochysiaceae*.

V. Partie expérimentale

1. Récolte et description du matériel végétal

Les feuilles et les écorces de *Qualea rosea*, famille des Vochysiaceae, ont été récoltées sur le site de l'exploitation forestière KLR, partenaire industriel dans le cadre du projet XYLOTECH, située au km 70 sur la piste de Bélizon, en forêt primaire sempervirente. Cette récolte a été effectuée en janvier 2008, période de petite saison des pluies (précipitations mensuelles moyennes : 400 mm).

L'espèce a été confirmée à l'herbier de Guyane (IRD) par la description du livre *Guide to the vascular plants of central French Guiana*^[20]. Le fût de l'arbre est droit et élancé, muni de contreforts irréguliers. L'écorce est grise-rosâtre, crevassée verticalement et irrégulièrement, s'exfoliant et pourvue de lenticelles. Les feuilles sont simples, opposées, entières, elliptiques avec nervures secondaires fines et serrées, parallèles entre elles et reliées à une nervure sub-marginale. Les nervures primaires sont pubérulente dessous, et l'on note la présence d'*extrafolia nectaries* à l'aisselle, ce qui permet de le différencier du Gonfolo gris, *Ruizterania albiflora* (Vochysiaceae), très proche morphologiquement.

2. Extraction

On effectue une extraction successive des feuilles et des écorces par macération pendant 12h des broyats dans l'acétate d'éthyle à température ambiante (24 °C), puis filtration et évaporation du solvant. L'opération est répétée trois fois avant de poursuivre l'extraction au méthanol, où le même procédé est suivi. Un tableau récapitulatif des rendements est noté *infra*.

organe	Feuilles	écorce
masse initiale (g)	370	4200
taux d'humidité (%)	7.2	3.8

Extraction à l'acétate d'éthyle :

nom	CB01	CB02
masse de l'extrait brut (g)	18, 29	23,0
Rendement (%)	5,3	0,5

Extraction au méthanol :

nom	CB03	CB04
masse de l'extrait brut (g)	46, 72	401,0
Rendement (%)	13,6	9,9

3. Profil chromatographique des extraits méthanoliques

Chromatographie sur couche mince : Au vu de la polarité des extraits et de leur dégradation sur la silice (Silica gel 60 F₂₅₄ Merck), les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur plaque de silice désactivée. La désactivation est réalisée par immersion de la plaque (2x6 cm) dans une solution d'hexane/Et₃N : 10/1 suivit d'un rinçage à l'hexane afin d'éliminer la triéthylamine non adsorbée. Le solvant d'élution utilisé est de l'éthanol, on observe alors deux taches : l'une visible avec un R_f = 0 et l'autre visible aux UV à 254 nm avec un R_f = 0,6.

Chromatographie HPLC : L'appareillage HPLC utilisé est constitué d'une colonne C₁₈ Discovery® SUPELCO 15 cm x 4,6 mm, 5 µm avec un gradient d'élution eau/méthanol t = 0 min : 85% H₂O ;

$t = 8\text{min} : 0\% \text{ H}_2\text{O}, 1 \text{ mL.min}^{-1}$. Le méthanol provient de Sigma-Aldrich, l'eau miliQ est produite à l'Institut Pasteur de Guyane.

4. Fractionnement bioguidé

4.1 Chromatographie flash

Des chromatographies flash ont été réalisées sur les extraits méthanoliques des feuilles et des écorces (CB03 et CB04) en vue de faire une pré-séparation grossière. Dans une ampoule à décanter de 100 mL, on place successivement : un culot de coton, 40 mL de silice et un empâté fait de 2g de silice et 500 mg d'extrait mis en suspension dans du méthanol jusqu'à dissolution de l'extrait. La suspension est mise à évaporer pour obtenir une poudre, composée de silice et d'extrait adsorbé, qui est broyée finement au mortier et déposée dans l'ampoule à décanter. On élue avec 100 mL d'acétate d'éthyle poussé à l'air puis avec 100 mL de méthanol. On récolte les deux fractions correspondantes aux éluants ; après évaporation, les rendements obtenus sont de l'ordre de 15%.

4.2 CCM préparative

Une CCM préparative de l'extrait méthanolique des écorces (CB04) a été réalisée avec une plaque de silice Partisil® Merck 20 cm x 20 cm x 1000 μm , 60 Å ; désactivées comme noté précédemment pour les CCM analytiques. On dépose avec une pipette pasteur 0,6 mL d'une solution à 70 mg.mL^{-1} d'extrait dans l'éthanol et on laisse développer dans une cuve saturée en éthanol. Les deux taches sont grattées sur la plaque, les composés sont désorbés avec du méthanol pour obtenir deux fractions : CBO4 I ($R_f = 0$) et CB04 II ($R_f = 0,6$). Ces deux fractions ont été testées biologiquement sur *Gloeophyllum trabeum* par la suite.

