

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université AbouBekr Belkaid – Tlemcen

Faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers

Département de biologie



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



Antibiotiques Antifongiques:
physico-chimie,
synthèse et activité biologique

Laboratoire de Catalyse et de Synthèse en Chimie Organique



THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

En Biologie

Option : Biochimie

par

M^r RAHMOUN Mohammed Nadjib

Thème

Evaluation de l'activité biologique de quelques produits naturels et de synthèse

Thèse soutenue le

devant le jury composé de

Président : Mr Boucherit Kebir Professeur, Centre Universitaire NAAMA

Directrice de thèse : Mme Boucherit-Otmani Zahia Professeur, Université Tlemcen

Co-directeur : Mr Choukchou-Braham Nouredine, Professeur Université Tlemcen

Examineurs : Mme Hassaine Hafida, Maître de conférences A, Université Tlemcen

Mr Marouf Abderrazak Professeur, Centre Universitaire NAAMA

Mr Didier Villemin, Directeur de recherche, Université Caen

Année universitaire 2012-2013

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

Remerciements

Cette thèse a été effectuée dans le laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, Université AbouBekr Belkaid-Tlemcen, sous la direction de Madame Boucherit-Otmani Zahia Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma très vive reconnaissance à Madame Boucherit-Otmani Zahia, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, me permettant ainsi d'effectuer ce travail de recherche dans les meilleures conditions. Je la remercie également d'avoir accepté la direction de cette thèse durant laquelle elle m'a offert sa confiance, son soutien et ses conseils. Elle a fait preuve d'une gentillesse particulière. Sans elle rien ne serait là aujourd'hui.

Je remercie également Monsieur Choukchou-Braham Nouredine, Professeur à la faculté des sciences, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, qui m'a soutenu dans la réalisation de ce travail et qui a toujours fait preuve d'une grande disponibilité et d'une gentillesse à tout moment. Je l'assure de ma profonde gratitude et de ma sincère reconnaissance pour l'honneur qu'il m'a fait d'être le co-directeur de cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Boucherit Kebir, Professeur au Centre Universitaire de NAAMA pour son aide précieuse et pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également Madame Hassaine Hafida, Maître de Conférences A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen pour son soutien et pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Marouf Abderrazak Professeur au centre Universitaire de NAAMA, pour l'honneur qu'il m'a fait d'être examinateur de cette thèse.

J'assure de ma profonde gratitude, ainsi que de ma sincère reconnaissance Monsieur Didier Villemin Professeur et Directeur de Recherche de l'ENSICAEN, université de Caen pour le grand honneur qu'il m'a fait d'être examinateur de ce travail.

Je remercie Monsieur Bachir Redouane, Professeur à la faculté des sciences, l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, directeur de laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie également Mme Merzouk Hafida Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen et Saker Meriem Maître de conférences A à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen et Azzi Rachid Maître de conférences B à l'Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen qui ont fait preuve d'une grande disponibilité et d'une gentillesse à mon égard.

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse : les responsables de l'institut INRA Adrar en premier, ainsi que M^r Benabdelah Mohammed et Belhadj-Kibou Zahira pour leur effort dans la synthèse des produits testés.

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

M^{lle} Mezouar Dounia, Benichou ismahane, Mazari Wissem pour leurs soutiens et les moments de détente et de plaisir que nous avons partagés ensemble.

Un grand merci à tous mes amis : Moussaoui djilali, Guembaza chemso, Belkacem nacera ...

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

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

LISTE DES TRAVAUX ET PUBLICATIONS

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

Antimicrobial activities of the henna extract and some synthetic naphthoquinones derivatives

Nadjib Mohammed Rahmoun, Zahia Boucherit-Atmani, Mohammed Benabdallah, Kebir Boucherit, Didier Villemin, Nouredine Choukchou-Braham.

American Journal of Medical and Biological Research.2013; (1), 1, 16-22.

Antifungal activity of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna)

Nadjib Rahmoun, Zahia Boucherit-Otmani, Kebir Boucherit, Mohammed Benabdallah, and Nouredine Choukchou-Braham.

Pharmaceutical Biology, 2013; 51(1): 131–135.

Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives

N.M. Rahmoun, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, M. Benabdallah, D. Villemin, N. Choukchou-Braham.

Médecine et maladies infectieuses 2012; 42, 270–275

COMMUNICATIONS

Rahmoun M.N., Boucherit Z., Boucherit K., Benabdallah M. et Choukchou-Braham N.

Forum sur les Sciences de la Nature, Tlemcen les 14-16 Mai 2012

« *Synthèse et évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de dérivés de la lawsone* »

Rahmoun M. N., Boucherit Z. et Boucherit K.

III^{ème} Journées Scientifiques, Mostaghanem le 11 et 12 Avril 2012.

« *Biological activity of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna)* »

Rahmoun M. N., Boucherit K. et Benabdallah M.

7^{ème} Journées Scientifiques de Microbiologie- Hammamet le 25-27 Novembre 2011- Tunisie

« *Développement d'un procédé d'extraction et d'évaluation de l'activité antibactérienne des feuilles de la plante *Lawsonia inermis** »

Rahmoun M.N., Benabdellah M. et Boucherit K.

Premier congrès international-Santé au Naturel, Mostaghanem le 7-9 décembre 2010

« *Extraction et recherche de l'activité antimicrobienne de la plante *Lawsonia inermis** »

Rahmoun M.N., Benabdellah M., Mostefa-Kara B. et Boucherit K.

Première séminaire international sur l'alimentation et la qualité nutritionnelle, Tlemcen, les 8 et 9 Décembre 2009

« Etude de l'effet cytotoxique de quelques naphthoquinones de synthèse »

Rahmoun M. N., Mostefa-Kara B., Benabdallah M., Choukchou-Braham N. et Boucherit K.

Journée Internationale de Produits Naturels Tlemcen le 20 Mai 2009

« Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles de Lawsonia inermis cultivée dans le sud Algérien ».

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Introduction générale	01
Première partie : Synthèse bibliographique	07
1. La phytothérapie	08
2. Le henné	09
3. La lawsone	11
4. Les quinones et les naphthoquinones	15
5. Les 2-aminopyridines et les 2-pyridones	19
5.1. Les 2-aminopyridines	19
5.2. Les 2-pyridones	21
Deuxième partie : Matériel et méthodes	24
1. Matériel biologique	25
1.1. Matériel végétal	25
1.2. Bactéries	25
1.3. Levures	25
1.4. Moisissures	26
1.5. Globules rouges	26
2. Les dérivés de synthèse	26
2.1. Les naphthoquinones	26
2.2. Les 2-aminopyridines et 2-pyridones	30
3. Méthodes	34
3.1. Préparation des extraits du henné	34
3.2. Extraction de la lawsone à partir du henné	34
3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne	36
3.3.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide	36
3.3.2. Méthode des dilutions	36
a. Méthode des dilutions sur milieu liquide	36
b. Méthode des dilutions sur milieu solide	37
3.4. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures	37
3.5. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des moisissures	38
3.6. Evaluation de la cytotoxicité des dérivés naphthoquinones vis-à-vis des globules rouges	39
3.6.1. Préparation de la suspension érythrocytaire	39
3.6.2. Mesure de la fuite de l'hémoglobine	39

Troisième partie : Résultats et interprétation	40
1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de <i>Lawsonia inermis</i>	41
1.1. Rendements des différentes extractions	41
1.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i>	42
1.3. Evaluation de l'activité antifongique des extraits éthanolique et de la lawsone des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i>	44
2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des dérivés naphthoquinones	46
2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne	46
2.2. Evaluation de l'activité antifongique.....	53
2.2.1. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures	53
2.2.2. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des moisissures	55
3. Etude de la cytotoxicité des dérivés naphthoquinones	57
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des dérivés 2-aminopyridines/ 2-pyridones	61
4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés 2-aminopyridines/ 2-pyridones	61
4.2. Evaluation de l'activité antifongique des dérivés 2-aminopyridines/ 2-pyridones	65
Quatrième partie : Discussion générale	66
Conclusion	77
Références bibliographiques	i

LISTE DES ABREVIATIONS

A	: Absorbance
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
AmB	: Amphotéricine B
ATCC	: American Type Culture Collection
Cip	: Ciprofloxacine
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO	: Diméthyl sulfoxyde
DMF	: Diméthyl formamide
FAO	: Food and Agriculture Organisation
FDA	: Food and Drug Administration
IP	: Institut Pasteur
IR	: Infrarouge
Gent	: Gentamycine
HIV	: Human immunodeficiency virus
HPLC	: High-performance liquid chromatography
MNHN	: Muséum National d'Histoire Naturelle
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCCLS	: National Clinical Committee Laboratory Standards
HNQ	: 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone
L	: Lawsone
NPQs	: Naphtoquinones
NEC	: Nouvelles Entités Chimiques
OCDE	: Organisation de Coopération et de Développement Économiques
PBS	: Phosphate buffered saline
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SCCNFP	: The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products
UFC	: Unité formant colonie

Introduction générale

Dans les pays à faible revenu, une personne sur deux meurt prématurément d'une maladie infectieuse (OMS, 2008).

Encore récemment on pensait que ces dernières seraient maîtrisées grâce à la généralisation des mesures d'hygiène et à l'utilisation des antibiotiques et des vaccins. Les progrès scientifiques et technologiques laissaient même croire à une possible éradication, celle de la variole à la fin des années 1970 par la vaccination généralisée ayant été le symbole. Cet espoir a malheureusement déçu. On assiste à une résurgence des maladies infectieuses et des parasitoses ainsi qu'à l'émergence régulière de nouveaux agents infectieux (Geddes, 2005).

Les faits sont éloquentes, permanence de l'endémie dans les pays en développement et son corollaire, risque de pathologies d'importation dues à la multiplication des voyages intercontinentaux et à la globalisation du commerce, résistance des microbes aux antibiotiques, SIDA et hépatites B et C devenus endémiques, infections d'origine alimentaire, infections acquises en milieu hospitalier, menace de catastrophes économiques dues à la résurgence d'épizooties, risque croissant de transmission à l'homme de zoonoses, impact du réchauffement global de la planète sur les agents infectieux, les réservoirs de ces derniers ainsi que leurs vecteurs.

Il faut donc se rendre à l'évidence quant à la part de responsabilité de l'homme dans cette situation et, surtout, savoir qu'il y aura toujours des maladies infectieuses. Les bactéries, virus, champignons et parasites sont ubiquitaires, ils nous dépassent largement en nombre, en plasticité génomique et en leur capacité d'adaptation rapide. De plus, leur "terrain" est encore méconnu, c'est-à-dire, l'homme et les animaux qui nous entourent, dont le patrimoine génétique détermine la sensibilité ou la résistance à ces agents. En effet, à l'échelle de l'évolution, les maladies infectieuses ne font probablement que commencer (Orth et Sansonetti, 2006).

Heureusement la recherche fondamentale est garante de l'acquisition d'un socle de connaissances dont la qualité et la diversité doivent largement assurer cet état de préparation. Les maladies infectieuses offrent à la recherche fondamentale d'excellents paradigmes d'approches intégrées et transdisciplinaires pour l'étude de processus biologiques complexes. Seule la recherche fondamentale est capable de générer l'innovation dans les domaines de l'épidémiologie, du diagnostic et de la thérapeutique avec de nouveaux agents et de la vaccination.

Avec une mortalité de près de 15 millions chaque année, les maladies infectieuses et parasitaires ont été responsables de 26,3 % des décès causés par l'ensemble des maladies et des traumatismes survenant sur la planète (OMS, 2002). Les principaux types d'infections responsables de décès sont les infections respiratoires aiguës (3,9 millions par an), le SIDA (2,9 millions par an), les maladies diarrhéiques (2 millions par an), la tuberculose (1,6 million par an) et le paludisme (1,1 million par an). La rougeole cause encore 745 000 décès en dépit de l'existence d'un vaccin efficace, bien toléré et abordable. Plus de 90% des maladies infectieuses humaines surviennent dans les pays en développement, particulièrement chez les enfants, dans les régions les plus déshéritées, où l'hygiène générale et individuelle est insuffisante et où les politiques de prévention sont inexistantes, inadaptées ou insuffisamment financées. Cependant, le développement industriel génère aussi dans nos sociétés de nouvelles conditions d'émergence infectieuse, comme les infections alimentaires par des agents prenant avantage de la chaîne du froid ou de l'industrialisation de la chaîne alimentaire, les infections nosocomiales et la multi-résistance survenant dans le milieu hospitalier, les infections opportunistes chez les patients immuno-compromis et les infections des voyageurs. Bien que de moindre prévalence dans les pays industrialisés, les maladies infectieuses y sont encore responsables d'une mortalité non négligeable. En France, toutes causes confondues, 66 000 décès annuels peuvent être attribués à des maladies infectieuses, soit 12% de la totalité des décès (Pequignot *et coll.*, 2002).

De plus, un pourcentage important de cancers (de 15 à 20 %) est causé par un agent infectieux, viral ou bactérien, causant chaque année au moins 1,7 million de nouveaux cas et plus d'un million de décès. Il est par ailleurs probable que des infections sont directement ou indirectement impliquées dans l'étiologie de maladies touchant une large fraction de la population du globe, telles que l'athérosclérose, le diabète et l'allergie (Orth et Sansonetti, 2006).

Les décès et morbidités liés aux maladies infectieuses humaines ont un coût économique et social considérable et un effet sur la croissance qui peuvent être évalués globalement en incorporant les coûts directs imputables aux soins médicaux et les coûts indirects imputables à la réduction d'années d'espérance de vie et de productivité due à des morts prématurées ou à des complications chroniques. Ce poids porte essentiellement sur les populations les plus défavorisées de la planète (Orth et Sansonetti, 2006).

Deux rapports princeps publiés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) analysent

l'impact des maladies infectieuses sur le développement et font un bilan des efforts consentis pour développer des outils de diagnostic, de traitement et de prévention [(OMS, 2002) ; (OCDE, 2002)]. Il y apparait clairement que les difficultés pour développer des remèdes contre les principales pandémies (SIDA, paludisme, tuberculose, infections respiratoires aiguës et maladies diarrhéiques) sont certes dues à des obstacles techniques et scientifiques, mais aussi aux conditions économiques et à des volontés nationales et internationales insuffisantes.

La recherche industrielle dans le domaine des nouveaux antibiotiques et des vaccins a décliné de façon inquiétante. Seules cinq compagnies produisent 90% des vaccins et le nombre de compagnies impliquées dans le développement d'antibiotiques diminue dangereusement. En 2003, 43 nouveaux médicaments ont été certifiés par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis. Parmi ceux-ci, on comptait seulement quatre nouveaux agents anti-infectieux et un vaccin. Cette crise exige que le monde industriel et le monde académique joignent leurs forces pour identifier de nouvelles cibles et les molécules innovantes correspondantes (Orth et Sansonetti, 2006).

Plusieurs stratégies pour lutter contre ce défi peuvent être mises en œuvre, incluant la conception des versions améliorées de classes d'antimicrobiens déjà connues ou la conception de nouvelles classes de molécules, en se basant sur le potentiel démesuré des produits naturels qui sont présents dans l'ensemble du monde vivant (bactéries, champignons, animaux, végétaux). Ce sont des métabolites secondaires généralement, produites en réponse à des stimuli externes tels que les changements nutritionnels. Leurs fonctions de médiateurs de la communication chimique entre espèces, attraction (coopération) ou défense (antagonisme), expliquent l'utilisation très précoce par l'homme des plantes à des fins thérapeutiques (plantes médicinales) ou industrielles (colorants naturels, plantes à parfums). Ils sont largement reconnus dans l'industrie pharmaceutique pour leur remarquable diversité structurale et la large gamme d'activité pharmacologique. Ces produits constituent toujours, à l'heure actuelle, la source d'inspiration majeure des chimistes pour la conception de nouveaux médicaments (antibiotiques, anticancéreux, antiviraux...) ou de nouveaux pesticides (insecticides, antifongiques...), à la fois spécifiques et respectueux de l'environnement [(Vermerris et Nicholson, 2006) ; (Epifano *et coll.*, 2007)].

L'inspection du taux d'approbation des Nouvelles Entités Chimiques (NEC) a montré que le domaine des produits naturels a continué de produire ou a été impliqué dans environ 50 % de toutes les petites molécules produites au cours des années 2000-2006 et que pendant ce temps,

un nombre important de NEC (83 de 264) sont des produits biologiques (Newman et Cragg, 2007). L'impact des produits naturels sur la découverte de médicaments restera considérable pour les années à venir contre les maladies comme les infections microbiennes et parasitaires [(Butler, 2008) ; (Pinto et De Castro, 2009)].

Une prise de conscience croissante du potentiel des produits naturels pourra être menée pour l'élaboration de précieux nouveaux médicaments contre ces maladies (Tagboto et Townson, 2001). Cependant, la complexité chimique de beaucoup de produits issus de la nature fait qu'actuellement le développement de la chimie organique s'associe à la chimie des produits naturels dans lesquels les techniques d'extraction, séparation, et de détermination de la structure et particulièrement de synthèse ont été développées pour comprendre la variation structurale des produits naturels afin d'identifier les composés biologiquement actifs pour l'usage médicinal.

La synthèse organique est certainement le domaine clé de la chimie médicinale et pharmaceutique. Son nom est en fait équivoque aujourd'hui, car si le but ultime est de créer une molécule organique, la démarche implique toutes les facettes de la chimie théorique, physique, analytique et inorganique. Toutes concourent à l'élaboration d'un enchaînement carbone-carbone fonctionnalisé, avec toutes les géométries locales souhaitées par le chimiste. La synthèse est toujours en pleine évolution comme elle l'était au lendemain de la seconde guerre mondiale, mais selon des axes qui ont été profondément modifiés comme l'emploi de nouveaux solvants et milieux réactionnels, de supports solides menant à la chimie combinatoire, le développement exponentiel des organométalliques, la catalyse homogène et la synthèse ou l'hémi-synthèse de nouveaux médicaments ont évolué de façon prédominante. Récemment, les réactions de la synthèse organique dans des conditions écologiques, dans l'eau ou un solvant bénin comme l'éthanol, ont reçu une attention considérable, en raison de leur acceptabilité environnementale, abondance et le faible coût [(Villemin et Nechab, 2000) ; (Yadav *et coll.*, 2007)].

La chimie des composés azotés a été la source privilégiée de différentes recherches. L'atome d'azote est présent dans de nombreuses molécules naturelles d'intérêt pharmacologique. Les pyridines et les 2-pyridones constituent des classes importantes de composés hétérocycliques azotés, issues de plusieurs composés naturels (Stafford *et coll.*, 1972).

Par ailleurs, les quinones, particulièrement les 1,4-naphtoquinones (1,4-NPQs), sont des métabolites secondaires très répandues chez les plantes et les micro-organismes.