4.3 Chromatographie flash sur colonne ouverte

Une chromatographie sur colonne ouverte (OTC, Open Tubular Chromatography) a été réalisée avec de la silice désactivée. Pour cela, on met en suspension 110 g de silice dans 300 mL d'une solution d'hexane/Et3N : 20/1, on verse cette suspension dans la colonne que l'on rince avec 300 mL d'hexane et 200 mL d'éthanol. 3g d'extrait méthanolique d'écorce (CB04) dissout dans 8 mL de méthanol sont déposés sur la silice puis élués à 100 mL d'éthanol. On récolte dix volumes de 20 mL, et l'élution est continuée au méthanol. Au total, 23 fractions sont collectées, séchées et analysées en HPLC (gradient d'élution $t = 0 \text{ min} : 85\% \text{ H}_2\text{O}$; $t = 8\text{min} : 100\% \text{ MeOH}$, identique à celui noté § IV.3). Les profils chromatographiques obtenus permettent de regrouper les fractions similaires, soit au final 10 fractions pour un rendement de 15% (une majorité de produit reste adsorbé sur la silice). Ces dix fractions ont été testées biologiquement sur *Gloeophyllum trabeum* par la suite.

4.4 Précipitation

En dissolvant un minimum d'extrait méthanolique des feuilles (CB03) dans du méthanol, puis en ajoutant en excès du dichlorométhane, on précipite les composés les plus polaires. En filtrant, on récupère environs 50% de la masse initiale nommée CB03 P.

4.5 HPLC préparative

Premier fractionnement : On réalise une HPLC préparative (colonne C_{18} Discovery® SUPELCO 25 cm x 21.1 mm, 5 μm , gradient d'élution eau/méthanol $t = 0 \text{ min} : 95\% \text{ H}_2\text{O}$, $t = 12 \text{ min} : 0\% \text{ H}_2\text{O}$, débit 15 mL.min^{-1}) de 0,73 g de CBO3 P dissout dans 3 mL d'une solution $\text{MeOH/H}_2\text{O} : 1/4$. 24 fractions

sont récoltées toutes les 30 s de 4 min à 15 min, séchées puis testés biologiquement sur *Gloeophyllum trabeum* par la suite.

Second fractionnement : Les fractions 7, 8, 9, 10 se sont révélées actives en tests biologiques et doivent être purifiées de nouveau par HPLC préparative.

10 mg de la fraction 7 ont été purifiées sur colonne C₁₈ avec un gradient d'élution eau/méthanol t = 0 min : 85% H₂O ; t = 15 min : 20% H₂O. 24 fractions sont récoltées toutes les 6 secondes de 5 min à 7.30 min, puis analysées selon la méthode décrite *supra*.

5. Mesure de l'activité antioxydante

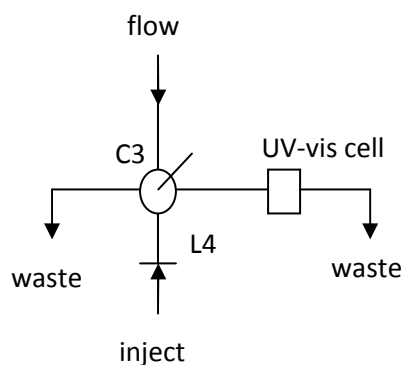
Le système analytique Waters 2487 dual λ de l'HPLC peut être modifié afin de se servir du détecteur UV-vis comme d'un spectromètre UV-vis. Ce détecteur est très sensible (bruit $< \pm 0.35 \times 10^{-5}$ AU), très précis et permet des mesures de 190 à 700 nm.

Ce protocole décrit le montage, les conditions de mesure, les problèmes fréquents et une description de la manipulation.

5.1 Préparation des solutions

Le but de l'analyse est de déterminer l'EC₅₀ d'un échantillon (extrait, molécule...), soit la concentration nécessaire à inhiber 50% du radical DPPH (cf. rapport bibliographique). On mesure pour cela l'absorbance du DPPH seul, et l'absorbance du DPPH en fin de réaction avec différentes concentrations d'échantillons. Il faut dans un premier temps procéder à tâtons afin de cerner l'EC₅₀, puis de réaliser des solutions (5 au minimum afin de réaliser la droite de calibration) de concentrations voisines à l'EC₅₀.

5.2 Montage



Cellule analytique

Longueur d'onde de travail : 515 nm

Le montage permet de connecter le septum d'injection, la cellule de détection (voie L4) et l'entrée de solvant (voie C3) par l'intermédiaire de la vanne 6 voies. Selon la position de celle-ci (load ou inject), on basculera en mode injection (position load) ou en mode purge (position inject). Le fil de commande de la vanne doit être déconnecté afin d'éviter une remise à zéro automatique.

5.3 Injection, mesure

Le volume total du montage est d'environ 150 μ L, il est donc nécessaire d'injecter au moins 200 μ L afin d'éviter toute dispersion/dilution de l'analyte dans la tubulure.

Il faut purger les tubulures entre chaque injection d'analyte en faisant circuler du solvant dans le système.

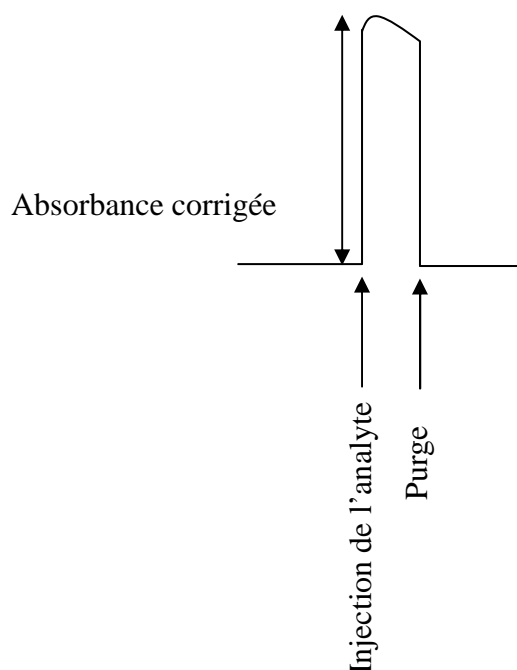
Déroulement d'une série d'injection

- 1- Equilibrage (mode purge, position inject de la vanne)
- 2- Enregistrement de l'acquisition, rebasculer la vanne sur inject (l'acquisition se lance), couper le débit de solvant, débrancher le fil de commande de la vanne
- 3- Mettre la vanne sur load
- 4- Injection au minimum de 200 μL d'analyte
- 5- Purge, 1 min d'équilibrage de la ligne de base
- 6- Injection de 300 μL d'analyte
- 7- Purge, 1 min d'équilibrage de la ligne de base
- 8-
- 9- A la fin des mesures, stopper l'acquisition.

Mesure

Le détecteur UV-visible permet une mesure d'absorbance de 0 à 4 AUS, l'idéal étant d'avoir des solutions dont l'absorbance est supérieure à 0.20 AUS et inférieure à 2 AUS. L'absorbance d'un échantillon est donnée par la hauteur du pic, soit la différence entre son maximum et la ligne de base au pied du pic. Cela permet d'obtenir une valeur corrigée en zéro, la purge ne permettant pas un retour systématique à une ligne de base de 0.000 AU.

Le relevé des valeurs se fait à l'aide du pointeur et de la souris directement sur le spectrogramme obtenu, en zoomant éventuellement.

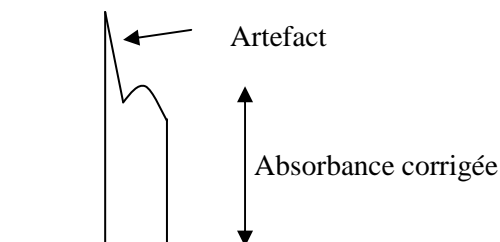


Chaque échantillon doit être injecté trois fois, des artefacts et des valeurs aberrantes pouvant apparaître. De plus, le DPPH est réduit par les tubulures, et son absorbance décroît rapidement dans le temps. Toutefois, les valeurs ont une bonne répétabilité ($CV\% < 1.0$).

Aberrations

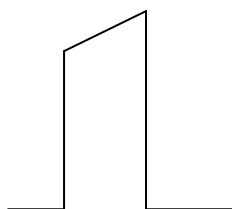
Une injection peut renvoyer une réponse aberrante ($< 10\%$ des cas) aisément identifiable :

- Artefacts



Les artefacts peuvent être dus à la présence de microbulles, ou à une réponse du détecteur lors de la mise en mouvement du liquide dans la cellule. Le plus souvent, ils n'affectent pas la mesure et l'absorbance corrigée peut être relevée.

- Valeur erronée



Une réponse de ce type est le plus souvent surestimée et aisément identifiable par une augmentation de l'absorbance dans le temps, en contradiction avec la réduction du DPPH par la matrice. La valeur d'absorbance est assurément fausse et ne doit pas être prise en compte. Ceci peut être dû à un volume d'injection trop faible

5.4 Manipulation, adaptée du protocole de Brand-Williams & Cuvelier (1994)^[21]

En modifiant les connections de la vanne 6 voies et en adaptant certains paramètres informatiques, l'évaluation de l'activité antioxydante par analyse au DPPH du BHT, de la (+)-catéchine et du trolox a été réalisée suivant le protocole adapté de Brand-Williams & Cuvelier (1994)^[21].