Elles sont présentes dans diverses familles de plantes et servent aussi comme liens vitaux dans la chaîne de transport d'électrons de la voie métabolique, participant ainsi dans plusieurs processus biologiques oxydatifs [(Powis, 1987) ; (O'Brien, 1991)]. L'intérêt des 1,4-NPQs n'est pas limité à la chimie des colorants; un large spectre d'activités biologiques a été décrit pour ces composés, y compris des activités antitumorales, anti-inflammatoires, antiparasitaires, cytotoxiques...etc [(O'Brien, 1991) ; (Kirkland et Marzin, 2003) ; (Chung *et coll.*, 2007)].

Les composés chimiques naphthoquinoniques peuvent aussi être préparés synthétiquement et sont généralement produits par l'industrie chimique comme colorants organiques (Villemin *et coll.*, 2010). La caractéristique fondamentale de la chimie des quinones est leur facilité de réduction et par conséquent, leur capacité d'agir comme des oxydants ou comme agents de déshydrogénation. Cette propriété d'oxydo-réduction est régie par la formation d'un système pleinement aromatique [(Abreu *et coll.*, 2002) ; (Hillard *et coll.*, 2008)]. En médecine traditionnelle, les plantes contenant des naphthoquinones ont été souvent employées pour le traitement de diverses maladies [(Bastien, 1983) ; (Arenas, 1987)]. Ces composés sont employés commercialement pour l'usage clinique tel que la famille des ansamycins (Bryskier, 1999), la marinone et la debromomarinone (Zhang et Arnold, 2005).

La lawsone, est une naphthoquinone qui a attiré récemment beaucoup d'attention puisqu'elle est l'une des teintures capillaires les plus utilisées dans le monde. C'est l'agent bioactif responsable des propriétés colorantes des feuilles de *Lawsonia inermis* appelée couramment "le Henné". C'est un arbuste très populaire en Algérie qui appartient à la famille des Lythracées (Wichtl, 1999). Elle est très utilisée comme colorant naturel des cheveux, des mains et des pieds depuis l'antiquité. Le henné est aussi connu en médecine traditionnelle pour ses vertus pharmacologiques variés (Ben M'Rad *et coll.*, 2004).

C'est pourquoi, nous avons entrepris cette étude qui a porté sur :

- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des feuilles de henné et de son principe actif, la lawsone.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne de 18 dérivés naphthoquinones et 21 dérivés 2-pyridones et 2-aminopyridines obtenus par synthèse chimique.
- L'étude de la cytotoxicité de la lawsone et des dérivés naphthoquinones vis-à-vis des globules rouges humains.

Première partie
Synthèse bibliographique

1. La phytothérapie

Les remèdes utilisés dans la médecine traditionnelle constituent une source importante encore largement mal explorées pour la création et le développement de nouveaux médicaments. Ces derniers pourraient aider à surmonter les problèmes croissants de la résistance et de la toxicité des antibiotiques commerciaux actuellement disponibles. L'usage des plantes médicinales joue toujours un rôle essentiel pour couvrir les besoins de santé de base dans les pays en développement (Spellberge *et coll.*, 2008). Par conséquent, il est d'un grand intérêt de procéder à un examen préalable de ces plantes pour valider leur utilisation dans la médecine traditionnelle en matière d'extraction, isolement et caractérisation de leurs constituants.

Parmi les substances naturelles utilisées dans la médication, les métabolites secondaires sont énormément utilisés en thérapeutique. Les métabolites secondaires sont des molécules qui ont une répartition limitée dans l'organisme de la plante et sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Ces composés procurent des propriétés curatives très appréciables (Epifano *et coll.*, 2007).

L'intérêt attribué à ces produits naturels n'a pas été purement académique mais plutôt été inspiré à partir des nombreuses utilisations comme des colorants, arômes, drogues, colles et cires (Croteau *et coll.*, 2000). Ces métabolites secondaires sont classés en plusieurs composants chimiques dont les plus répandus sont les terpènes, les alcaloïdes, et les polyphénols [(Cuendet, 1999) ; (Vermerris et Nicholson, 2006)].

Les composés phénoliques ont fait l'objet de nombreuses recherches. Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme inhibiteurs enzymatiques, anti radicalaires, antimicrobiens, anticancéreux...etc [(El-demerdash *et coll.*, 2005) ; (Gehin *et coll.*, 2006) ; (Sivapriya et Srinivas, 2007)]. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits et graines) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

Un grand nombre de plantes médicinales sont utilisées pour traiter les infections microbiennes, particulièrement dans les zones rurales de l'Algérie, où la médecine traditionnelle demeure la source majeure dans le traitement des affections mineures. A ce jour, très peu de recherches ont été effectuées pour étudier l'effet antimicrobien de ces plantes médicinales traditionnelles [(Akroum *et coll.*, 2009) ; (Rahmoun *et coll.*, 2010)].

2. Le henné

La plante *Lawsonia inermis* Linn. (Photo N° 01), connue communément sous le nom vernaculaire d'el hanna ou henné, est une plante traditionnelle qui est largement utilisée non seulement comme agent ayant des propriétés cosmétiques pour teindre les cheveux, la peau, les ongles etc..., mais également comme agent efficace ayant des propriétés médicinales intéressantes [(Sharma, 1990) ; (Gupta *et coll.*, 1992)]. C'est un arbuste gracieux de 2 à 6 m de hauteur. Les feuilles desséchées sont légèrement froissées, de 2 à 4 cm de longueur, glabres, entières, à nervures pennées, le limbe est ovale, lancéolé, terminé par une petite pointe, à bord révoilé à la face inférieure. Les jeunes branches inermes, non épineuses sur les arbres âgés portent des feuilles opposées à pétiole court (Wichtl, 1999). Les feuilles sont odoriférantes de saveur non caractéristique, un peu astringente et amère tandis que les fleurs sont odoriférantes de couleur blanche ou rose pâle, disposées en grandes panicules (Paul, 2001).

Les études phytochimiques de cette plante ont montré la présence des constituants suivants: flavonoïdes, quinoïdes, dérivés du naphthalène, lutéoline, bétuline, acide gallique lupeol, coumarines, xanthones et glucosides phénoliques [(Agarwal *et coll.*, 1959) ; (Bhardwaj *et coll.*, 1976) ; (Atal *et coll.*, 1978)]. Le henné contient 25-33 % de matière hydrosoluble. L'agent bioactif responsable des propriétés colorantes de la plante est la lawsone qui fut isolée et identifiée pour la première fois par Tommasi (Badri et Burkinshaw, 1993). Deux triterpènes pentacycliques, à savoir, 3 β , 30-dihydroxylup-20 (29)-ène (hennadiol) et 3 β , 30-dihydroxylupane ont été isolés à partir de l'écorce (Chakrabartty *et coll.*, 1982).

En botanique, le henné est classé comme suit:

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



A : La plante entière; B : les feuilles ; C : les graines; D : les fleurs

Photo 01: Les différentes parties de la plante *Lawsonia inermis*.

Une autre étude a montré que l'huile essentielle de la plante contient la cinéole à 58,6%, l' α -pinène à 18,2% et le *p*-cymène à 14,7% (Akiola *et coll.*, 2007).

Lawsonia inermis est la plante la plus connue de la famille des Lythracées. Selon la tradition, les traitements cutanés sont de loin les plus connus et les plus répandus pour la plante de henné. Les feuilles sont utilisées sous forme de pâte ou décoction contre les furoncles, l'ecchymose et l'inflammation de la peau (Bhuvaneswari *et coll.*, 2002). Elles sont aussi utilisées sous forme de pâte par application externe pour le soulagement des maux de tête et frottées sur la plante des pieds pour traiter brûlures bénignes (Bhuvaneswari *et coll.*, 2002). De plus, la décoction de feuilles est utilisée par gargarisme pour le mal de gorge. L'extrait brute éthanolique des feuilles de la plante montre des propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti inflammatoires chez les rats (Ali *et coll.*, 1995). Le henné est aussi utilisé pour traiter la teigne (Wren, 1988). Certaines études ont permis de mettre en évidence la présence d'une activité antibactérienne de l'extrait éthanolique. Cette activité est attribuée à la classe de composés naphtoquinones, en particulier la lawsone (Mostéfa-kara *et coll.*, 2010).

En plus de toutes ces activités biologiques citées, plusieurs autres recherches ont montré que le henné possède d'autres propriétés telles que l'activité antifongique (Rahmoun *et coll.*, 2012), antiparasitaire, antiseptique, contre la gale (Ali *et coll.*, 1995), anesthésique, antihémorragiques, inhibitrice de certaines peptidases (Ahmed *et coll.*, 2000) ; (Yogisha *et coll.*, 2002)].

Récemment, une évaluation biologique a été entreprise sur l'extrait brut de henné. Les résultats préliminaires ont montré que cette plante présente une activité hypoglycémiant (Gbolade, 2009).

3. La lawsone

La lawsone ou 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone (HNQ), est un composé phénolique qui est produit à l'état naturel par plusieurs plantes. C'est une molécule qui dérive de la famille des naphtoquinones et qui représente le constituant bioactif principal des feuilles de henné (*Lawsonia inermis*). C'est le composant responsable des propriétés colorantes de cette plante. Elle est présente dans les feuilles séchées à un rendement d'environ 0,5-1,5% (Kirkland et Marzin, 2003).

La lawsone (figure N° 02) est une molécule qui contient 10 carbones, 6 hydrogènes et 3 oxygènes (C₁₀H₆O₃), donnant un poids moléculaire total de 174,15g/ mol. Elle a deux atomes d'oxygène qui sont attachés aux carbones du naphtalène dans les positions 1 et 4 du noyau naphtoquinone, et un groupe hydroxyle (–OH) présent à la position 2. La lawsone pure est une poudre orange, insoluble dans l'eau, soluble dans le diméthyl formamide (DMF) à 5%, avec un point de fusion supérieur à 194°C et à maximum d'absorption optique à 452 nm (SCCNFP), 2004.

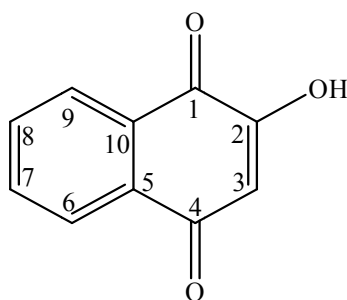


Figure N° 02: La lawsone ou 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone (HNQ); (SCCNFP., 2004)

La présence de la lawsone est mise en évidence dans plusieurs plantes telles que *Lawsonia inermis*, *Ammannia baccifera* Linn (Khare, 2007), *Juglans regia* (Grotzinger et Campbell, 1972), *Impatiens parviflora* (Babula *et coll.*, 2006) et dans *Impatiens noli-tangere* L. (Hatcher, 2003). La lawsone s'accumule dans les feuilles de la plante *Lawsonia inermis* (Bakkaliet *coll.*, 1997).

Plusieurs travaux ont montré que l'acide D-shikimique constitue le précurseur direct de la partie aromatique du noyau naphtoquinone et des trois atomes non carboxyliques du glutamate [(Robins *et coll.*, 1970) ; (Grotzinger et Campbell, 1974)].

L'étape initiale de la construction de cycle B du noyau est la condensation du shikimate avec le complexe thiamine pyrophosphate du semialdéhyde succinyl (Guérin *et coll.*, 1970). Cet anion pourrait être formé par la première enzyme du complexe kétoglutarate déshydrogénase du cycle de Krebs.

La biosynthèse de la lawsone et de son isomère de position la juglone (5-hydroxynaphtho-1,4-quinone) s'effectue par l'intermédiaire de l'acide 1,4-dihydroxy-2-naphthoïque, vraisemblablement par une séquence oxydative dans laquelle l'hydroxyle remplace la fonction carboxylique (figure N° 03) [(Grotzinger et Campbell, 1974) ; (Velíšek *et coll.*, 2007)].

La lawsone est une molécule qui est employée comme un agent antioxydant de coloration des cheveux, teignant à une concentration maximale de 1,5% dans le produit cosmétique fini (SCCNFP, 2004). Cependant, contrairement à d'autres colorants tels que les colorants métalliques qui forment un enduit, la liaison de la lawsone aux protéines (peau, cheveux, ongles, etc...) permet de donner la couleur dans des solutions acides (Dweck, 2002). Cette fixation se réalise selon un mécanisme qui suggère qu'il y a principalement création d'une liaison entre le carbone 3 de la lawsone et les fonctions libres -SH ou -NH₂ de la kératine (Jelly *et coll.*, 2008).

Les propriétés thérapeutiques des naphthoquinones ainsi que celles de la lawsone ont fait l'objet de plusieurs recherches d'évaluation de leurs activités biologiques. Plusieurs données expérimentales ont permis de mettre en évidence pour la lawsone certaines propriétés biologiques telles que l'activité antibactérienne, antifongique et antispasmodique [(Hoffmann *et coll.*, 1947) ; (Bakkali *et coll.*, 1997) ; (Shaukat *et coll.*, 2009)].

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

L'absorption de la lawsone par la peau a fait l'objet d'une étude par le bureau des Sciences pharmaceutiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). Il ressort de cette étude que la lawsone contenue dans le henné diffuse dans la peau selon la concentration utilisée et le temps d'application. Il a été montré également que l'absorption de la lawsone par la peau est à l'origine de dommages plus ou moins sévères à des doses supérieures ou égales à 300 mg/kg (Jallad et Espada-Jallad, 2008).

Les différents travaux de recherches qui sont décrits ci-dessus montrent l'intérêt particulier de la lawsone qui appartient à la famille des naphthoquinones. Ces derniers, sont isolés à partir des plantes, des bactéries et des champignons et interviennent dans plusieurs processus vitaux. Nous nous sommes donc intéressés à cette classe de composés afin de développer de nouveaux analogues structuraux de la lawsone.

4. Les quinones et les naphthoquinones

Les composés chimiques ayant la structure quinone (figure N° 04) sont une classe de composés aromatiques largement répandus dans les plantes, en particulier la forme cristalline jaune. C'est une classe de composés organiques cycliques qui contient deux groupes carbonyles, C = O, adjacents ou séparés par un groupe vinylène, -CH = CH-, pour former un cycle insaturé à six sommets. Dans quelques quinones, les groupes carbonyles sont situés différemment dans le noyau. Le terme quinone dénote également le composé spécifique *para*-(*p*-) benzoquinone (C₆H₄O₂) (Vaysse, 1990).

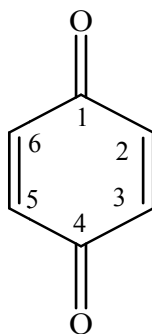


Figure N° 04: Le noyau quinone

Les quinones constituent un groupe d'environ 400 colorants allant du jaune, rouge, brun et au noir qui se retrouvent chez les micro-organismes, les algues, les lichens, les champignons supérieurs, les plantes et même chez quelques insectes [(Otten et Rosazzag, 1983) ; (Velíšek *et coll.*, 2007)].

L'exemple le plus représentatif dans la famille des quinones est le coenzyme Q représenté par l'ubiquinone. Ce coenzyme joue un rôle important chez les animaux, les plantes et les micro-organismes par sa faculté à transporter les électrons. Beaucoup de quinones naturelles sont sous forme d'oligomères constituées de deux ou plusieurs noyaux (Dweck *et coll.*, 2002).

Les naphtoquinones (figure N° 05) sont des quinones dérivant du naphthalène. Elles contiennent 10 carbones, 6 hydrogènes et 2 oxygènes ($C_{10}H_6O_2$), donnant un poids moléculaire total de 158,15 g/ mol avec un point de fusion de l'ordre de 126 °C. Elle a deux atomes d'oxygène qui sont attachés aux carbones du naphthalène dans les positions 1 et 4 du noyau naphtoquinone. Elles sont insolubles dans l'eau froide, légèrement solubles dans l'éther de pétrole et plus solubles dans les solvants organiques polaires (Kumagai *et coll.*, 2011).

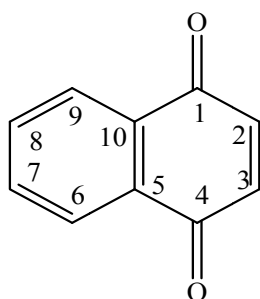


Figure N° 05: La structure 1,4-naphtoquinone

Ce sont toujours des 1,4-naphtoquinones, très rarement des 1,2-naphtoquinones dont les substituants les plus fréquents sont des hydroxyles et des méthyles, en 2 et/ou sur le noyau aromatique (Bruneton, 1993). Pigments jaunes ou orangés essentiellement chez les végétaux, les naphtoquinones font partie des quinones caractéristiques de certaines familles d'Angiospermes. L'exemple le plus significatif de la famille des naphtoquinones est la vitamine K, connue pour ses propriétés antihémorragiques.

Les naphtoquinones sont considérées comme des structures privilégiées en chimie médicinale en raison de leurs activités biologiques et les propriétés structurales (Constantino et Barlocco, 2006). Elles sont présentes dans diverses familles de plantes et servent aussi de liens vitaux dans la chaîne de transport d'électrons dans la voie métabolique et participent à plusieurs processus biologiques oxydatifs [(O'Brien, 1991) ; (Powis, 1987)]. La caractéristique fondamentale des quinones en chimie est leur facilité de réduction et, par conséquent, leur capacité d'agir comme des oxydants ou agents déshydrogénant. Cette propriété d'oxydo-réduction est pilotée par la formation d'un système aromatique [(Abreu *et coll.*, 2002) ; (Hillard *et coll.*, 2008)].

En médecine traditionnelle, les plantes contenant des naphtoquinones ont été souvent employées pour le traitement de diverses maladies [(Arenas, 1987) ; (Bastien, 1983)] et plusieurs quinonoïdes isolées des plantes médicinales traditionnelles sont étudiées pour leurs propriétés anticancéreuses (Hazra *et coll.*, 2004).

Le cycle redox des quinones peut être initié soit par une réduction d'un ou des deux électrons. La réduction d'électron est catalysée par la NADPH-cytochrome P₄₅₀ réductase et donne des semiquinones instables. Les quinones transfèrent les électrons à l'oxygène (O₂) pour revenir à leur formation initiale quinoïdale, générant ainsi un radical d'anion superoxyde (⁻O₂). Le superoxyde peut être converti en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) via une réaction catalysée par le superoxyde dismutase, suivi par la formation d'un radical hydroxyle ([•]HO) par la réduction du peroxyde catalysée par le fer via la réaction de Fenton. Toutes ces espèces très réactives peuvent agir directement sur l'ADN ou autres macromolécules cellulaires, tels que des lipides et des protéines, entraînant des dommages cellulaires. Cette réaction conduit au transfert des électrons vers l'oxygène (Vilamil-Fernandez *et coll.*, 2004).

La réduction des deux électrons des quinones peut être aussi catalysée par le NADPH [quinone-accepteur] oxydoréductase (NQO1, DT-diaphorase, EC 1.6.99.2)(Ross et Siegel, 2004) et génère des hydroquinones (QH₂). Cette enzyme réduit les formes toxiques des quinones, réactifs et instables, contournant la création d'intermédiaires toxiques (ex: le

radicale semiquinone) et épargnant la cellule de la formation des espèces réactives d'oxygène. La réduction des deux électrons d'une quinone permet une détoxification ou l'activation du stress oxydatif qui dépend du taux d'auto-oxydation de l'hydroquinone formé (Munday *et coll.*, 2007). Si ce taux est faible dans les conditions physiologiques, la conjugaison peut se produire avant l'oxydation. En conséquence, la réduction des deux électrons va conduire à la désintoxication et une augmentation de l'activité du NQO1.

Si, toutefois, l'hydroquinone est rapidement oxydée, seule une fraction mineure peut être conjuguée avant que l'oxydation ne se produise, et la formation de l'hydroquinone constituerait une réaction d'activation. De ce fait, le taux tissulaire accru de NQO1 augmente la toxicité de la quinone (Munday, 2000).

Les quinones sont des oxydants électrophiles et la contribution relative de ces propriétés à la fois à leurs activités thérapeutiques et toxiques est influencée par leur structure chimique, notamment l'introduction des substituants et les caractéristiques du noyau quinone (Monks et Jones, 2002). Deux principaux mécanismes de cytotoxicité des quinones ont été proposés, la stimulation du stress oxydatif et l'alkylation des nucléophiles cellulaires, qui englobent un large éventail de biomolécules (Bolton *et coll.*, 2000). Les espèces réactives d'oxygène peuvent agir directement avec l'ADN, les lipides et les protéines, conduisant à des lésions cellulaires [(Brunmark et Cadenas, 1989) ; (Monks *et coll.*, 1992) ; (Goulart *et coll.*, 2003); (Vilamil-Fernandez *et coll.*, 2004)] et le transfert des électrons vers l'oxygène. Les dommages cellulaires peuvent également se produire par le biais de l'alkylation des protéines essentielles et d'acides nucléiques (Pinto et Castro, 2009).

5. Les 2-aminopyridines et 2-pyridones

Les nombreux travaux réalisés sur les hétérocycles dans les différents domaines font apparaître un intérêt particulier des deux systèmes chimiques simples 2-aminopyridines et 2-pyridones peu étudiées [(Scozzafava et Supuran, 2000) ; (Mont *et coll.*, 2009)]. L'étude des hétérocycles polyfonctionnels a connu un grand développement dû à la mise en évidence de leurs activités pharmacologiques. Les structures hétérocycliques, principalement azotées, se retrouvent dans de nombreux composés (Stafford *et coll.*, 1972). Leur intérêt est double, d'une part ils forment, diversement substitués, le noyau de base de nombreuses substances importantes dans le domaine végétal (alcaloïdes) et thérapeutique (Béthahistine) et d'autre part, leur structure qui est spécifique (Amr et Abdulla, 2006).

Les propriétés particulières de ces composés sont intimement liées à la présence de l'hétéroatome d'azote qui leur confère une vaste panoplie de potentialités chimiques et biologiques ce qui explique leur importance notamment dans les secteurs agrochimiques et pharmaceutiques.

5.1. Les pyridines

La pyridine (figure N° 06) est un composé organique hétérocyclique basique qui a la formule chimique C_5H_5N donnant un poids moléculaire total de 79,09 g/ mole. Sa structure se rapproche de celle du benzène où l'un des groupements C-H est remplacé par un atome d'azote. C'est un liquide incolore qui bout à 115,2 °C et gèle à -41,6 °C. Sa densité est 0,9819 g/ cm³ et son maximum d'absorption optique est à 589 nm (Milcent et Chau, 2003).

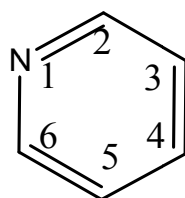


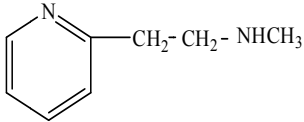
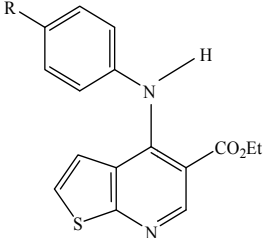
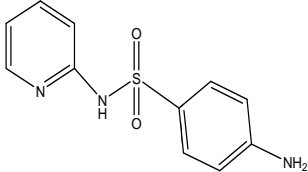
Figure N° 06: Le noyau pyridine

L'exemple le plus marquant de cette classe de composés est l'acide nicotinique ou l'acide pyridine-3-carboxylique, également connu sous le nom de vitamine B₃ (niacine), qui agit comme une drogue anti-hyperlipidémique qui baisse le taux de cholestérol sanguin en diminuant légèrement, chez le patient ayant déjà fait un infarctus du myocarde, le risque de récurrence et de mortalité (Brown et Zhao, 2008).

La principale activité biologique des pyridines est le blocage du flux des ions K⁺ des canaux ioniques dans les cellules nerveuses et du myocarde (Thompson, 1982). Il a été rapporté que les dérivés 1 H-pyrazolo 2-aminopyridines ont montré des activités antibactériennes et antifongiques vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Ces mêmes dérivés possèdent, d'après certains travaux, des propriétés inhibitrices de la synthase kinase-3 et un potentiel anti tumoral. Cette activité est intensivement liée à la structure chimique où le remplacement d'un H de pyrazole du système pyrazolo pyridine par d'autres substituant bioactifs a altéré énormément leurs propriétés biologiques (Sayedali, 2009).

Le tableau N° 01 regroupe les exemples les plus marquants de cette classe de composés.

Tableau N° 01: Structures de quelques 2-aminopyridines et leurs propriétés biologiques

Composés	Structures chimiques	Activités biologiques	Références
Bétahistine		Est l'un des médicaments utilisés actuellement pour leur traitement symptomatique des vertiges particulièrement chez les patients atteints de la maladie de menière (affection de l'oreille interne)	Rascol <i>et coll.</i> , 1995
éthyl 4-(phenylamino)thieno pyridine-5-carboxylates		Activité inhibitrice contre le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) anti- <i>Leishmania amazonensis</i> (III)	Bernardino <i>et coll.</i> , 2006 De Mello <i>et coll.</i> , 2004
Sulfapyridine		Médicament antibactérien et anti-inflammatoire	Paniker et Levine, 2001

5.2. Les 2-pyridones

La pyridone est une cétone hétérocyclique qui dérive de la pyridine. La 2-pyridone est un composé organique qui contient 5 carbones, 5 hydrogènes, 1 azote et 1 oxygène [$C_5H_4NH(O)$], donnant un poids moléculaire total de 95,10 g/ mole. Elle a un atome d'oxygène qui est attaché au carbone de l'hétérocycle en position 2 (figure N° 07). Elle se présente comme un solide cristallin incolore, soluble dans l'eau, le méthanol et l'acétone. Elle a un point de fusion de l'ordre de 107,8 °C et a maximum d'absorption optique à 293 nm (Milcent et Chau, 2003).

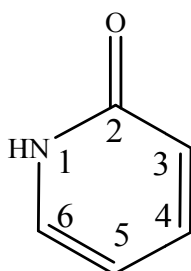


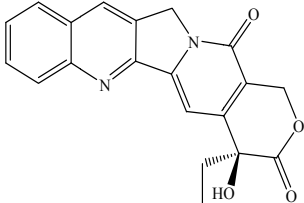
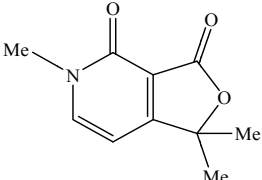
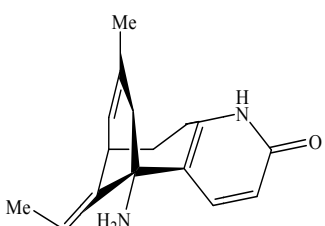
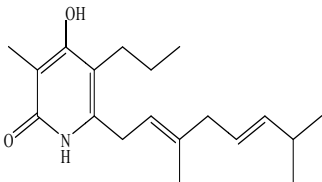
Figure N° 07: La structure du noyau 2-pyridone

Les pyridones sont employées comme des ligands dans la formation des composés de coordination en tant qu'agents médicaux [(Bodor et Offermanns, 2008) ; (Brown et Zhao, 2008)]. Les travaux réalisés sur les pyridones révèlent des activités hépato-protectrices (Kurakane et Igarashi, 2006), activités antioxydantes (Sayed *et coll.*, 2010), activités dans le traitement de l'accident vasculaire cérébral ischémique (Zhang *et coll.*, 2008) et de l'angine de poitrine (David, 1968).

Les triazolethiones, les thiazolotriazoles, les imidazolotriazoles, et les pyrazoles sont des dérivés de pyridones utilisés comme médicaments dans les maladies liées au déficit de la mémoire (Finke *et coll.*, 2007). En outre, les thiazolotriazoles montrent des activités antibactériennes, antifongiques [(Kulkarnatak *et coll.*, 1981) ; (Wujec *et coll.*, 2004)], anti-HIV (Sayed et colli, 2008) et antihelminthiques (Kamal *et coll.*, 2008). D'autres dérivés pyridones ont servi comme des peptidomimétiques qui empêchent l'assemblage des pilis chez *Escherichia coli* uropathogènes (Berg *et coll.*, 2006), agents antimicrobiens et antiviraux (Dollé *et coll.*, 1995), agents cardiotoniques tels que l'amrinone et milrinone (Osadchii, 2007), psychotropes, nootropiques, antiépileptiques (Franco *et coll.*, 2010), bronchodilatateurs, anti-inflammatoires (Boschelli *et coll.*, 1993), anticancéreux (Cocco *et coll.*, 2000) ...etc.

Le tableau N° 02 regroupe les structures chimiques de quelques pyridones :

Tableau N° 02 : Structures de quelques pyridones et leurs propriétés biologiques

Composés	Structures chimiques	Activités biologiques	Références
Camptothécine		Utilisé pour leur traitement la leucémie et d'autres types de tumeurs	Peters <i>et coll.</i> , 2006.
Cerpégine		Possède des propriétés tranquillisantes, anti-inflammatoires, analgésiques, antiulcéreuses, hépatoprotectrices et antipyrétiques	Nikam et Savant, 2009
Huperzine A		Agent psychothérapeutique dans le traitement des patients atteints de la maladie d'Alzheimer	Kozikowski <i>et coll.</i> , 1996
Iromycine		Possède des propriétés antimicrobiennes et inhibitrices de la chaîne respiratoire mitochondriale par blocage de l'oxydation du NADH oxydoréductase-ubiquinone	Shojaei <i>et coll.</i> , 2007 Surup <i>et coll.</i> , 2008

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé dans laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (Lapsab), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen.

1. Matériel biologique

1.1. Matériel végétal

Le henné "*Lawsonia inermis*" nous a été fourni par l'Institut National de Recherche Agronomique d'Adrar. La plante entière a été récoltée dans la région d'Adrar au mois de mars 2009 puis conservée à température ambiante à l'abri de la lumière.

1.2. Bactéries

Douze souches bactériennes testées nous ont été fournies par l'équipe de microbiologie du laboratoire Produits Naturels (Laprona), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.

Il s'agit de :

- Huit bactéries à gram négatif:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 et *Proteus mirabilis* ATCC 3565

- Quatre bactéries à gram positif:

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Lysteria monocytogenes* ATCC 15313.

Les souches sont entretenues par des repiquages successifs puis conservées à 4°C sur gélose inclinée.

1.3. Levures

Les trois souches de levures testées sont disponibles au laboratoire de recherche Lapsab.

Les levures utilisées sont *Candida albicans* IP 444, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* ATCC 26790. Ces dernières sont entretenues par repiquages successifs puis conservées à 4 °C sur gélose Sabouraud inclinée.

1.4. Moisissures

Nous avons utilisé cinq champignons pathogènes filamenteux, *Aspergillus flavus* MNHN 994294, *Fusarium oxysporum* MNHN 963917, *Aspergillus fumigatus* MNHN 566, *Alternaria alternaria* MNHN 843390 et *Clamidosporium herbarum* MNHN 3369.

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire Laprona, Faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.

Les souches sont entretenues par repiquages successifs puis conservées à 4°C sur gélose Sabouraud inclinée.

1.5. Globules rouges

Pour les tests de cytotoxicité, nous avons utilisé un modèle universel de cellules animales, le globule rouge humain provenant d'un donneur unique sain.

2. Les dérivés de synthèse

Pour cette étude, nous avons testé l'activité biologique de trois classes de produits de synthèse, les dérivés naphthoquinones, les dérivés 2-aminopyridines et les dérivés pyridones. Ces dérivés sont synthétisés par l'équipe du professeur Choukchou-Braham Noureddine, laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO), Faculté des Sciences Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.

Les structures exactes et les formes d'isomères ont été vérifiées par des études spectroscopiques et de modélisation moléculaire. Ces produits ont également donné des résultats analytiques satisfaisants notamment par IR et RMN proton et une grande pureté par la caractérisation à la HPLC.

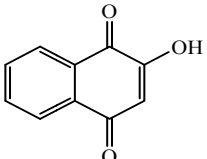
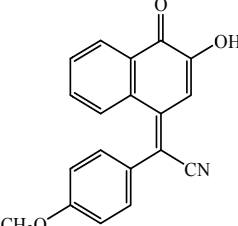
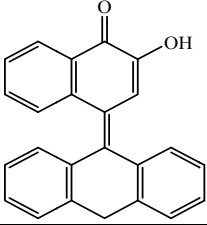
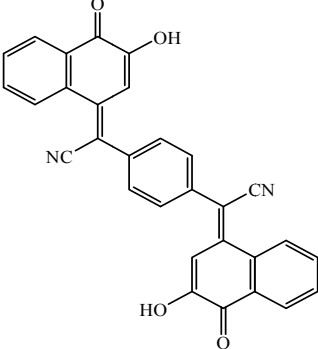
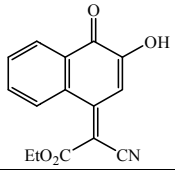
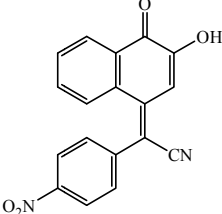
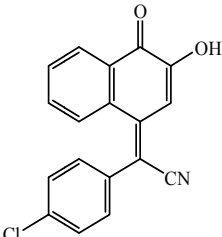
2.1. Les naphthoquinones

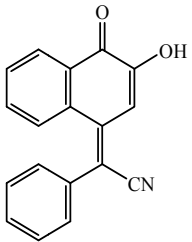
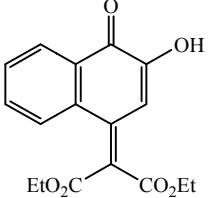
Les naphthoquinones commercialisées (la lawsone et la dichlone) pures proviennent des laboratoires Sigma-Aldrich.

Le tableau N°03 regroupe les structures des dérivés naphthoquinométhanes testés.

La synthèse des composés de la série I (dérivés naphthoquinométhanes) notés de **p1** à **p8** est réalisée par une réaction en cascade Michael-élimination du sodium 1,2 naphthoquinone-4-sulfonate avec des acétonitriles substitués dans un mélange eau-éthanol en présence d'une base. Il s'agit des conditions de la chimie verte (Benabdallah, 2012).

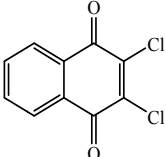
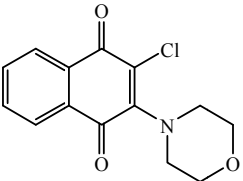
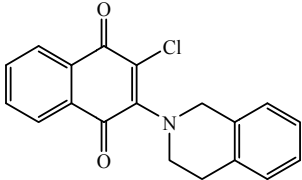
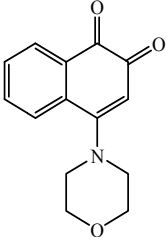
Tableau N°03: Structures et nom systématiques des composés de la série I.

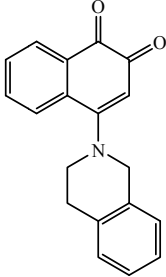
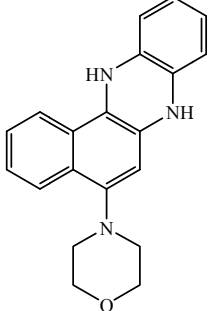
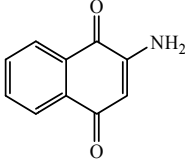
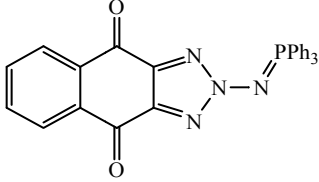
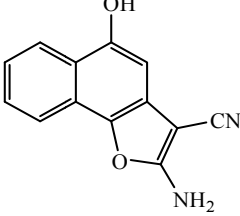
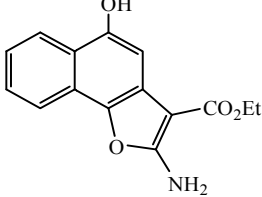
N°	Structures	Noms systématiques	codes
01		2-hydroxynaphthalène-1,4-dione	L
02		2-(3-hydroxy-4-oxonaphthalèn-1(4H)-ylidène)-2-(4-méthoxyphényl) acétonitrile	p1
03		4-(anthracèn-10(9H)-ylidène)-2-hydroxynaphthalèn-1(4H)-one	p2
04		Bis(2-(3-hydroxy-4-oxo-4H-naphtalèn-1-ylidène)) <i>para</i> -phénylène diacétonitrile (bis- <i>p</i>)	p3
05		2-Cyano-2-(3-hydroxy-4-oxo-4H-naphtalèn-1-ylidène)acetate d'éthyle	p4
06		2-(3-Hydroxy-4-oxo-4H-naphtalèn-1-ylidène)-2-(4-nitrophényl) acétonitrile	p5
07		2-(4-Chlorophényl)-2-(3-hydroxy-4-oxo-4H-naphtalèn-1-ylidène) acétonitrile	p6

08		2-(3-Hydroxy-4-oxo-4 <i>H</i> -naphthalèn-1-ylidène)-2-phénylacétonitrile	p7
09		2-(3-Hydroxy-4-oxo-4 <i>H</i> -naphthalèn-1-ylidène)malonate de diethyle	p8

La synthèse des composés de la série II (**a**, **a1**, **a2**, **b1**, **b2**, **b3**, **c1**, **c2**, **c3** et **c4**) est obtenue par des réactions en cascade ou domino. Les structures sont regroupées dans le tableau N° 04.

Tableau N°04: Structures et nom systématiques des composés de la série II.