Les expériences ont été réalisées dans des piluliers ambrés, sous azote, dans le noir et les solvants ont été dégazés à l'azote. La courbe de calibration du DPPH est réalisée en préparant des solutions de concentrations connues et en mesurant leurs absorbance à 515 nm. On détermine l'équation de la droite de calibration par régression linéaire forcée en zéro :

$$y = 103,9 x \quad ; \quad R^2 = 0.998$$

0.1 mL de 5 solutions à différentes concentrations (par ex. pour le Trolox : 140 ; 120 ; 100 ; 80 et 50 mg.L⁻¹) en antioxydant sont ajoutés à 2 mL de solutions de DPPH à 100 µM dans le méthanol, les

solutions sont laissées à réagir pendant 4h. On mesure l'absorbance à 515 nm de chacune des solutions. Le pourcentage de DPPH restant - exprimé par

$\%DPPH_{restant} = 100 \times [DPPH]_{restant} / [DPPH]_{t=0}$ où $[DPPH]_{restant}$ et $[DPPH]_{t=0}$ sont obtenus grâce à la droite de calibration - est reporté en fonction de la concentration en antioxydant dans les réacteurs (cf. annexe 1). La régression linéaire simple dans le domaine de linéarité de la courbe obtenue permet d'obtenir l' EC_{50} en $mol.L^{-1}$, soit la concentration en antioxydant nécessaire à la réduction de 50% du DPPH. Rapporté à la concentration en DPPH initial on obtient l' EC_{50} en $mol.L^{-1}$ d'antioxydant par $mol.L^{-1}$ de DPPH. Pour des raisons de clarté, on définit l'ARP (antiradical power) comme l'inverse de l' EC_{50} ($1/EC_{50}$). Plus l'ARP est élevé, plus l'antioxydant est efficace.

6. Tests biologiques

6.1. Test par diffusion en cavité

Les tests antifongiques ont été réalisés à l'INRA, département de microbiologie, au campus agronomique de Kourou, selon un protocole décrit par A.M.S. Rodrigues. Il s'agit d'un test qualitatif par diffusion en cavité dans un milieu de culture gélosé effectué sur une souche de *G. trabeum* (cf. Fig. XIII).

Matériel et consommables utilisés : Hotte à flux laminaire, bec benzène, scalpels stériles, hampe de platine stérilisée, pipettes pasteur stérilisées, eppendorff stériles, micropipettes gilson®, cônes de prélèvement stériles, vortex, DMSO stérilisé, eau distillée, Agar-agar, extrait de maltose, boîtes de pétri stérilisées diamètre 14 cm et 9 cm, mycothèque de *G. trabeum*.

Préparation du milieu de culture : Le milieu de culture est un mélange d'extrait de maltose ($40 g.L^{-1}$) et d'agar-agar ($20 g.L^{-1}$) mis en suspension dans de l'eau distillée, puis autoclavé à $121^{\circ}C$ sous 3 atmosphères pendant 20 minutes. Les boîtes de pétri sont remplies au tiers à proximité d'une flamme de bec benzène, on laisse alors le milieu de culture se gélifier dans une hotte à flux laminaire.

Préparation des échantillons : Les échantillons (extraits bruts, fractions ou composé pur) sont dissouts dans du DMSO stérilisé dans une concentration de $100 g.L^{-1}$, typiquement 20 mg que l'on dissout dans 200 μL .

Ensemencement des milieux de cultures : A l'aide d'une hanse en platine stérile, le mycélium d'une souche est prélevé dans une boîte de pétri de la mycothèque et mis en suspension dans 1 mL l'eau distillée. 300 μL de cette suspension sont déposés et étalés sur la surface du milieu de culture d'une boîte de pétri précédemment préparée.

Dépôt des échantillons, incubation : Le milieu de culture ensemencé est percé (jusqu'à neuf trous de 3 mm de diamètre par boîte de pétri Ø14 cm) à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée, on dépose alors 50 μL de chaque échantillon dans les puits réalisés. La boîte de pétri est refermée, puis laissée à incuber à l'abri de la lumière à $30^{\circ}C$.

Lecture du résultat : Le diamètre du halo d'inhibition est mesuré au bout de cinq jours, ou plus suivant la vitesse de croissance du champignon. Un résultat positif satisfaisant est validé pour un halo d'inhibition d'un diamètre supérieur à 15 mm.

6.2. Bio-autographie

Le protocole utilisé a été inspiré de celui décrit par A.F. Teixeira^[22]. Une plaque chromatographique de silice préalablement autoclavée puis développée (cf. § IV.3) est déposée sur le milieu de culture contenu dans une boîte de pétri nonensemencée de diamètre 9 cm (cf. Fig. XIV). La souche de *G. trabeum* est inoculée en déposant trois carrés de mycélium (1 x 1 cm) de part et d'autre de la plaque chromatographique. La boîte de pétri est refermée, puis laissée à incuber à l'abri de la lumière à 30°C. Un résultat positif est validé par l'observation d'un halo d'inhibition de croissance au niveau des taches de migration.