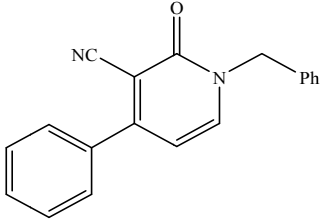
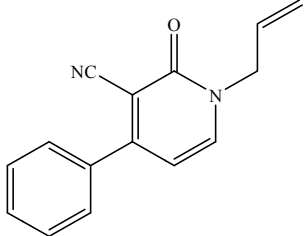
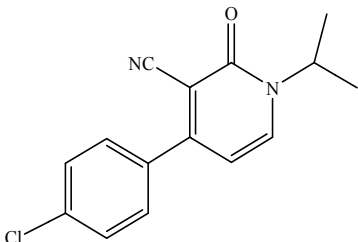
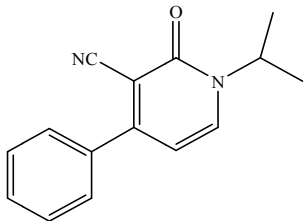
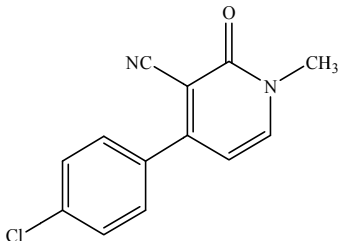
N°	Structures	Noms systématiques	codes
01		2,3-dichloronaphthalène-1,4-dione	a
02		2-Chloro-3-morpholino-1,4-naphthoquinone	a1
03		2-chloro-3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)-yl)-1,4-naphthoquinone	a2
04		4-Morpholino-1,2-naphthoquinone	b1

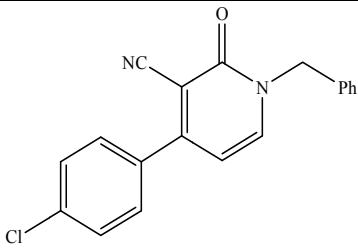
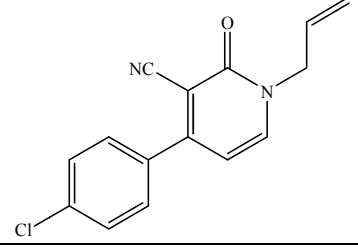
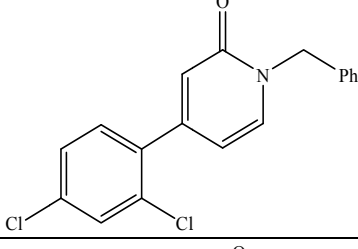
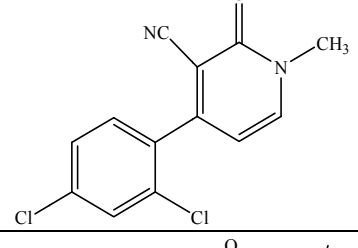
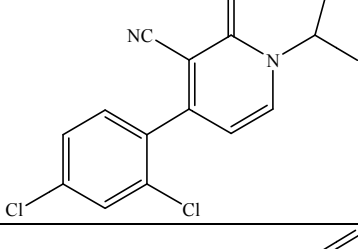
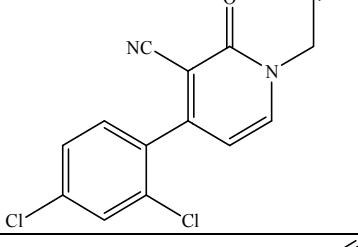
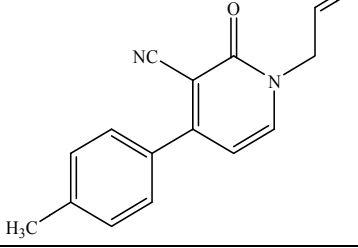
05		4-(3,4-dihydroisoquin-2(1H)yl)-1,2-naphthoquinone	b2
06		5-morpholino-7,12-dihydrobenzo[a]phenazine	b3
07		2-amino-1,4-naphthoquinone	c1
08		2-[(triphenylphosphoranylidene)amino]-2H-naphtho[2,3-d][1,2,3]triazole-4,9-dione	c2
09		2-amino-5-hydroxynaphtho[1,2-b]furan-3-carbonitrile	c3
10		2-amino-5-hydroxynaphtho[1,2-b]furan-3-carboxylate d'éthyle	c4

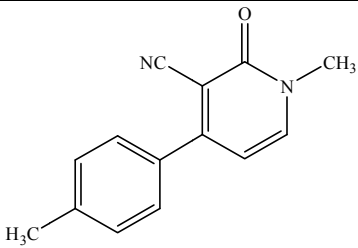
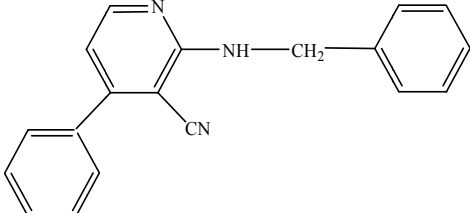
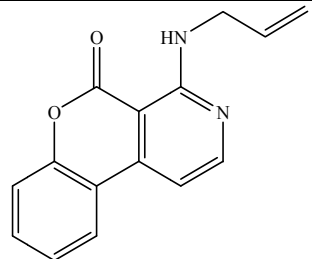
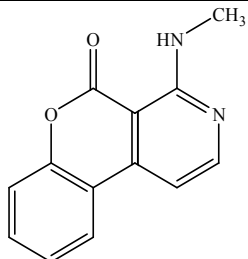
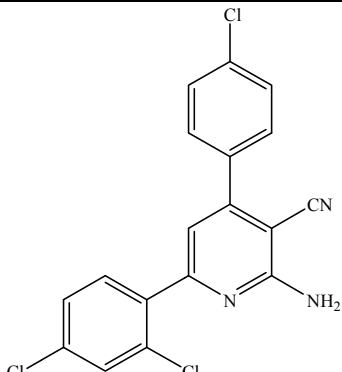
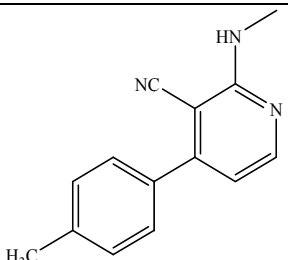
2.2. Les 2-aminopyridines et 2-pyridones

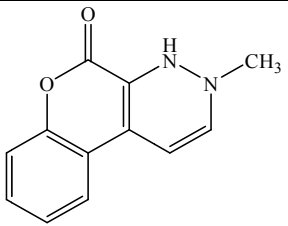
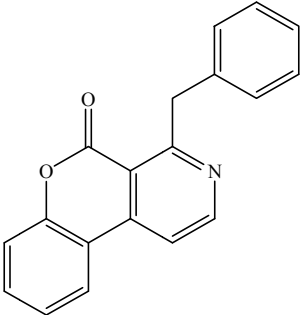
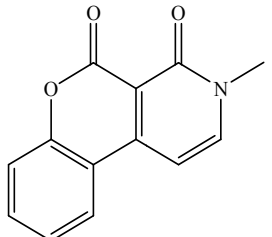
Les structures chimiques des dérivés 2-aminopyridines et 2-pyridones sont regroupées sur le tableau N°05. La synthèse de ces dérivés est réalisée par une nouvelle méthode de synthèse qui consiste en une première étape de synthèse d'un alcène. La deuxième étape est une réaction de cyclisation (Kibou, 2013).

Tableau N° 05: Structures et nom systématiques des dérivés 2-aminopyridines et 2-pyridones.

N°	Structures	Noms systématiques	codes
01		1-benzyl-2-oxo-4-phényl-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	A
02		1-allyl-2-oxo-4-phényl-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	B
03		4-(4-chlorophényl)-1-isopropyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	C
04		1-isopropyl-2-oxo-4-phényl-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	D
05		4-(4-chlorophényl)-1-méthyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	E

06		1-benzyl-4-(4-chlorophényl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	F
07		1-allyl-4-(4-chlorophényl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	G
08		1-benzyl-4-(2,4-dichlorophényl)pyridin-2(1H)-one	H
09		4-(2,4-dichlorophényl)-1-méthyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	I
10		4-(2,4-dichlorophényl)-1-isopropyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	J
11		1-allyl-4-(2,4-dichlorophényl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	K
12		1-allyl-2-oxo-4-p-tolyl-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	L'

13		1-méthyl-2-oxo-4-p-tolyl-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile	M
14		2-(cyclohexa-1,3-diénylméthylamino)-4-phénylnicotinonitrile	N
15		4-(allylamino)-5H-chromeno[3,4-c]pyridin-5-one	O
16		4-(méthylamino)-5H-chromeno[3,4-c]pyridin-5-one	P
17		2-amino-4-(4-chlorophényl)-6-(2,4-dichlorophényl)nicotinonitrile	Q
18		2-(méthylamino)-4-p-tolylnicotinonitrile	R

19	 <p>The structure shows a benzene ring fused to a six-membered ring containing an oxygen atom and a carbonyl group. This six-membered ring is further fused to a pyridazine ring with a methyl group on the nitrogen atom.</p>	3-méthyl-3,4-dihydrochromeno[3,4-c]pyridazin-5-one	S
20	 <p>The structure shows a benzene ring fused to a six-membered ring containing an oxygen atom and a carbonyl group. This six-membered ring is further fused to a pyridine ring with a benzyl group attached to the 4-position.</p>	4-benzyl-5H-chromeno[3,4-c]pyridin-5-one	T
21	 <p>The structure shows a benzene ring fused to a six-membered ring containing an oxygen atom and a carbonyl group. This six-membered ring is further fused to a pyridine ring with a methyl group on the nitrogen atom and a second carbonyl group at the 4-position.</p>	3-méthyl-3H-chromeno[3,4-c]pyridine-4,5-dione	U

3. Méthodes

3.1. Préparation de l' extrait du henné

L'extrait de henné est préparé par macération à froid selon le protocole de Sharma, (1990). 25g des feuilles séchées et broyées sont mise en contact avec 100 mL d'éthanol absolu.

Le mélange est agité puis laissé à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 24h. L'extrait est ensuite filtré (papier filtre wattman N°3) puis évaporé dans un rotavapor type HEIDOLPH. L'extrait brut est solubilisé dans le DMSO et conservé à 4°C.

Le rendement est calculé par la formule suivante:

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

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

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

Le choix du solvant d'extraction est basé sur le rapport de certains auteurs qui indiquent que les composants actifs des plantes à activité antimicrobienne font partie des composés organiques obtenus par une extraction initiale à l'éthanol ou au méthanol (Zhang et Lewis, 1997).

3.2. Extraction de la lawsone à partir du henné

L'extraction de la lawsone à partir du henné est réalisée selon le protocole de Bakkali et coll., (1997).

Dans un litre d'éthanol à 45%, nous introduisons 10 g des feuilles de henné séchées et broyées; l'ensemble est placé sous agitation continue à une température ambiante pendant 36 h.

L'extrait est filtré puis évaporé jusqu'à l'obtention d'une solution concentrée. Etant donné que dans le henné la lawsone est sous forme d'un hétéroside (liée à un sucre), sa libération nécessite l'addition de 10 mL d'acide acétique glacial. La lawsone sera récupéré par plusieurs lavages au chloroforme. Les phases chloroformiques sont regroupées et lavées par une solution saturée en NaCl puis séchées sur MgSO₄. Une filtration et une évaporation

sous pression réduite sont réalisées jusqu'à l'obtention d'un résidu pâteux. Ce dernier est lavé par un mélange hexane-dichlorométhane (9/1) pour obtenir une poudre.

La pureté de lawsone extraite vérifiée par Chromatographie sur Couche Mince (CCM).

Le rendement de l'extrait de la lawsone est calculé selon la formule suivante:

$$\text{rendement} \quad \% = \frac{m'_0}{m'_1} \times 100$$

m'_0 : Masse en gramme du solide finale obtenu;

m'_1 : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne sont celles recommandées par l'Institut des Standards Cliniques et des Laboratoires [(NCCLS, 2006); (CLSI, 2009)].

L'évaluation de l'activité antibactérienne est réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu solide et la technique des dilutions (sur milieu liquide et solide).

Seuls les produits qui ont donné une activité par la méthode des disques ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité par la méthode de dilution pour une évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

3.3.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide (NCCLS, 2006)

Pour la méthode de diffusion des disques sur milieu solide l'inoculum est ajusté au standard 0,5 McFarland (à l'aide d'un spectrophotomètre) à une absorbance de l'ordre de 0,08 à 0,1, lue à 625 nm. Le 0,5 McFarland est équivalent à 10^8 UFC/ mL. L'ensemencement est réalisé par inondation sur milieu Mueller Hinton. Les disques, préalablement préparés et imprégnés par une dose de 512 µg/ disque des produits à tester, sont ensuite transférés dans la boîte ensemencée. Les disques témoins sont imprégnés successivement par 10 µL d'eau distillée et 10 µL de DMSO pur. La Gentamycine et la Ciprofloxacine sont utilisées comme témoin positif. Les boîtes sont enfin incubées pendant 24 h à 37 °C.

La lecture est réalisée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition. Elle est réalisée en prenant la moyenne de trois mesures différentes.

3.3.2. Méthode des dilutions

A la différence de la méthode de diffusion, la méthode des dilutions permet de tester les produits directement mélangés avec le milieu de culture. Ainsi, nous avons réalisé deux méthodes, la méthode des dilutions sur milieu liquide et la méthode des dilutions sur milieu solide (CLSI, 2009):

a. Méthode des dilutions sur milieu liquide

Une série de concentrations allant de 1024 à 2 µg/ mL des produits à tester est préparée directement dans une microplaque stérile. Un volume de 0,1 mL du produit est mis en contact avec 0,1 mL de l'inoculum contenant 10^6 UFC/ mL (le facteur de dilution $\frac{1}{2}$ est pris en considération dans le calcul des CMI). La concentration de l'inoculum finale

est 5×10^5 UFC/ mL. La microplaque est couverte et incubée à 37°C pendant 24h. la concentration du DMSO ne dépasse pas 2%.

La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration de la substance testée à laquelle aucun trouble visuel n'est observé. La Ciprofloxacine et la Gentamycine sont utilisées comme antibiotiques de références (CLSI, 2009).

b. Méthode des dilutions sur milieu solide

Un volume de 1 mL de chaque dilution des produits (ou extraits) est mélangé avec 19 mL du milieu Mueller Hinton, dans une boîte de pétrie stérile. Les mêmes concentrations utilisées par la méthode précédente sont respectées. Ces boîtes sont maintenues jusqu'à solidification de la gélose. Les boîtes témoins sont préparées en ajoutant respectivement 1 mL d'eau distillée et 1 mL de DMSO.

L'ensemencement se fait par dépôt d'un spot qui contient 10^4 UFC/ mL. La boîte est ensuite séchée et incubée pendant 24h à 37°C.

Cette méthode permet de tester toutes les souches bactériennes en même temps et sur la même boîte. Ceci a l'avantage d'étudier le comportement des substances vis-à-vis de toutes les souches dans des conditions expérimentales identiques.

La lecture se fait à l'œil nu et la CMI est la plus faible concentration à laquelle aucune croissance visuelle n'est décelée.

3.4. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures

L'évaluation de l'activité des dérivés de synthèse vis-à-vis des levures est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide recommandée par le CLSI (Espinel-Ingroff, 2007).

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Mueller Hinton additionné par 2% de glucose et de 0,5µg/ mL de bleu de méthylène. L'inoculum équivalent au 0,5 McFarland est préparé selon les mêmes étapes que celles décrites pour les bactéries sauf que l'absorbance est de l'ordre de 0,12-0,15 à une longueur d'onde de 530 nm. L'ensemencement est effectué par inondation. Les disques immergés par les produits sont déposés après séchage de la boîte. Ces dernières sont incubées à 35°C pendant 24h. La lecture est réalisée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

L'étude de la CMI des levures est réalisée de la même manière que celles des bactéries, sauf que le milieu de culture utilisé est le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640.

L'inoculum est ajusté à une absorbance de l'ordre de 0,12 à 0,15 lue à 530 nm, ce qui correspond à un inoculum équivalent à $1-5 \cdot 10^6$ UFC/ mL.

3.5. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des moisissures

L'activité fongitoxique des produits est évaluée selon la technique d'empoisonnement de la nourriture de Perrucci (Perrucci *et coll.*, 1994).

Les solutions mères des composés à tester sont préparées de telle façon à avoir des concentrations finales égales à 150 µg/ mL. Un volume de 1 mL du produit à tester est bien mélangé avec 19 mL du milieu de culture Saboraud Dextrose Agar. Le témoin négatif est préparé de la même façon par l'ajout du DMSO. L'effet du DMSO a été étudié et la concentration finale du DMSO dans les boîtes est de l'ordre de 1%. Les disques mycéliens, pris aseptiquement à partir d'une pré-culture des moisissures, sont inoculés dans le centre de la boîte de Pétri. La boîte contrôle est préparée d'une manière similaire par l'ajout de 1 mL d'eau distillée stérile et cultivée dans les mêmes conditions sur le milieu Saboraud Dextrose Agar. Les boîtes sont incubées à 28 °C. La lecture est réalisée à partir du 7^{ème} jour.

L'efficacité de chaque échantillon est déterminée en mesurant la croissance radiale mycélienne. Cette dernière est mesurée dans les deux directions à angle droit les uns aux autres. Une moyenne des deux mesures est effectuée pour chaque cas. Les données sont exprimées en pourcentage d'inhibition par rapport à la taille des colonies contrôles. Le pourcentage d'inhibition mycélienne est calculé à l'aide de la formule suivante (Pinto *et coll.*, 1998):

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

dc : diamètre de la colonie contrôle

dt : diamètre de la colonie traitée.

3.6. Evaluation de la cytotoxicité des dérivés naphthoquinones vis-à-vis des globules rouges

3.6.1. Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang fraîchement prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 4000 tours/ minutes pendant 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse type JOUAN. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec une solution de lavage glacée MgCl₂ (2 mM), NaCl (150 mM) puis resuspendu à nouveau dans le tampon phosphate de sodium salé (PBS) 10 mM, pH 7,4.

3.6.2. Mesure de la fuite de l'hémoglobine

Les globules rouges sont suspendus dans le tampon phosphate salé (PBS) 10 mM, pH 7,4 à raison de 4000 cellules/ mL (0,5 mL sont mis en contact avec 9,5 mL de tampon phosphate salé de sodium (PBS) 10 mM, pH 7,4).

La suspension érythrocytaire à 2% est incubée (dans un incubateur de paillasse type Orbital Shaker, Thermo Forma) à 37 °C pendant 120 min avec différentes concentrations des dérivés naphthoquinones. Des prélèvements de 0,5 mL sont réalisés chaque 15 min pour être resuspendus dans 2,5 mL d'une solution de lavage glacée MgCl₂ (2 mM). Les tubes sont centrifugés à 4000 tours/ minutes pendant 5 min. Le surnageant est utilisé pour suivre la fuite de l'hémoglobine intracellulaire par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/ Vis (Type Analytik Jena).

Pour le contrôle positif, l'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec le triton-X100 à une concentration de 1% (V/V). Le tampon seul est utilisé comme contrôle négatif. Pour chaque échantillon le pourcentage de l'activité hémolytique maximale est déterminé par l'équation (Lee, 2002):

Taux d'hémolyse (%) = 100% x [(A_{548 nm} de l'échantillon - A_{548 nm} de l'hémolyse spontanée test d'échantillon)] / A_{548 nm} test à triton-X100

Troisième partie
Résultats et interprétation

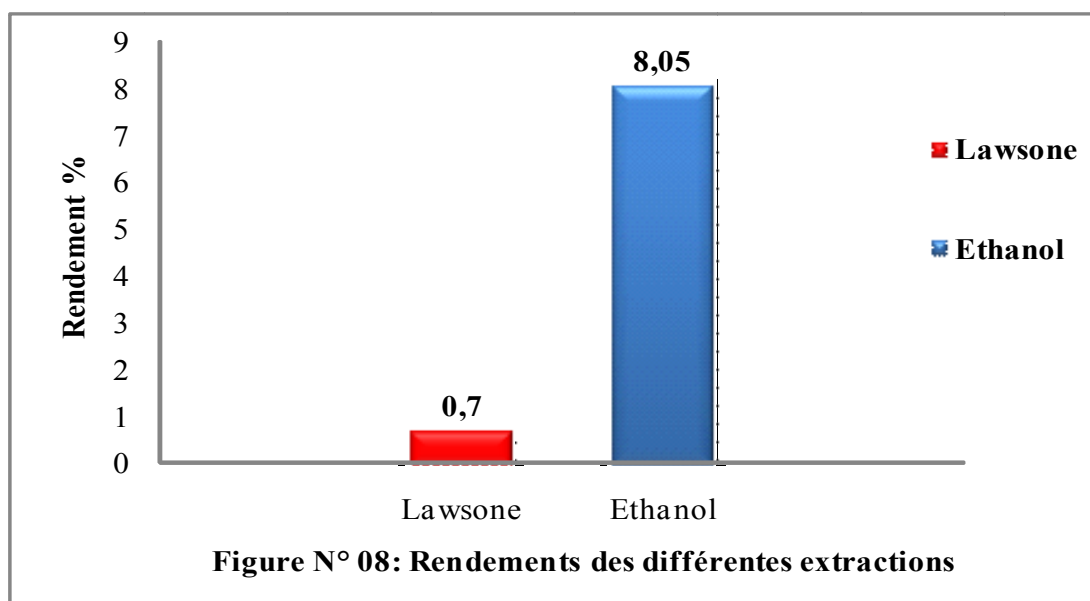
1. Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Lawsonia inermis*

Dans cette partie de notre travail nous avons évalué l'activité antibactérienne et antifongique de deux extraits, l'extrait éthanol et de la lawsone obtenus à partir des feuilles de *Lawsonia inermis*.

1.1. Rendements

Les résultats des différents rendements d'extraction calculés à partir de la matière végétale sèche des feuilles de *Lawsonia inermis* sont représentés par la figure N° 08. Après 24h de macération à froid, le rendement de l'extrait éthanol est de 8,05% et celui de la lawsone extraite est égal à 0,7%.

Différents solvants d'extraction de la plante *Lawsonia inermis* peuvent être utilisés pour la réalisation du criblage antimicrobien. Nous avons utilisé un solvant alcoolique polaire qui est l'éthanol.



1.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition des extraits éthanolique et de la lawsone vis-à-vis des bactéries à gram négatif et à gram positif sont illustrés dans le tableau N° 06.

Nous remarquons une activité variable entre les bactéries à gram négatif et à gram positif. Toutes les bactéries à gram positif montrent une sensibilité vis-à-vis des deux extraits éthanolique et de la lawsone. Les meilleures zones d'inhibition sont obtenues par l'extrait éthanolique et sont comprises entre 11-12,5 mm vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Lysteria monocytogenes* et *Proteus mirabilis*. L'extrait de la lawsone montre des zones d'inhibition comprises entre 8 et 12 mm uniquement vis-à-vis des souches à gram positif. Cependant, les deux extraits ne montrent qu'une faible ou carrément aucune activité vis-à-vis toutes les souches à gram négatif (mis à part la souche *Proteus mirabilis*).

Les résultats relatifs à l'évaluation des CMI des extraits éthanolique et de la lawsone vis-à-vis des bactéries à gram négatif et à gram positif sont présentés dans le tableau N° 07.

La CMI la plus basse de l'extrait éthanolique est obtenue vis-à-vis de *Proteus mirabilis*, elle est de 2,19 mg/ mL. Le reste des souches montre des CMI qui sont identiques (4,38 mg/ mL). La CMI la plus basse de l'extrait de la lawsone est obtenue vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* elle est de 0,512 mg/ mL.

La présence de la lawsone des les feuilles de *Lawsonia inermis* à un rendement de 0,7%, nous a conduit à suspecter le rôle de ce composé dans l'activité biologique rapportée pour cette plante. C'est pour cette raison que les résultats de l'activité de l'extrait éthanolique sont comparés à ceux de la lawsone extraite des feuilles de *Lawsonia inermis*.

Tableau N°06: Diamètres des zones d'inhibition des extraits éthanolique et de la lawsone vis-à-vis des bactéries à gram négatif et à gram positif

	Diamètres des zones d'inhibition (mm)											
	Gram négatif							Gram positif				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Extrait éthanolique	9,5	6	6	9	8,5	7,5	12,5	9	12	12	11	12,5
Extrait de la lawsone	6	6	6	6	6	7	9	6	11	12	8	10

Tableau N°07: CMI des extraits éthanolique et de la lawsone vis-à-vis des bactéries à gram négatif et à gram positif

	CMI (mg/ mL)											
	Gram négatif							Gram positif				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Extrait éthanolique	4,38	4,38	4,38	4,38	4,38	4,38	2,19	4,38	4,38	4,38	4,38	4,38
Extrait de la lawsone	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	1,024	0,512	1,024	0,512	1,024

1.3. Evaluation de l'activité antifongique des extraits éthanolique et de la lawsone des feuilles de *Lawsonia inermis*

Cette évaluation est effectuée par la méthode de diffusion sur milieu solide vis-à-vis de trois souches de *Candida albicans*. Les résultats sont comparés à ceux de l'extrait de la lawsone. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau N° 08. Toutes les souches utilisées sont sensibles aux extraits éthanolique et de la lawsone. Les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 10,5 et 14,25 mm.

Le tableau N° 09 regroupe les CMI des extraits éthanolique et de la lawsone des feuilles de *Lawsonia inermis* obtenues vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans*. La souche la plus résistante est *Candida albicans* ATTC 26790 (CMI= 1,095 mg/ mL). Les deux autres souches montrent des CMI rapprochées (CMI= 0,547 mg/ mL). Ces CMI sont presque les mêmes que celles obtenues avec la lawsone vis-à-vis de toutes les souches de levures utilisées dans ce test (CMI= 0,512 mg/ mL).

Ensuite nous avons procédé à l'évaluation de l'activité fongitoxique des deux extraits (éthanolique et lawsone) de la plante *Lawsonia inermis* par la méthode d'empoisonnement de la nourriture vis-à-vis des cinq souches de moisissures. L'évaluation de l'inhibition exercée par les extraits est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne. Les résultats sont représentés dans le tableau N° 10. Seules deux souches sont sensibles vis-à-vis des extraits éthanolique et la lawsone. La lawsone montre une inhibition totale de la croissance mycélienne des deux souches *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus flavus*, alors que l'extrait éthanolique révèle l'inhibition de la croissance mycélienne de la souche *Fusarium oxysporum* simplement. Ceci pourrait être expliqué par la faible masse de la matière végétale utilisée pour effectuer l'extraction, ou par la résistance de la souche utilisée dans cette sélection.

Tableau N° 08: Diamètres des zones d'inhibition des extraits éthanolique et de la lawsone des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* vis-à-vis des souches de levure.

	<i>Candida albicans</i> IP 444	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida albicans</i> ATCC 26790
Extrait éthanolique	13,75	14,25	12,5
Extrait de la lawsone	11	10,5	11

Tableau N° 09: CMI (mg/ mL) des extraits éthanolique et de la lawsone des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* vis-à-vis des souches de levure.

	<i>Candida albicans</i> IP 444	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida albicans</i> ATCC 26790
Extrait éthanolique	0,547	0,547	1,095
Extrait de la lawsone	0,512	0,512	0,512

Tableau N° 10: Pourcentages d'inhibition mycélienne des extraits éthanolique et de la lawsone des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* vis-à-vis des souches de moisissures

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Alternaria alternaria</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Clamidosporium herbarum</i>
Extrait éthanolique	71,95 ± 1,4	9,46 ± 0,2	0	0	0
Extrait de la lawsone	88,29 ± 0,7	90,62 ± 2,6	0	0	0

2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des dérivés naphthoquinones

Dans cette partie de notre travail nous avons évalué l'activité antibactérienne et antifongique des dérivés naphthoquinones et de la lawsone obtenus par synthèse chimique.

2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de la lawsone et des composés de la série I (**p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7 et p8**) et de la série II (**a, a1, a2, b1, b2, b3, c1, c2, c3 et c4**) est déterminée dans un premier temps par la méthode de diffusion des disques vis-à-vis des différentes souches à gram négatif à savoir : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* et *Proteus mirabilis*. Ces souches bactériennes représentent les espèces à gram négatif fréquemment rencontrées dans les maladies infectieuses. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) sont présentés dans le tableau N°11.

Les résultats nous indiquent que les composés de la série II **a1, a2, b1, c1 et c2** possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis de quatre souches à gram négatif. Les composés **a2 et c1** montrent les meilleures zones d'inhibition dont les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 14 à 28,5 mm vis-à-vis des souches de *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii* et *Proteus mirabilis*. Le composé **b1** montre les zones d'inhibition 14,5 et 15,5 mm vis-à-vis des souches *Salmonella typhimurium* et *Citrobacter freundii* respectivement. Le composé **c2** montre les zones d'inhibition de 15 et 20,5 mm vis-à-vis des souches *Salmonella typhimurium* et *Acinetobacter baumannii* respectivement, alors que les composés **a1** montre une zone d'inhibition de l'ordre de 11,7 vis-à-vis de *Proteus mirabilis*. La lawsone montre les zones d'inhibition de 15, 17 et 18 mm vis-à-vis d'*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Citrobacter freundii* respectivement

Les composés de la série I ne montrent aucune activité antibactérienne intéressante vis-à-vis des huit souches de bactéries à gram négatif utilisées dans ce test.

Cependant, tous les autres résultats révèlent des activités faibles ou nulles vis-à-vis de la plupart des souches. Le solvant utilisé pour dissoudre les produits testés (DMSO à 100%) ne montre aucun effet sur la croissance des bactéries.

En comparant les structures des composés de la série I et II, on note que la structure quinone dans la série II apporte davantage d'activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries à gram négatif. Cette activité peut être due au caractère lipophile des composés de la série II qui leur permet de franchir la paroi bactérienne.

Tableau N°11. Diamètres des zones d'inhibition des composés de la série I et II vis-à-vis des bactéries à gram négatif

Composés		Diamètres des zones d'inhibition (mm)							
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. cloacae</i>
	L	6	15	17	8	7	18	7	6
Série I	p1	6	8	6	6	6	6	6,5	6
	p2	6	6	6	6	6	10	6	6
	p3	6	9	8	7	9	7	8	6
	p4	6	6	6	6	6	6	6	6
	p5	6	6	6	6	6	6	6	6
	p6	6	6	6	6	6	7	6	6
	p7	6	6	11	8	10,5	6	7	9
	p8	6	7	6	6	6	6	6	8
Série II	a	6	8	6	6	6	6	6,5	6
	a1	6	6	6	6	6	6	11,7	6
	a2	6	9	14	7	15,5	25,7	25,5	6
	b1	6	6	14,5	6	6	15,5	6	6
	b2	6	6	6	6	6	6	6	6
	b3	6	6	6	6	6	7	6	6
	c1	6	6	26,5	8	27	22	28,5	9
	c2	6	7	15	6	20,5	6	6	8
	c3	7	8,5	8	6	10	8,5	8,5	6
	c4	6	6	6	6	6,5	6	6	6
	Gent	21,33	21,5	25	14	14,5	26	23	18
	Cip	33	36	35,5	24	24,5	32,5	33,5	20
	DMSO	6	6	6	6	6	6	6	6

La CMI des composés de la série I et II est ensuite déterminée vis-à-vis des bactéries à gram négatif. Les résultats sont présentés dans le tableau N° 12. Les CMI les plus basses sont obtenues avec les dérivés **a1**, **b1** et **c1**. Les dérivés **c1** et **b1** sont les plus prometteurs car leurs activités varient de 8 à 16 µg/ mL. Le dérivé **c1** révèle une CMI égale à 8 µg/ mL vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii*, celle-ci est inférieure jusqu'à 128 fois par rapport à son analogue structural, la lawsone. Le dérivé **b1** montre des CMI égales à 16 µg/ mL vis-à-vis de *Salmonella typhimurium* et *Citrobacter freundii* respectivement, qui sont inférieures jusqu'à 64 fois moins que celles de la lawsone. La lawsone, les dérivés **a2**, **b3**, **c3** et les composés de la série I n'ont montré aucune CMI intéressante vis-à-vis de toutes les bactéries à gram négatif. Les résultats de ces derniers sont similaires ou inférieurs au moins deux fois par rapport aux CMI de la lawsone.

La comparaison entre les composés de la série I et II montre que les dérivés naphthoquinones qui possèdent deux sites cétones libres (en position 1,2 ou en 1,4), révèlent des activités meilleures et nettement plus intéressantes que le 2-hydroxy 1,4-naphthoquinone.

Les résultats des CMI obtenues avec la méthode des dilutions sont en corrélation avec ceux de la méthode de diffusion en milieu solide.

La faible activité de certains composés est peut être due à la faible solubilité, ou à la résistance de certaines souches bactériennes.

Il est intéressant de remarquer qu'il y a davantage de molécules actives sur les bactéries à gram positif que sur les bactéries à gram négatif. Cette différence peut être liée à la structure de la paroi de ces deux familles de bactéries. La paroi cellulaire des bactéries à gram négatif est plus complexe que celle à gram positif qui ne possède pas de membrane externe. C'est en particulier cette dernière qui leur confère la relative imperméabilité par rapport aux bactéries à gram positif. Les molécules trop encombrées ou trop hydrophobes ne pourront pas passer à travers les porines de la membrane externe (Ahmad *et coll.*, 2006).

Pour s'assurer de la validité des résultats obtenus, un contrôle de qualité a été effectué par la réalisation d'un antibiogramme de nos souches de référence vis-à-vis de deux antibiotiques la Gentamycine et la Ciprofloxacine. Les résultats sont interprétés par mesure du diamètre en mm de la zone d'inhibition autour du disque et comparés aux limites acceptables des diamètres d'inhibition recommandés par l'Institut des Standards Cliniques et des Laboratoires (NCCLS, 2006).

La comparaison quantitative des résultats des composés testés avec les antibiotiques est difficile, car la nature de l'activité et la composition des molécules ne sont pas tout à fait comparables ainsi que la vitesse et le mode de diffusion dans la gélose.

Tableau N°12: CMI des composés de la série I et II vis-à-vis des bactéries à gram négatif

Composés		CMI (µg/ mL)							
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. cloacae</i>
Série I	L	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	p1	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	p2	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	p3	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	p4	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	p5	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	p6	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	p7	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	p8	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
Série II	a	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	a1	1024	128	1024	1024	1024	1024	64	1024
	a2	512	512	512	1024	512	256	256	256
	b1	512	256	16	1024	512	16	64	128
	b2	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	b3	512	512	512	512	512	512	512	512
	c1	1024	128	64	256	8	128	64	128
	c2	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
	c3	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
c4	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	
	Gent	0,5	0,5	0,25	8	8	0,5	0,5	0,5
	Cip	0,25	0,008	0,008	0,25	0,5	0,016	0,008	0,25

L'évaluation de l'activité antibactérienne de la lawsone et des composés de la série I (**p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7 et p8**) et de la série II (**a, a1, a2, b1, b2, b3, c1, c2, c3 et c4**) est déterminée dans un deuxième temps par la méthode de diffusion des disques vis-à-vis des différentes souches à gram positif en l'occurrence *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* et *Lysteria monocytogenes*.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition des composés de la série I et II vis-à-vis des bactéries à gram positif sont présentés dans le tableau N°13. Les résultats nous indiquent que les composés **p4, p5, p6, a1, a2, b1, c1 et c4** possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis des quatre souches à gram positif étudiées. Les meilleures zones d'inhibition sont obtenues vis-à-vis de la souche *Staphylococcus auerus* par les dérivés **p5, p6, a1, a2, b1, c1 et c4**. Les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 16-23,5 mm. La lawsone montre des diamètres des zones d'inhibition égales à 13, 17,5 et 25 mm vis-à-vis de *Lysteria monocytogenes*, *Staphylococcus auerus* et *Bacillus cereus* respectivement.

Des zones d'inhibition moins importantes sont enregistrées par les dérivés **a2** (14 mm), **b1** (14 mm) et **c1** (15,25 mm) vis-à-vis d'*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* et *Lysteria monocytogenes* respectivement. Cependant les autres composés de la série I, **p1, 2, 3, 4, 7 et 8**, et de la série II, **b2, b3 et c2**, n'ont révélé aucune activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à gram positif.

Les résultats relatifs à la détermination des CMI des composés de la série I et II vis-à-vis des bactéries à gram positif sont reportés dans le tableau N°14. Les CMI les plus basses sont obtenues avec les composés **c1, c4, a2, b1, p5 et p6**. Ainsi, le composé **c1** révèle des CMI égales à 16 µg/ mL vis-à-vis des deux souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Le composé **c4** montre une CMI égale à 32 µg/ mL vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Le composé **a2** montre des CMI égales à 64 µg/ mL vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, alors que la CMI du dérivé **b1** est 64 µg /mL vis-à-vis de la souche *Bacillus cereus*. En d'autres termes l'activité des composé **c1, c4, a2, b1, p5 et p6** est améliorée de 8 à 32 fois plus que celle de la lawsone.

La lawsone et les composés de la série I, **p1, 2, 3, 4, 7 et 8**, ainsi que les composés de la série II, **a, a1, b3, c2, et c3**, ne montrent aucune CMI intéressante vis-à-vis de toutes les bactéries à gram positif.

Tableau N°13: Diamètres des zones d'inhibition des composés de la série I et II vis-à-vis des bactéries à gram positif

Composés		Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	L	17,5	6	25	13
Série I	p1	6	6	6	6
	p2	6	6	6	6
	p3	6	6	6	6
	p4	9	6	6	12,5
	p5	17	6	6	6
	p6	16	6	6	6
	p7	6	6	6	6
	p8	6	6	6	6
Série II	a	9,5	10,5	8	6
	a1	15	6	10,33	6
	a2	23,5	14	21	6
	b1	21,5	6	14	6
	b2	6	6	6	6
	b3	6	6	6	6
	c1	23,5	10	18,5	15,25
	c2	6	6	6	6
	c3	6	10	10	6
c4	13,5	6	11	6	
	Gent	21,33	26	23	18
	Cip	33	32,5	33,5	20
	DMSO	6	6	6	6

Tableau N°14: CMI des composés de la série I et II vis-à-vis des bactéries à gram positif

Composés		CMI ($\mu\text{g/ mL}$)			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	L	512	1024	512	1024
Série I	p1	1024	1024	1024	1024
	p2	1024	1024	1024	1024
	p3	1024	1024	1024	1024
	p4	1024	1024	1024	1024
	p5	64	256	1024	1024
	p6	32	1024	1024	1024
	p7	1024	1024	1024	1024
	p8	1024	1024	1024	1024
Série II	a	256	512	256	1024
	a1	512	1024	512	1024
	a2	64	512	64	1024
	b1	256	1024	64	1024
	b2	1024	1024	1024	1024
	b3	512	512	512	512
	c1	16	128	16	256
	c2	1024	1024	1024	1024
	c3	128	1024	512	1024
	c4	32	512	128	1024
	Gent	0,5	16	0,5	8
	Cip	0,25	0,25	0,064	0,25

2.2. Evaluation de l'activité antifongique

Afin de mieux comprendre l'apport de la synthèse organique dans l'amélioration de l'activité antifongique, nous avons testé les dérivés de synthèse de la série I et II sur les levures et les moisissures.