6.2 Tests de synergie

Des expériences (cf. Fig. XV) pour mettre en évidence une synergie dans l'activité antifongique d'un antioxydant avec un biocide ont été réalisées avec le BHT et la (+)-catéchine, comme antioxydant, et l'acide épéruïque comme biocide, sur *G. trabeum*. Il s'agit d'un test par diffusion en cavité, où les conditions expérimentales suivent celles décrites en 6.1. Le BHT, la (+)-catéchine et l'acide épéruïque ont été testés séparément (50 µL à 100 gL⁻¹ par puits). Les couples BHT + acide épéruïque et (+)-catéchine + acide épéruïque ont été testés soit ensemble dans un même puits (25 µL antioxydant + 25 µL acide épéruïque à 100 g.L⁻¹), soit distant de 1 cm (50 µL par puits). Une surexpression du halo d'inhibition est attendue par rapport au composé biocide seul dans le cas d'une synergie positive.

V. Résultats et discussions

Purification sur silice désactivée: L'utilisation de silice activée ou faiblement activée pour une colonne chromatographique ouverte ou une CCM préparative était irréalisable au vu de la forte polarité des extraits méthanoliques. En effet, les composés s'adsorbent fortement sur la silice et se dégradent visiblement lors de CCM analytique par l'observation de trainées sur la plaque et de rendements très faibles, inférieurs à 15%, lors de colonnes chromatographiques ouvertes. En l'absence d'alumine, ou de gel chromatographique type SEPHADEXTM, l'utilisation d'une silice désactivée a été envisagée et a donnée des résultats satisfaisants pour des plaques CCM analytiques, mais pas dans le cas de colonnes chromatographiques ouvertes ou de CCM préparatives. Aucune des fractions récoltées par ces méthodes n'ont montré d'activité biologique sur *G. trabeum* ; et une dégradation du produit sur la silice accompagnée d'une perte d'activité biologique est fortement mise en cause.

Fractionnement par HPLC préparative : La méthode utilisée pour le fractionnement de l'extrait méthanolique des feuilles a le double avantage d'être une chromatographie de phase inverse, donc non dégradante *a priori*, et hautement reproductible sous réserve d'intégrité de la colonne préparative. Nous avons étudié des méthodes sur colonnes PEG en phase normale et inverse, sans obtenir de meilleures résolutions qu'avec la colonne C₁₈. Des 22 fractions collectées, 4 ont montré une activité biologique sur *G. trabeum* (fractions n° 7, 8, 9 et 10) avec un halo d'inhibition moyen de 22 mm de diamètre. La séparation n'est donc pas fine – étalement de l'activité sur plusieurs fractions consécutives – mais l'activité est conservée.

Second fractionnement : La fraction n°7 présentait un profil chromatographique peu résolu, avec probablement 5 à 6 pics chevauchés. Toutefois, on a pu isoler 1 mg d'un composé pur mais qui n'est probablement pas responsable de l'activité biologique. La faible quantité ne permettra pas de réaliser de tests biologiques, mais une analyse structurale peut être envisagée (au moment où ce rapport est écrit, le spectromètre RMN du laboratoire L3MA est en cours d'installation).

Mesure de l'activité antioxydante : L'évaluation de l'activité antioxydante du Trolox (référént), du BHT et de la (+)-catéchine a été réalisée à l'aide d'un détecteur UV-vis d'une chaîne HPLC Waters 2487 dual λ modifiée. Le protocole mis en place permet une mesure reproductible, robuste et précise. Les IC₅₀, en moles d'antioxydant par moles de DPPH, du Trolox, du BHT et de la (+)-catéchine obtenus sont respectivement $0,23 \pm 0,02$; $0,18 \pm 0,02$ et $0,06 \pm 0,1$ (courbes en annexe I). Ceux-ci correspondent à des pouvoirs antiradicalaires

(ARP) de $4,4 \pm 0,1$ pour le trolox ; $5,6 \pm 0,1$ pour le BHT et $15,8 \pm 0,1$ pour la (+)-catéchine. Concernant la cinétique de réaction, le trolox et la (+)-catéchine réagissent jusqu'à 6 fois plus vite que le BHT, selon les concentrations en DPPH dans le milieu réactionnel. Une activité antioxydante du BHT légèrement supérieure à celle du Trolox tout en restant du même ordre de grandeur, et une cinétique lente du BHT vis-à-vis du Trolox est un résultat attendu et en accord avec la littérature ^[21,23,24]. Cette cinétique lente du BHT peut s'expliquer par l'encombrement du noyau aromatique de 2 groupements tertibutyles de part et d'autre de l'unique atome d'hydrogène phénolique, le rendant moins accessible au radical DPPH. Toutefois, au bout d'un temps de réaction suffisamment long (4h minimum), la réaction est considérée finie et la valeur de l'absorbance du DPPH est stable. Concernant l'activité antioxydante de la (+)-catéchine, celle-ci est entre 3 et 4 fois supérieure à celles du BHT et du trolox. La (+)-catéchine contient en effet 4 atomes d'hydrogènes phénoliques, deux en position *méta* et deux en position *ortho*, tous potentiellement impliqués dans l'activité antiradicalaire. La position *méta* des groupements diphenol induit une activité antiradicalaire plus faible que dans le cas de diphenols *ortho* grâce à la stabilisation du radical aryloxy par liaison hydrogène ^[25]. Ainsi, l'activité antioxydante de la (+)-catéchine n'est pas 4 fois supérieure à celle du BHT et du Trolox comme pourrai laisser supposer le nombre d'atomes d'hydrogènes.