2.2.1. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures

L'évaluation de l'activité de la lawsone et des composés de la série I et II vis-à-vis des levures est déterminée par la méthode de diffusion des disques. Trois souches de *Candida albicans* sont utilisées à savoir, *Candida albicans* IP 444, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* ATCC 26790. Les résultats sont reportés dans le tableau N°15.

Seuls les composés de la série II, **a1**, **a2**, **c1** et **c3**, montrent une activité vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans*. Les meilleures zones sont attribuées au composé **c1** puis **a1** avec des diamètres des zones d'inhibition compris entre 14,5- 23,5 mm. Le composé **a2** montre une zone d'inhibition égale à 12 mm vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 26790.

Les composés de la série I ne montrent aucune activité vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans*. Le DMSO ne montre aucun effet sur la croissance des levures.

Les résultats relatifs aux CMI sont présentés dans le tableau N°15. Les CMI les plus basses sont obtenues avec les composés **a1**, **a2** et **c1**. La lawsone donne des CMI qui sont supérieures ou égales à 512 µg/ mL. Par comparaison aux résultats obtenus avec la lawsone, les composés **a1**, **a2** et **c1** montrent des CMI qui sont inférieures jusqu'à 16 fois moins que celles de la lawsone. Ces résultats nous amènent à dire que le procédé de synthèse a permis aussi d'améliorer l'activité antifongique vis-à-vis des levures, même si les CMI restent toujours très élevées comparativement aux résultats obtenus avec l'amphotéricine B. En comparant les résultats obtenus aux composés de la série I et II, nous notons que la structure di-cétonique améliore l'activité antifongique vis-à-vis des levures.

Tableau N° 15: Diamètres des zones d'inhibition et les CMI des composés de la série I et II vis-à-vis des levures

Composés		<i>Candida albicans</i> IP 444		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	
		Diamètres (mm)	CMI	Diamètres (mm)	CMI	Diamètres (mm)	CMI
L		6	512	7	512	7	> 512
Série I	p1	7,5	> 512	9	> 512	8,5	> 512
	p2	6	> 512	6	> 512	6	> 512
	p3	6	> 512	6	> 512	6	> 512
	p4	6	> 512	6	> 512	6	> 512
	p5	6	> 512	6	> 512	6	> 512
	p6	6	> 512	6	> 512	6	> 512
	p7	6	> 512	6	> 512	6	> 512
	p8	7	> 512	6	> 512	6	> 512
Série II	a	7	512	8,5	512	11	128
	a1	14,5	512	14,5	256	10	64
	a2	6	512	6	512	12	64
	b1	6	> 512	6	> 512	6	> 512
	b2	6	> 512	6	> 512	6	> 512
	b3	6	> 512	6	> 512	6	> 512
	c1	23,5	128	23	128	18	64
	c2	7	> 512	6	> 512	6	> 512
	c3	10	512	11,5	512	9	512
	c4	6	> 512	6	> 512	6	> 512
AmB		20	2	21	4	21,66	8
DMSO		6	-	6	-	6	-

2.2.2. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des moisissures

Le criblage de l'activité antifongique des composés de la série I et II est réalisé par la technique d'empoisonnement de la nourriture vis-à-vis de cinq espèces de moisissures, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternaria* et *Clamidosporium herbarum*. Les résultats sont regroupés dans le tableau N°16.

La meilleure activité antifongique est obtenue avec la lawsone vis-à-vis de toutes les souches de moisissures.

Parmi les dix composés de la série II, seuls les composés **a**, **a1** et **a2**, montrent une inhibition supérieure à 30% de la croissance mycélienne. Les pourcentages d'inhibition sont compris entre $35,65 \pm 2,1$ et $89,31 \pm 3,2$. Les meilleurs résultats sont obtenus par les composés **a1** et **a2**. Ce dernier montre des résultats comparables et parfois même meilleurs, à ceux obtenus avec la lawsone. Cependant les autres composés montrent une inhibition de la croissance mycélienne inférieure ou égale à 30%.

Parmi les composés de la série I, seuls les composés **p1**, **p2**, **p3** et **p5** montrent une inhibition de l'ordre de 50% d'inhibition de la croissance mycélienne. Les autres composés ne révèlent pas une activité intéressante mis à part une légère inhibition de la croissance mycélienne qui est dans le meilleur cas inférieure ou égale à 30% d'inhibition de la croissance mycélienne.

Le DMSO n'a pas montré d'effet sur la croissance mycélienne des moisissures.

Tableau N°16: Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des composés de la série I et II

Composés		<i>F. oxysporum</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. alternaria</i>	<i>C. herbarum</i>
L		88,29 ± 0,4	80,47 ± 1,6	83,78 ± 0	55,33 ± 2,1	82,53 ± 2
Série I	p1	49,64 ± 4,0	33,01 ± 2,8	00,0 ± 0	01,54 ± 2,2	9,71 ± 0,5
	p2	52,64 ± 0,2	18,8 ± 0,7	00,0 ± 0	20,94 ± 1,3	22,05 ± 1
	p3	49,24 ± 4,6	29,99 ± 1,2	00,0 ± 0	02,33 ± 1,1	6,03 ± 2,1
	p4	12,22 ± 3,1	07,22 ± 1,2	00,0 ± 0	04,55 ± 0,4	32,38 ± 0,8
	p5	56,14 ± 0,2	13,67 ± 0,6	00,0 ± 0	18,39 ± 1,8	12,60 ± 1,4
	p6	34,73 ± 1,8	05,79 ± 0,8	00,0 ± 0	06,72 ± 0,3	20,03 ± 1,8
	p7	22,76 ± 2,8	08,74 ± 0	00,0 ± 0	03,07 ± 0,4	33,52 ± 0,8
	p8	29,78 ± 2,5	17,12 ± 1,2	00,0 ± 0	05,38 ± 0,8	28,08 ± 1,1
Série II	a	35,65 ± 2,1	86,40 ± 7,2	85,9 ± 6,2	35,72 ± 0,6	35,91 ± 0
	a1	89,31 ± 3,2	84,57 ± 8,0	83,91 ± 5,0	83,78 ± 9,0	85,73 ± 7,3
	a2	88,55 ± 2,0	82,96 ± 2,7	75,87 ± 4,0	68,48 ± 6	51,60 ± 0
	b1	29,64 ± 4,0	28,01 ± 2,8	01,54 ± 2,2	00,0 ± 0	00,0 ± 0
	b2	22,64 ± 0,2	18,8 ± 0,7	20,94 ± 1,3	00,0 ± 0	00,0 ± 0
	b3	29,24 ± 4,6	28,90 ± 1,2	02,33 ± 1,1	00,0 ± 0	00,0 ± 0
	c1	12,22 ± 3,1	07,22 ± 1,2	04,55 ± 0,4	00,0 ± 0	00,0 ± 0
	c2	26,14 ± 0,2	13,67 ± 0,6	18,39 ± 1,8	00,0 ± 0	00,0 ± 0
	c3	14,73 ± 1,8	05,79 ± 0,82	06,72 ± 0,3	00,0 ± 0	00,0 ± 0
	c4	22,76 ± 2,8	08,74 ± 0	03,07 ± 0,4	00,0 ± 0	00,0 ± 0
AmB		88,10 ± 0,4	88,15 ± 1,6	79,64 ± 0	88,12 ± 0	68,82 ± 2,2
DMSO		00,0 ± 0	00,0 ± 0	00,0 ± 0	00,0 ± 0	00,0 ± 0

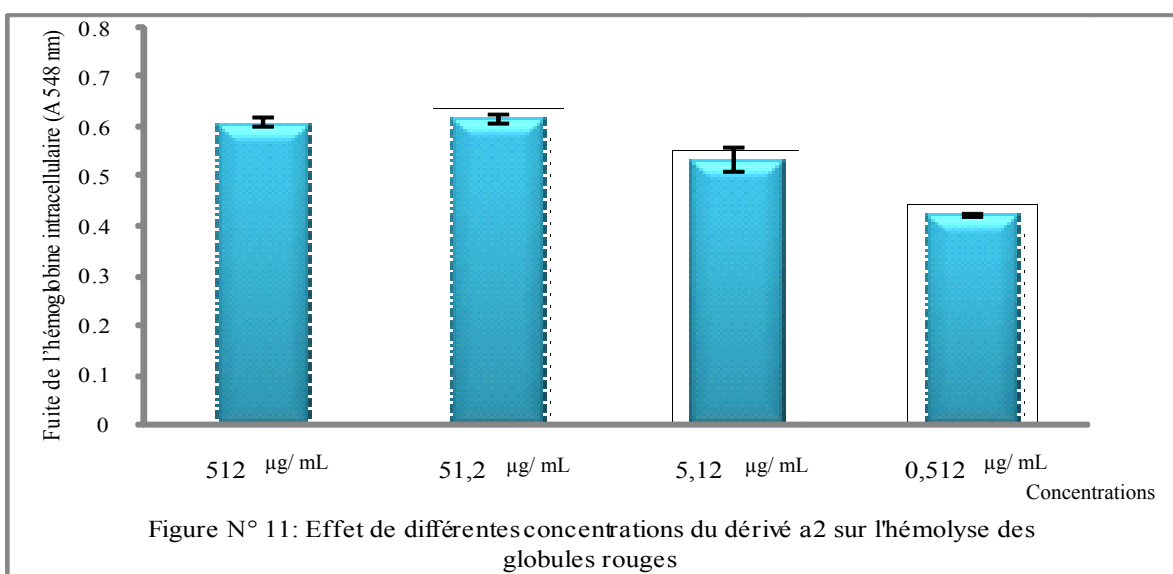
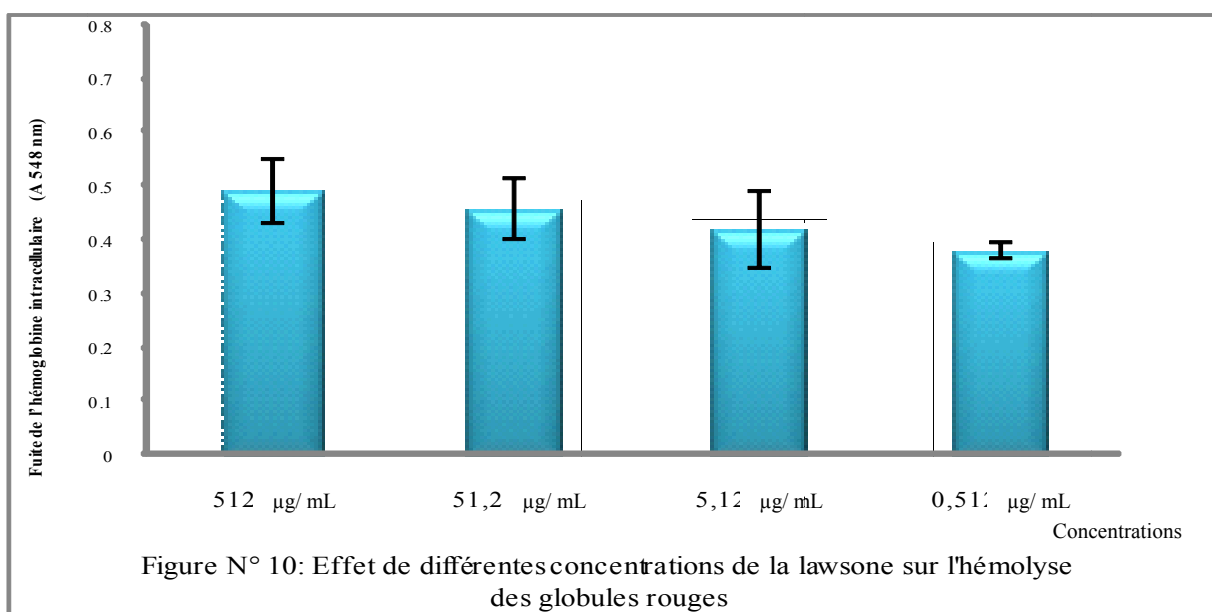
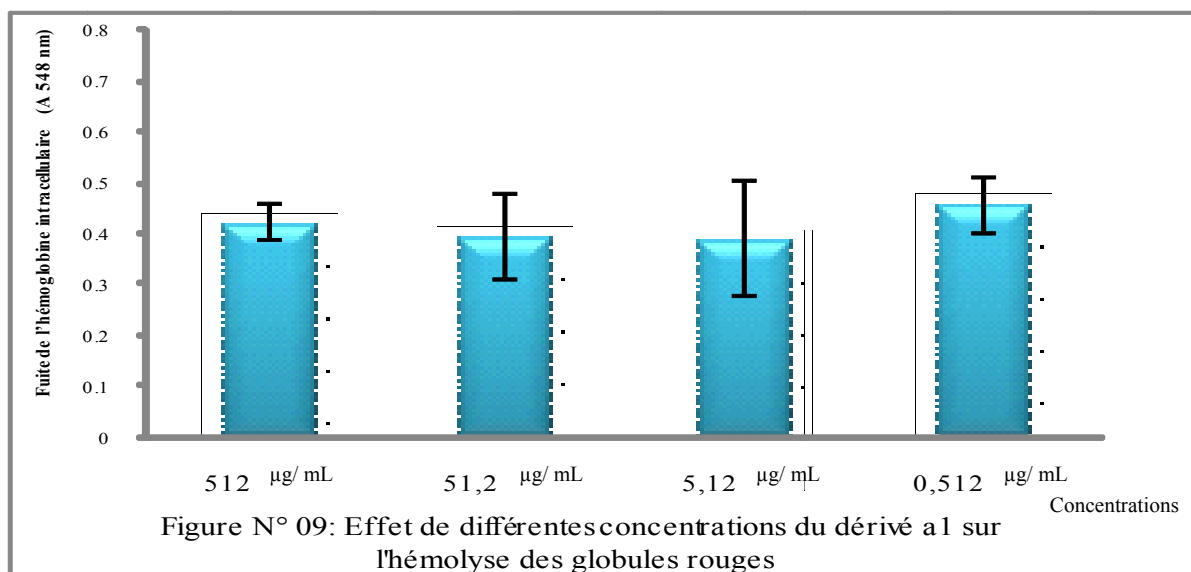
3. Etude de la cytotoxicité des dérivés naphthoquinones

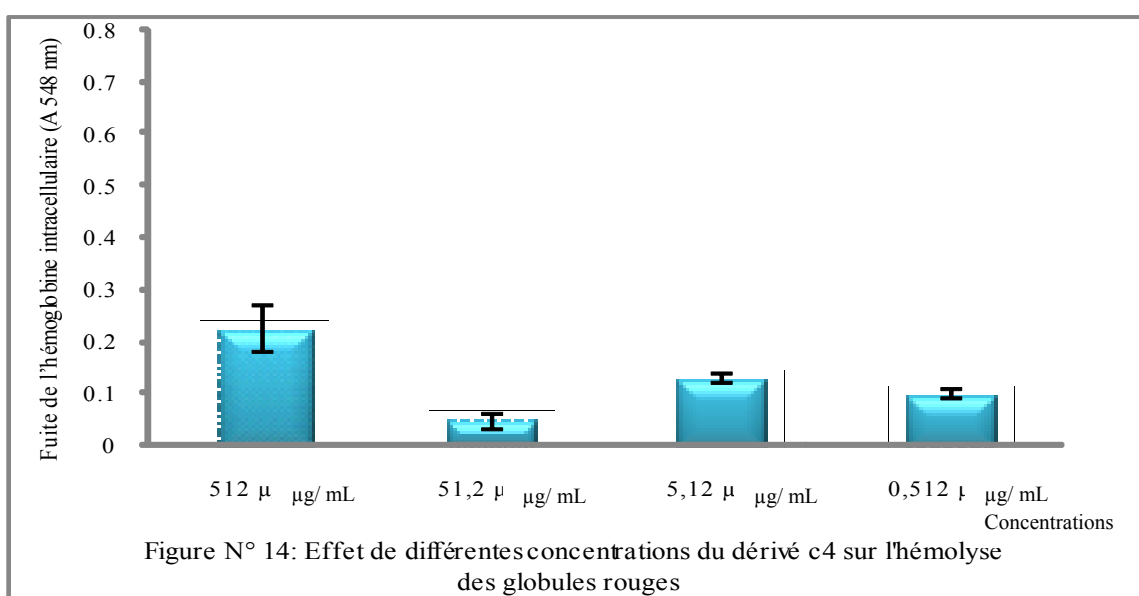
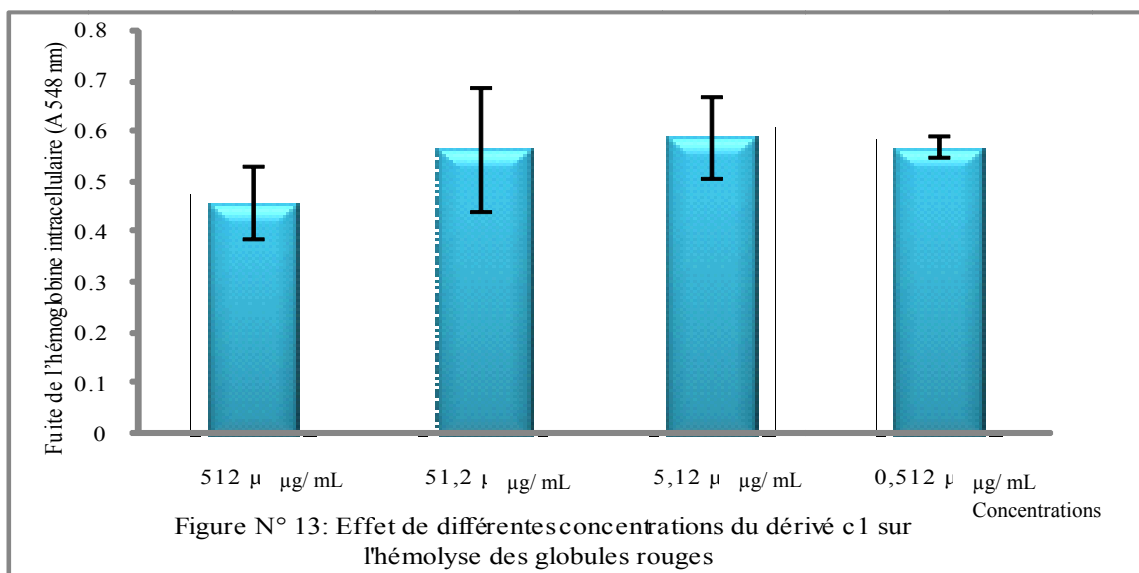
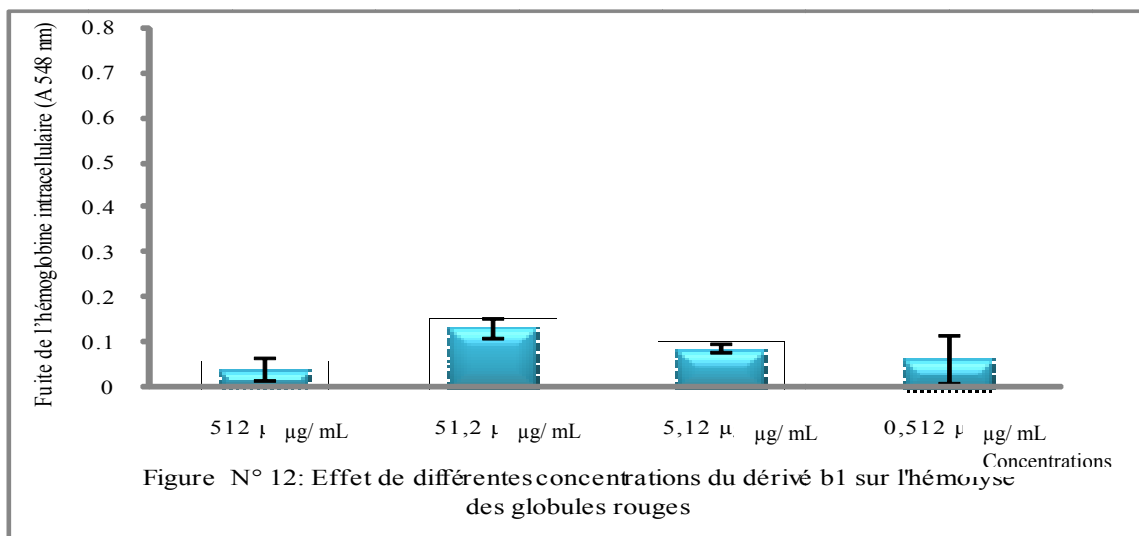
Dans cette partie de notre travail, les composés qui ont montré les CMI les plus intéressantes, ont fait l'objet d'évaluation *in vitro* de leur réactivité vis-à-vis des globules rouges humains (modèle universel de cellules animales). Lorsque la membrane plasmique des globules rouges entre en contact avec un agent hémolytique, ceci conduit à la lyse cellulaire qui se traduit par la libération de l'hémoglobine dans le milieu extracellulaire et qui absorbe à 548 nm. C'est pourquoi nous avons dosé le taux d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire additionné de différentes concentrations des produits de synthèse.

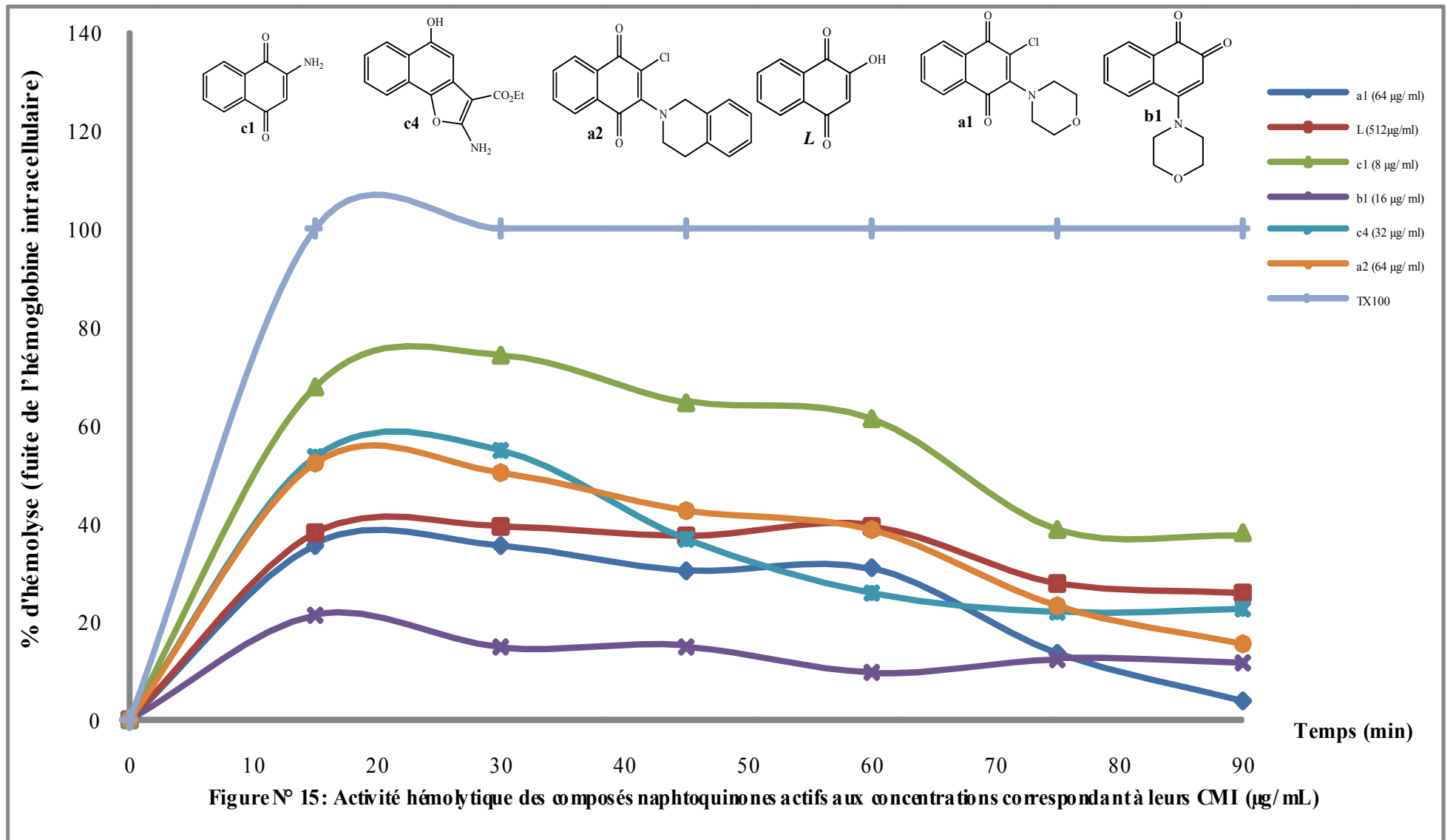
Les figures N° 09 à 14 représentent l'effet des différentes concentrations allant de 512 à 0,512 µg/ mL des composés **a1**, **a2**, **b1**, **c1**, **c4** et de la lawsone sur l'hémolyse des globules rouges. L'intervalle est choisi en fonction des CMI obtenues dans les tests d'évaluation de l'activité antimicrobienne. Les résultats ne révèlent pas l'existence d'une relation dose-réponse entre les concentrations des produits et leurs effets cytotoxiques. La cytotoxicité des dérivés **b1** et **c4** est la plus faible. Cependant, tous les produits se sont montrés toxiques vis-à-vis des globules rouges mais à des niveaux très différents.

Afin de mieux comprendre le comportement de ces composés au cours du temps, l'effet cytotoxique est suivi pendant 90 min. Les résultats, représentés dans la figure N°15, montrent des niveaux différents d'activité hémolytique. Tous les graphes ont atteint un maximum de d'hémolyse entre 25 à 30 min, ensuite les taux d'hémolyses chutent progressivement à des valeurs inférieures. L'hémolyse maximale (74,64%) est obtenue avec le composé **c1**. Ce composé est considéré comme étant le plus toxique vis-à-vis des globules rouges. En revanche, et contrairement au résultat attendu, la lawsone a montré une activité hémolytique modérée comparativement aux résultats obtenus avec le triton X-100. Les composés **a1** et **a2** ont eux aussi révélé une activité hémolytique modérée.

Le composé **b1** et **c4** ont montré les niveaux de l'activité hémolytique les plus bas. L'activité hémolytique de tous les composés est réduite au-delà de 30 min d'incubation. Dans une première constatation la structure di-cétonique ne semble pas être un dispositif toxique vu que la lawsone avait une activité hémolytique égale à celle du composé **c4** après 45 min d'incubation. L'introduction du groupe amine ($-NH_2$) en position C-2 semble provoquer une augmentation de l'activité hémolytique des NPQs, comme **c1** avait une activité hémolytique plus élevée que leurs homologues, la lawsone et le composé **a1**. Le substituant morpholine semble intervenir dans la diminution de la réactivité des dérivés **a1** et **b1**, composés qui détiennent des extrémités cétones 1,2 et 1,4 libres.







4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des dérivés 2-aminopyridines/ 2-pyridones

4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des dérivés 2-aminopyridines/ 2-pyridones

Un total de 21 dérivés pyridine et 2-pyridone (**A-V**) a fait l'objet d'un criblage d'évaluation de l'activité antibactérienne vis-à-vis de huit bactéries à gram négatif et de quatre bactéries à grams positif. Les résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques sont présentés dans les tableaux N°18 et N°19 (voir annexe II).

Les seules zones d'inhibition sont obtenues avec les produits nommés **A** et **K** vis-à-vis des souches à gram négatif *E. cloacea* et *Escherichia coli* respectivement (figure N° 16). Aucune zone d'inhibition n'est observée avec le reste des produits (**B-J, L-V**) et de ce fait aucune activité ne leur est attribuée vis-à-vis de toutes les souches bactériennes.

La substitution est faite au niveau de l'atome d'azote et le carbone n°4 du 2-pyridone. La comparaison entre la molécule **K** avec ses analogues **B, G** et **L** révèle que la présence de deux atomes de chlore participe à l'augmentation de son activité (figure N° 17). La comparaison entre le produit **K** et le produit **I** et **J** montre, probablement, que la substitution du groupement méthyle ou bien l'isopropyl par le groupement allyle ($R-CH_2-CH=CH_2$) améliore l'activité antibactérienne.

Nous pouvons dire que l'activité révélée par les produits **A** et **K** peut être expliquée par la présence de deux groupements chlorés pour le produit **K** qui stabilise la molécule une fois liée au phényle en position 2 et 4 et d'un groupement benzyle pour le produit **A** avec la présence d'un groupement $-CH_2-$ lié à l'atome d'azote dans les deux structures.

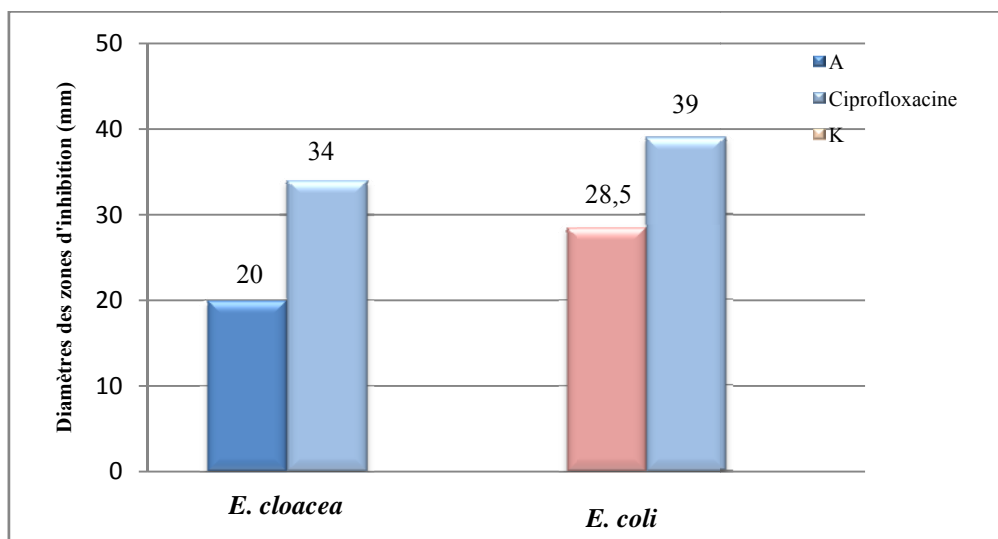


Figure N° 16: Diamètres des zones d'inhibition des dérivés A et K vis-à-vis d'*Enterococcus cloacea* et *Escherichia coli*.

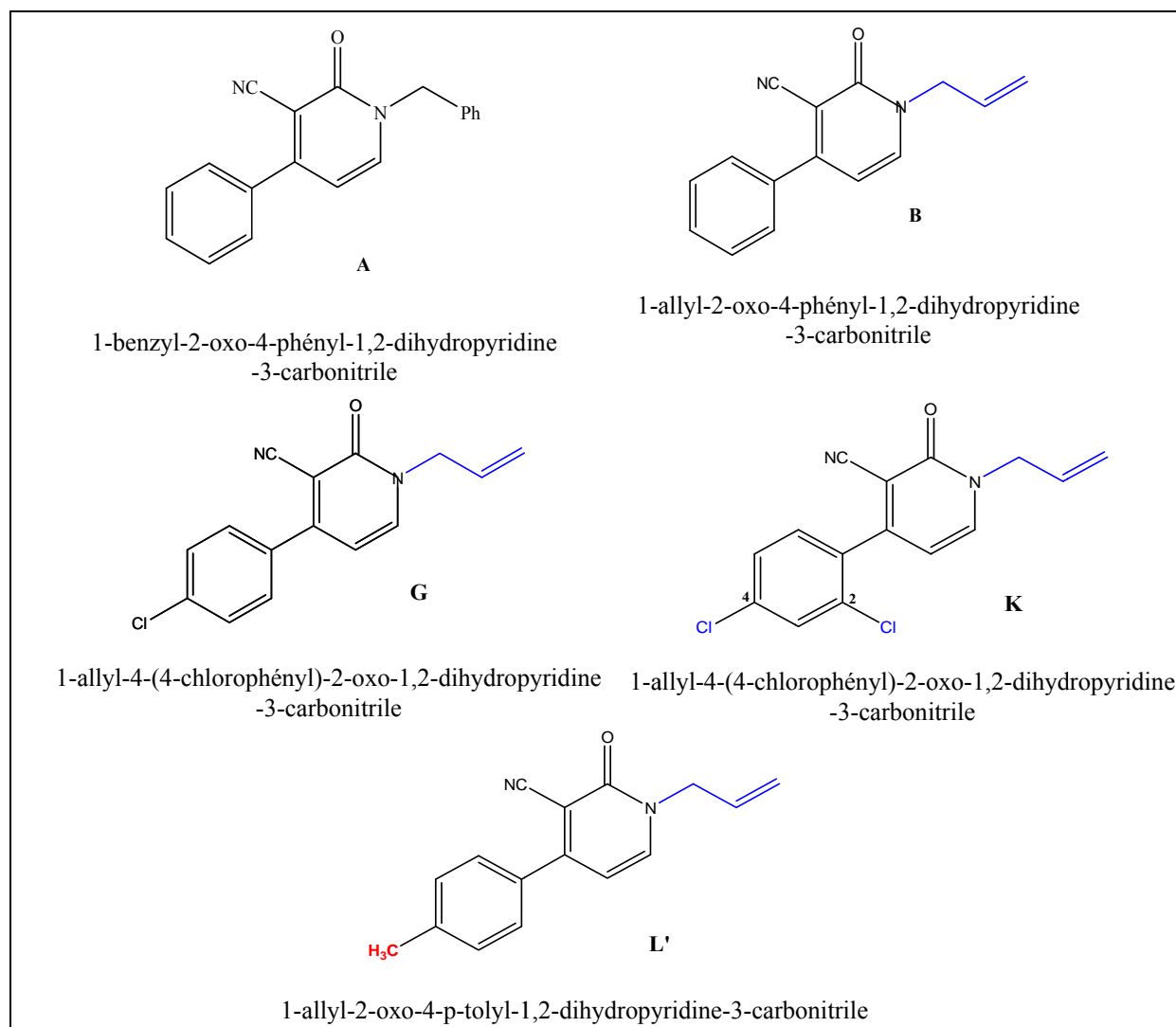


Figure N° 17: Structures des dérivés de synthèse A, B, K, G et L'.

D'après les résultats que nous avons obtenus et en comparant les structures des produits actifs, nous constatons que le groupement méthylène $-CH_2-$, qui est attaché au groupement allyle, et la présence de deux atomes de chlore a donné une bonne activité pour le produit K par rapport aux autres composés. Par contre, la présence du méthylène au niveau du groupement benzyle en l'absence des deux atomes de chlore a légèrement diminué l'activité du produit A par rapport aux autres composés.

Nous pouvons dire que le groupement phényle lié au CH_2 au niveau de l'atome d'azote du produit A et le CH_2 du groupement allyle avec les deux groupements de chlore, cas du produit K, sont des dispositifs structuraux importants qui ont révélé une activité antibactérienne intéressante par rapport aux autres produits testés (leurs analogues). La modification de la structure des 2- pyridones à travers les produits A et K par rapport aux autres dérivés a permis éventuellement l'amélioration de l'activité antibactérienne.

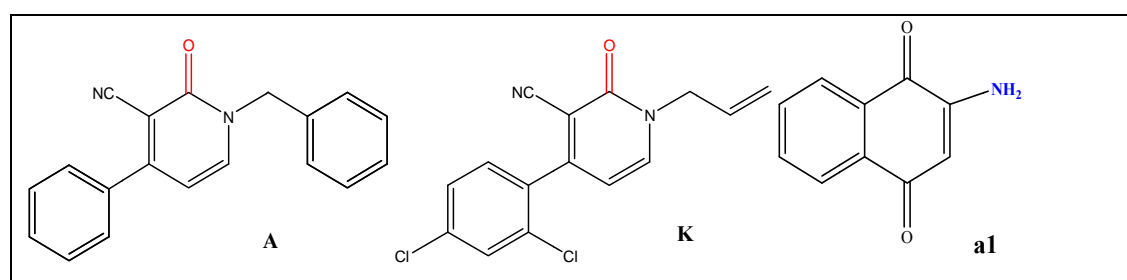
Les résultats des CMI des produits de synthèse et de leur association sont présentés dans le tableau N°17. La CMI du produit A est $512 \mu\text{g/ mL}$ vis-à-vis d'*E. cloacea* et celle du produit K est $512 \mu\text{g/ mL}$ vis-à-vis d'*Escherichia coli*. Les résultats sont relativement élevés et ne semblent pas être en corrélation avec ceux de la méthode de diffusion en milieu solide.

Nous avons ensuite entrepris une autre étude sur l'association des dérivés 2-pyridones (composés actifs) avec les dérivés 1,4-naphtoquinones. Le tableau N° 17 représente les CMI des produits de synthèse et de leur association. Les résultats révèlent que l'association permet l'amélioration des CMI qui passent de 512 à $64 \mu\text{g/ mL}$ dans l'association **A-a1** à 512 à $128 \mu\text{g/ mL}$ dans l'association **a1-K** vis-à-vis d'*Acinitobacter baumani*.