Tests biologiques : Les tests par diffusion en cavité permettent une évaluation qualitative et semi-quantitative de l'activité d'un composé par observation d'un halo d'inhibition de croissance et la mesure de son diamètre. Les extraits méthanoliques des feuilles et des écorces de *Qualea rosea* ont été sélectionnés lors d'un screening pour leur activité antifongique sur le champignon lignivore *Gloeophyllum trabeum*, avec un diamètre d'inhibition de 30 mm. Ces extraits ont également montré une activité sur le champignon dermatophyte *Trychophyton rubrum* (inhibition de Ø15 mm) et sur *Candida parapsilosis* (inhibition de Ø10 mm) lors de tests biologiques à l'université de Brasilia. L'utilisation de *G. trabeum* pour l'isolement bioguidé permet *a priori* de sélectionner les fractions qui seront actives également sur les champignons dermatophytes, et ainsi d'orienter l'isolement au cours du processus bioguidé. Ceci permet donc de faire les tests biologiques sur place en Guyane, sans avoir à effectuer les tests à Brasilia. Il faudra faire un test final sur les champignons dermatophytes avec une molécule éventuellement isolée afin de confirmer la conservation de l'activité. Toutefois, la souche de *G. trabeum* utilisée n'a pas apporté entière satisfaction car sa croissance et sa résistance aux pollutions est faible, voir médiocre.

Bio-autographie : L'ensemencement du milieu de culture par dépôt de carrés de mycélium permet une incubation et un développement de *G. trabeum* normal et satisfaisant sur le milieu de culture. Par contre, la croissance sur la plaque CCM est inhomogène et les taches d'inhibition de croissance peu interprétables. Cette inhomogénéité est probablement due à la désactivation de la plaque par de la triéthylamine, composé basique s'adsorbant fortement à la silice et peu compatible avec le développement du champignon. L'interprétation est donc difficile et ne permet pas de conclure sur l'activité d'une tache.

Tests de synergie : L'expérience pour mettre en évidence d'une synergie d'action entre un biocide, l'acide épéruique, et un antioxydant, le BHT ou la (+)-catéchine, a donné des résultats encourageants mais insuffisants. Le tableau ci-dessous met en avant une activité lors d'un co-dépôt, on peut donc supposer qu'il y a une synergie positive dans ce cas. Il faut noter également que les antioxydants choisis ne présentent pas d'activité antifongique dans les concentrations utilisées.

Dépôt	Diamètre (mm)
acide épéruique seul	-
BHT seul	-
(+)-catéchine seule	-
co-dépôt Ac. épéruique + BHT	10
co-dépôt Ac. épéruique + (+)-catéchine	11
Ac. épéruique + BHT à 1 cm	-
Ac. Epéruique + (+)-catéchine à 1 cm	-

Toutefois certaines réserves peuvent être émises, la croissance de *G. trabeum* n'étant pas satisfaisante les résultats ne doivent pas être interprétés *stricto sensu*. D'autres types de tests biologiques sont à envisager, en particulier par incorporation au milieu de culture des substances à tester et en mesurant l'index d'activité antifongique. Ce test a déjà été utilisé par N. Amusant ^[15] pour évaluer l'activité antifongique de l'acide épéruique sur *Coriolus versicolor*, mais il présente l'inconvénient d'être consommateur de produits et donc difficile à mettre en œuvre sur des composés isolés.

Conclusion générale

Au cours de ce stage, l'évaluation de la capacité antioxydante de la (+)-catéchine, du BHT et du Trolox a pu être effectuée à l'aide d'un système analytique HPLC modifié. Les résultats trouvés sont en accord avec la littérature et nous pourront évaluer prochainement l'activité antioxydante de composés au laboratoire L3MA. Une autre méthode de mesure est envisagée, à savoir l'analyse TEAC, ce qui permettra de compléter les informations obtenues avec l'analyse au DPPH. Ces analyses sont en étroit rapport avec les tests de synergies effectués, où l'on attend une variation du diamètre du halo d'inhibition en fonction l'activité antioxydante du composé ajouté au biocide. Ces tests de synergie ont donné des résultats encourageants, la synergie d'action dans l'activité antifongique de composés d'origine naturelle pourrait être mise en évidence *in vitro*. A l'avenir, les futurs résultats devraient faire l'objet d'une publication en occurrence à celle de P. Schultz.

L'isolement bioguidé d'une nouvelle biomolécule pour le traitement d'affections dermatologiques humaines n'a pu être effectué. La difficulté du problème résidait surtout dans la forte polarité des extraits méthanoliques des feuilles et des écorces rendant toutes techniques préparatives sur gel de silice irréalisables. L'isolement par HPLC préparative a donné de meilleurs résultats, sans pour autant conduire à l'isolement d'une molécule active ; les extraits étant très riches en composés de structures vraisemblablement voisines et donc difficiles à séparer.

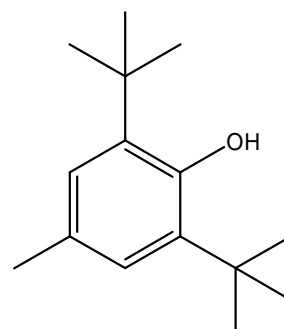
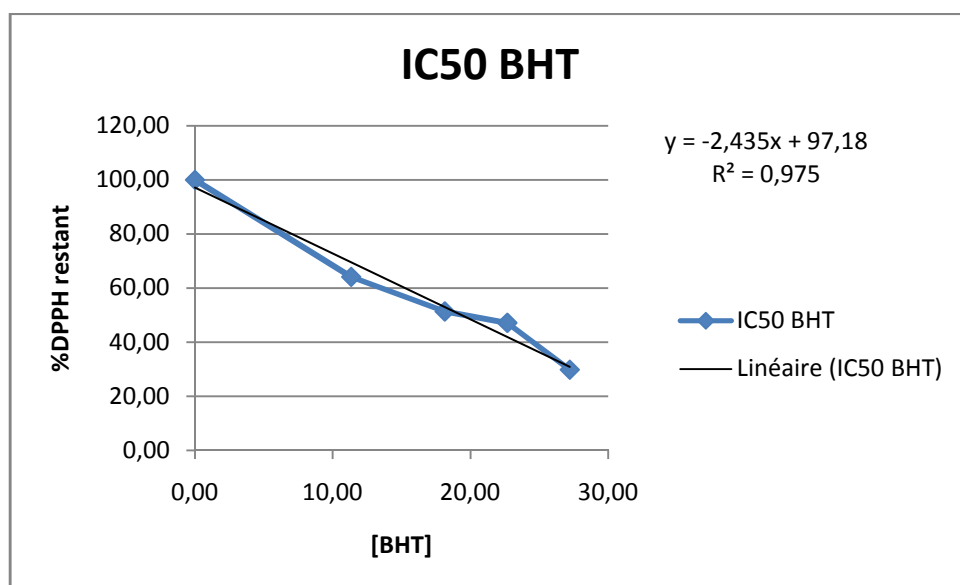
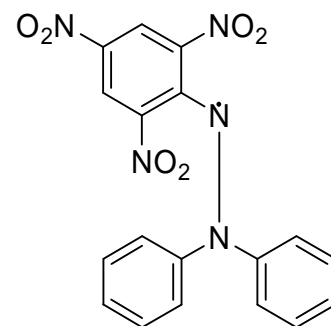
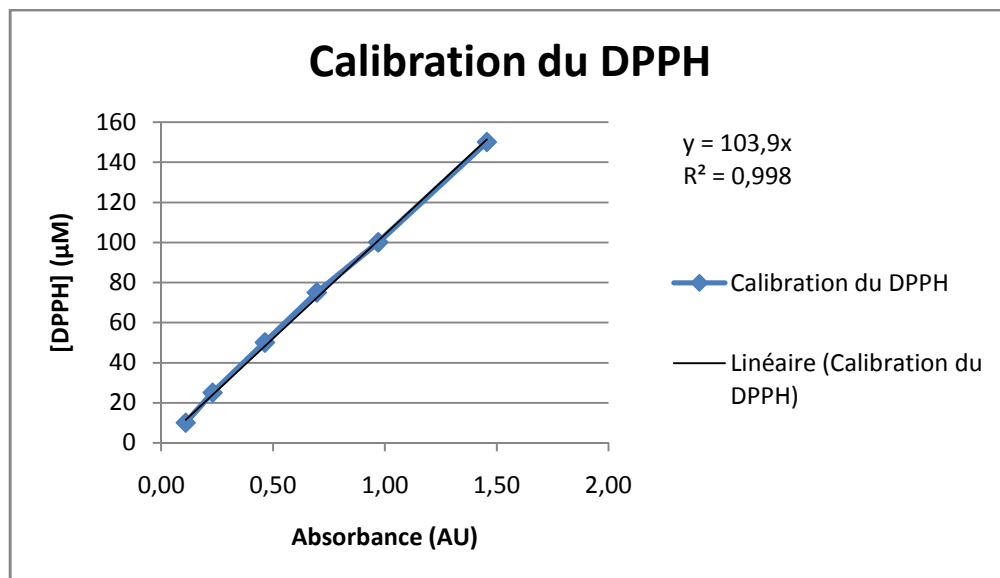
Ce stage m'a permis d'acquérir une bonne maîtrise des outils chimiques pour l'isolement de composés bioactifs, notamment par HPLC, mais également des compétences en microbiologie et en botanique. Il devrait se poursuivre d'un travail de thèse en cotutelle avec l'université de Brasilia.

REFERENCES

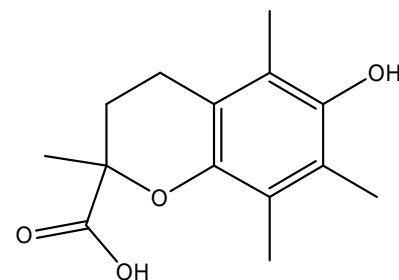
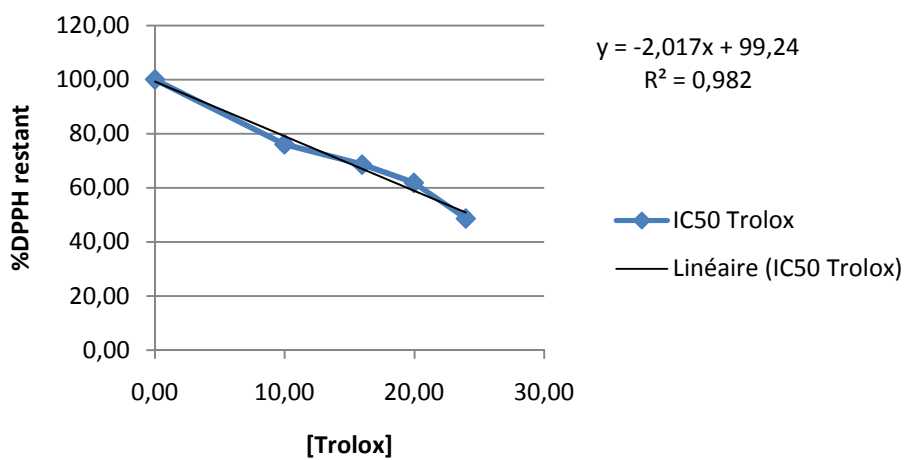
- (1) M.M.Y. Chan *et al*, Biochem. Pharmacol, **63**, 99-104 (2002)
- (2) M.C.S. Cruz *et al*, J. Ethnopharmacol., **111**, 409-412 (2007)
- (3) B Galván *et al*, Rev. Iberoam. Micol, **23**, 12-15 (2006)
- (4) P. Venkatesan *et al*, Dermatol. Ther, **18**, 44-57 (2006)
- (5) E. Mellado *et al*, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin, **20**, 523-530 (2002)
- (6) D.A. Matta *et al*, Diagnostic Microbiol. Infect. Dis, **57**, 399-404 (2007)
- (7) M.M. Canuto *et al*, Lancet Infect. Dis, **2**, 550-563 (2002)
- (8) M.T. Baixench *et al*, J. Antimicrob. Chemother, **59**, 1076-1083 (2007)
- (9) T.C. White *et al*, Clin. Microbiol. Review, **11**, 382-402 (1998)
- (10) P. Wojtaszek, Biochem. J., **322**, 681-692 (1997)
- (11) L.A. Gurgel, J. Ethnopharmacol, **97**, 409-412 (2005)
- (12) A.M.S. Rodrigues, F.M. Silva, P.N.E.T. Theodoro, L.S. Espindola, D. Stien, D. “Activity of Amazonian plant extracts against human fungal pathogens” *ZingConference on Natural Products Chemistry*, du 10 au 13 janvier 2008 à Antigua
- (13) P. Schultz & D. D. Nicholas, Phytochemistry, **54**, 47-52 (2000)
- (14) S. Backa *et al*, Holzforschung, **47**, 181-187 (1993)
- (15) N. Amusan *et al*, Holz als Roch, **65**, 23-28 (2007)
- (16) T.S.M. Grandi *et al*, Acta Bot Bras, **3**, 185-192 (1989)
- (17) A.L.M. Nasser *et al*, Chromatographia, **64**, 695-699 (2006)
- (18) C.A. Hiruma-Lima *et al*, J. Ethnopharmacol, **104**, 207-214 (2006)
- (19) V. Munoz *et al*, J. Ethnopharmacol, **69**, 127-137 (2000)
- (20) S. Mori *et al*, “Guide to the vascular plants of central French Guiana. Part 1. Pteridophytes, gymnosperms, and monocotyledons”. Mem. New York Bot. Gard. 76: 1-422 (1997)
- (21) W. Brand-Williams & M. E. Cuvelier, Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie, **28**, 25-30 (1994)
- (22) A.F. Teixeira, “Metabólicos secundarios de frutos da *Virola molissima* Warb: neolignanas e atividade antifungica”, 85-86, sao paulo (2007)
- (23) D. Godevac *et al*, Food Chem, **107**, 1692-1700 (2008)
- (24) M. Contini *et al*, Food Chem, **110**, 659-669 (2008)
- (25) J. Pokorny, Major factors affecting the autoxidation in lipids. In: CHAN, H. (Ed.), *Autoxidation of Unsaturated Lipids*. London: Academic Press, 141-206 (1987)

ANNEXE I

Analyses d'activités antioxydantes au DPPH : Courbes de résultats



IC50 Trolox



IC50 Catéchine