Ce type d'association dans l'activité peut être expliqué par la présence du groupement amine ($-NH_2$) (figure N° 18) qui induit une trans-amidification avec la fonction amide, du produit **A** ou **K**, en contact avec la bactérie.

Tableau N°17: CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des produits de synthèse et de leur association.

Composés	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacea</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>
A	512	512				
K	512	512				
A + K	512	512				
U	512	512				
A + U	512	512				
S	256		512			
A + S	256		512			
K+S			512			
a1			512			
A+ a1			64			
K + a1			128			
c1				64		
A + c1				64		
K + c1				64		
L	>512				256	512
A + L	256					256
K + L	256				512	512

**Figure N°18:** Structures des dérivés de synthèse A, K et a1.

4.2. Evaluation de l'activité antifongique des dérivés 2-aminopyridines/ 2-pyridones vis-à-vis des champignons

Tous les dérivés 2-aminopyridines/ pyridone ont fait l'objet d'évaluation de leur activité antifongique par la technique de diffusion des disques vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans* et par la technique d'empoisonnement de la nourriture vis-à-vis des cinq moisissures. Les résultats sont illustrés dans les tableaux N° 20 et 21 (voir annexe II).

Tous les dérivés ne montrent aucune zone d'inhibition vis-à-vis des trois souches de *Candida albicans* et de ce fait, aucune activité ne leur est attribuée vis-à-vis de cette espèce.

Les résultats vis-à-vis des moisissures montrent des niveaux d'activité différents, qui dans le meilleur résultat ne dépasse pas le pourcentage d'inhibition $40,09 \pm 3,1$ %.

Les meilleures activités antifongiques sont obtenues par les dérivés **A** et **I** vis-à-vis d'*Alternaria alternaria*. Cette inhibition est de l'ordre de 40%. Le dérivé **A** montre une inhibition de l'ordre de $33,44 \pm 0,2$ vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*. En fin, les dérivés **D** et **F** ont montré des pourcentages d'inhibition de l'ordre de $30,87 \pm 2,5$ et $29,58 \pm 5,6$ vis-à-vis de la souche *Aspergillus flavus*.

Cependant, les autres résultats obtenus ne semblent pas être très attrayants mis à part certains produits qui inhibent au maximum 20% de la croissance mycélienne des moisissures.

Quatrième partie
Discussion générale

Le présent travail a été réalisé au laboratoire Antibiotiques antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique. Il a porté sur la recherche de nouveaux agents antimicrobiens capables d'être un appui dans la gestion de la " crise d'antimicrobiens ". Il a permis notamment d'étudier l'activité antimicrobienne de deux extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* et 40 dérivés de synthèse appartenant aux familles des naphthoquinones, 2-aminopyridines et 2-pyridones. Les extraits et les dérivés de synthèse sont évalués pour la première fois *in vitro* vis-à-vis de douze souches de bactéries, trois levures et cinq champignons.

Il ressort de cette étude que :

- Les CMI de l'extrait éthanolique et de la lawsone sont relativement élevées vis-à-vis des bactéries. En comparant nos travaux avec ceux réalisés par Malekzadeh et Shabestari, (1989), nous constatons que l'extrait aqueux de *Lawsonia inermis* est actif *in vitro* vis-à-vis de la gamme des bactéries: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* et *Staphylococcus aureus*. Une autre étude montre que l'extrait aqueux de la poudre du henné commercialisée inhibe la prolifération des souches sauvages d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* (Guerrier *et coll.*, 1988).

- La comparaison des résultats avec ceux de l'extrait de la lawsone ne permet pas de tirer des conclusions définitives sur l'implication de la lawsone dans l'activité antibactérienne de la plante *Lawsonia inermis*. Toutefois, la lawsone n'est pas le seul composé responsable de l'activité antimicrobienne de la plante, du moins sous sa forme libre (Bruneton, 1999). En effet, *Lawsonia inermis* contient également la mannite, l'acide gallique, l'acide tannique et le mucilage. Ces substances sont présentes sous la forme d'un mélange. L'activité antimicrobienne peut être due à de nombreux hydroxyles libres qui ont la capacité de se combiner avec les hydrates de carbone et les protéines de la paroi cellulaire bactérienne (Kathem *et coll.*, 2008).

- L'évaluation de l'activité antifongique révèle une bonne activité antifongique vis-à-vis des souches de moisissures *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus flavus*. Cependant, l'activité antifongique vis-à-vis des souches de *Candida albicans* est moins bonne. Le criblage de l'activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* a fait l'objet d'une étude réalisée précédemment avec sept différents extraits de *Lawsonia inermis* (Rahmoun, 2009). A cours de cette étude, seul l'extrait DMSO a montré une activité moyenne vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231. L'extrait éthanolique et les autres solvants de polarité

moindre n'ont montré aucune activité vis-à-vis de cette souche. D'après l'étude réalisée par Guerrier *et coll.*, (1988), l'extrait du henné préparé par une suspension de 10% était inactif vis-à-vis d'une souche sensible de *Candida albicans*. Une autre étude rapporte que l'extrait éthanolique des feuilles de henné ne montre aucune activité vis-à-vis d'une souche de *Candida albicans* sauvage (Habbal *et coll.*, 2005).

L'activité antifongique de l'extrait brut aqueux des feuilles de *Lawsonia inermis* a été démontrée vis-à-vis des souches d'*Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* (Muhammad et Muhammad, 2005). En plus, la souche *Aspergillus flavus* a montré une susceptibilité élevée vis-à-vis des extraits de l'éther de pétrole, le benzène, le chloroforme, le méthanol et l'éthanol (Raveesha *et coll.*, 2007). Dans une étude réalisée par Natarajan et Lalitha, (1987), les souches *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. verrocosum*, *T. schoenleinii*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum ferrugineum*, *M. canis* et *sporotrichum schenckii*, se sont montrés sensibles vis-à-vis de la plante de henné (Natarajan et Lalitha, 1987).

Ces travaux montrent que les extraits de *Lawsonia inermis* possèdent une activité antifongique non négligeable vis-à-vis de nombreux champignons. Au cours d'une étude précédente nous avons conclu que la fraction active de la plante était plutôt lipophile qu'hydrophile (Rahmoun, 2009). Certains auteurs rapportent que l'origine de l'activité antimicrobienne de *Lawsonia inermis* est l'acide gallique ou les composés naphthoquinones (lawsone) [(Cowen, 1999) ; (Ahmed *et coll.*, 2000)]. Il a été signalé que la lawsone isolée à partir des feuilles de *Lawsonia inermis* a montré un effet antifongique significatif (Dixit *et coll.*, 1980). De plus, au cours du criblage antifongique de plusieurs plantes, les feuilles de *Lawsonia inermis* ont montré une forte fongitoxicité. L'agent antifongique responsable s'est avéré être la lawsone (Tripathi *et coll.*, 1978).

Nos résultats suggèrent que l'extrait éthanolique de la plante de *Lawsonia inermis* pourrait servir comme source alternative d'agents antifongiques pour la protection des humains ou des plantes contre les infections ayant pour origine les moisissures. La lawsone est un des composés bioactifs qui ont besoin d'une grande considération en raison des activités intéressantes *in vitro* [(Sharma, 1990) ; (Rostkowska *et coll.*, 1998)]. C'est un métabolite secondaire qui appartient à la famille des naphthoquinones. Ces dernières, en raison de leurs propriétés redox, sont connues pour leurs potentiels anticancéreux.

Des travaux antérieurs ont montré que l'activité antibactérienne des dérivés 1,4 NPQs nécessite la présence d'un groupe cétone libre en position 1 et 4 et que le substituant en position 2 ne doit pas être un groupe hydroxyle [(Mostefa-Karaet coll., 2010) ; (Rahmoun et coll., 2012)]. Sur la base de ce travail nous avons étudié l'influence de plusieurs substituant sur l'activité antibactérienne des composés 1,2/1,4 NPQs afin de comprendre le mécanisme d'action des NPQs par l'étude de la relation structure/ activité antimicrobienne. L'activité de deux séries des dérivés naphthoquinones est évaluée vis-à-vis des bactéries à gram positifs et négatifs connues pour être à l'origine de plusieurs maladies infectieuses telles que les maladies de la peau, respiratoire, digestive et urinaire.

- Les composés de la série I, **p5** et **p6** exhibent une forte activité antibactérienne *in vitro* avec des CMI égales à 64 µg/ mL et 32 µg/ mL respectivement vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (souche sensible de l'oxacilline). Cette activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* peut être due à la distribution électronique différente observée sur le noyau naphthoquinone, qui peut être une conséquence directe des caractéristiques particulières des substituant (neutre, donneur d'électrons ou attracteurs d'électrons) [(Rostkowska et coll., 1998) ; (Salunke-Gawali et coll., 2004)]. Pour ces mêmes composés (**p5** et **p6**), le remplacement de l'hydrogène par les substituant chloro ou nitro (ou un autre groupe d'halogènes) entraîne un changement considérable dans la distribution électronique du noyau NPQ (comparée au dérivé **p4**). Les propriétés de liaison de ces composés dans les différents états d'oxydations (la forme électronique réduite, la forme semiquinone, ou la forme à deux électrons réduit, catéchol), peuvent expliquer leur capacité d'intercalation avec l'ADN, d'alkylation ou d'inhibition des protéines et des enzymes comme les topoisomérases [(Plyta et coll., 1998) ; (Pierpont, 2001)]. Ces deux composés peuvent être considérés pour le développement de nouveaux agents antibactériens.

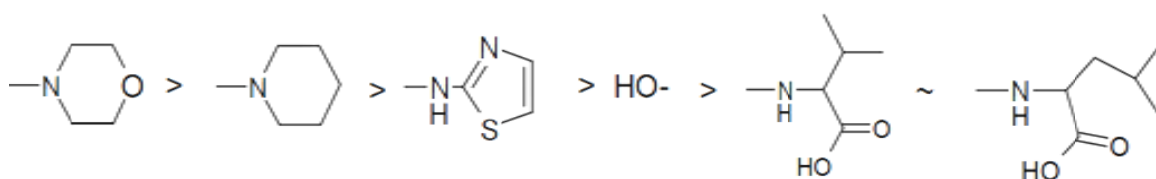
- La comparaison entre les résultats de la lawsone et les composés de la série I, nous permet de conclure que les composés de la série I ont, en général, des niveaux d'inhibition microbienne peu intéressants et que l'activité antibactérienne de ces derniers est liée aux fonctions cétones en position 2 et 4. Il est donc recommandé de garder les fonctions cétones en position 2 et 4 libres et de greffer des substituants actifs sur les positions 2 ou 3 du noyau NPQ.

La synthèse des composés de la série II, analogues structuraux de la lawsone, a eu un effet remarquable sur leur activité antibactérienne. La lawsone, qui dispose d'un groupe hydroxyle dans la position 2, montre une activité plus faible que le composé **c1** et **b1**.

En plus, les composés **b2**, **b3** et **c3** ne montrent aucune inhibition vis-à-vis des bactéries, ce qui confirme que les groupes cétones libres en position 1 et 4 sont nécessaires pour l'activité antibactérienne. Le groupe amine ($-\text{NH}_2$) en position C-2 est une caractéristique structurale importante, étant donné que le composé **c1** a une activité plus forte que leurs homologues, lawsone et dichlone **a** (qui n'ont pas de groupe aminé en position C-2). Le substituant morpholine joue un rôle dans l'activité montrée par les dérivés **a1** et **b1**, composés qui possèdent des extrémités cétones 1,2 et 1,4 libres. L'addition d'un groupe hydroxyle sur la position C-2 de la structure 1,4-naphtoquinone (pour former la lawsone) entraîne une perte importante d'activité, où les valeurs des CMI sont supérieures ou égales à 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La dichlone (qui a deux groupes chloro dans la position C-2 et C-3) avait une activité légèrement plus élevée que le composé **c1**.

La comparaison entre l'activité antimicrobienne des dérivés 1,2 NPQs avec celle des dérivés 1,4 NPQs ne nous a pas permis de mettre en évidence des conclusions cohérentes. Certains dérivés-1,2 NPQs sont actifs (**b1**), tandis que d'autres (**a1**) le sont moins. Toutefois, l'introduction du substituant carbonitrile (**c3**) entraîne une diminution de l'activité antibactérienne (par rapport au dérivé **c4**), bien que ces deux composés ne possèdent aucun substituant en position C-2. Un tel comportement pourrait être expliqué par l'effet électronique positif exercé par le carboxylate, une longue chaîne directement liée au noyau furane.

- Dans les composés de la série II les plus actifs, la présence de la structure di-cétonique est essentielle pour l'activité antibactérienne. Le comportement électrochimique des différentes classes des NPQs a fait l'objet de plusieurs études. Dans le cas particulier des hydroxyquinones, la possibilité de stabilisation du radical anion électrogénéré par la liaison hydrogène intramoléculaire provoque un déplacement des potentiels de réduction à des valeurs moins négatives [(Ashnagar *et coll.*, 1986) ; (Crawford *et coll.*, 1996)], un fait qui peut-être, dans certains cas, fondamental en ce qui concerne l'activité biologique (Crawford *et coll.*, 1996). Par ailleurs, dans l'étude réalisée par Stasevych *et coll.*, (2006), l'activité antimicrobienne des NPQs substitués en position 2 diminue dans l'ordre de substitution suivant :



De plus, la diminution de l'activité observée dans les composés **a1** et **b3** peut être liée à la présence du substituant isoquinoléine hydrophile, car l'hydrophobicité élevée entraîne une perte d'activité biologique (Gershon et Shanks, 1975).

Il est intéressant de noter que les quinones couplées avec les hétérocycles, particulièrement azanaphthoquinones et azanthraquinones, sont impliquées dans de nombreux processus biochimiques en raison de leurs oxydo-réduction facile. De ce fait, ils jouent un rôle important dans le processus de transfert électronique ainsi que dans la phosphorylation oxydative. Ceci a eu comme effet l'amélioration de l'activité antibactérienne et antifongique (Billert *et coll.*, 1997).

Les études réalisés sur l'activité antimicrobienne des 1,4 NPQs montrent que le greffage des groupements électro-donneurs (ou groupements électro-attracteurs faibles) à la position C-2 ou C-3, peut améliorer l'activité antimicrobienne [(Ambrogi *et coll.*, 1970) ; (Gershon et Shanks, 1975); (Mostefa-Kara *et coll.*, 2010)]. Une explication de ce comportement est liée à l'effet électronique des groupes liés directement au noyau NPQ. Cet effet est attribué au renforcement de la liaison l'hydrogène, ce qui permet une liaison plus forte à son site d'action.

Les travaux de Garner et ses collaborateurs (1996) réalisés sur l'activité antimicrobienne des 1,4 NPQs indiquent que les composés actifs doivent posséder au moins une substitution en position 2 ou 3, qui soit un électro-donneur (qui libère des électrons) ou un groupe attracteur d'électrons faible. Cependant, un excès du caractère hydrophile entraîne une perte d'activité étant donné que le coefficient de partage huile/eau doit être adéquat pour l'activité de ce composé (Gafner *et coll.*, 1996).

La question concernant le mécanisme de l'activité antimicrobienne des dérivés naphthoquinones et les exigences structurelles pour l'explication de ce type d'activité ne sont pas tout à fait résolues. Des conclusions générales sur la relation structure/ activité peuvent être tirées à partir de nos résultats et des études antérieures. L'ordre de substitutions électronégatif (Cl > O > N > C) en position 2 dans la structure 1,4 NPQ diminue ou inhibe l'activité antimicrobienne.

- Un total de 19 composés (série I et II) a été testé vis-à-vis de huit bactéries à gram négatif et de quatre bactéries à gram positif. Tous les composés testés montrent au moins une activité antibactérienne. Les résultats de cette étude nous permettent de dire que les substituants amine et hydroxyle contribuent largement à l'activité antibactérienne des composés naphthoquinones. Le criblage réalisé est une première étape afin de tirer des

conclusions définitives sur le mécanisme d'action des NPQs ou d'identifier les caractéristiques structurelles spécifiques associés à l'activité antibactérienne.

- L'évaluation de l'activité antifongique des composés de la série II montre des résultats qui sont nettement meilleurs que ceux obtenus avec les composés de la série I. Les composés **a**, **a1** et **a2** qui renferment des fonctions cétones 1,4 libres, le chlore ou le fragment morpholine dans leur structure sont les plus actifs vis-à-vis des levures et des moisissures testées (par comparaison au autres composés qui ont d'autres substituant en positions 2 et 3 ou ceux dont les fonctions cétones 1,4 sont engagées).

- La lawsone montre des inhibitions totales de la croissance mycélienne vis-à-vis de toutes les souches de moisissures utilisées. Les activités antifongiques les plus basses de tous les composés synthétisés étaient obtenues par les composés **b1**, **b2**, **b3**, **c1**, **c2**, **c3** et **c4** vis-à-vis de toutes les souches de moisissures et levures. Des principes semblables de la relation structure/ activité ont été observés dans nos études précédentes réalisées avec les bactéries. Toutefois, la dichlone (**a**) n'a révélé aucune activité antibactérienne, alors qu'elle a montré une activité antifongique semblable à celle de la lawsone vis-à-vis des moisissures. Cette activité est 16 fois plus élevée que celle de la lawsone vis-à-vis des levures. La lawsone montre une activité remarquable vis-à-vis des quatre moisissures, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *penicillium sp.*

Le groupe amine ($-NH_2$) en position C-2 ne semble pas être une caractéristique structurelle importante dans l'activité antifongique, comme **c1** avait une activité minime par rapport à leurs homologues, lawsone et dichlone **a** (qui n'ont pas de groupe aminé en position C-2). Ainsi, la position des fonctions cétones en C-1 et C-2 et de la fonction morpholine en position 4 semble influencer énormément l'activité antifongique du noyau NPQ.

L'ordre de substitution électronégatif ($Cl > N > O > Cl$) en position 2 dans la structure 1,4 NPQ améliore l'activité antifongique vis-à-vis des moisissures et des levures. L'introduction du substituant carbonitrile (composé **c3**) dans la position (C-2) diminue l'activité antifongique (comparativement aux résultats obtenus avec la lawsone, **a** et **a1**). Nos résultats rejoignent ceux de Cowan (1999), qui précise que les dérivés naphtoquinones possèdent une activité antimicrobienne et que le pôle di-cétone en position 1 et 4 est le responsable principal de l'altération des fonctions vitales des microorganismes. Cette altération se manifeste par la faculté à se lier aux adhésines, aux polypeptides membranaires et aux enzymes.

- La synthèse a contribué à l'amélioration de l'activité antibactérienne et antifongique comparativement aux résultats obtenus avec la lawsone. Ces résultats peuvent aider davantage à comprendre et à développer des composés antimicrobiens ayant un noyau NPQ dans leur structure. Les études de la cytotoxicité affirmeront l'intérêt biologique probable de cette classe de composés.

- En considérant l'utilisation de ces composés en médecine humaine, l'étude des propriétés d'hémolyse et de néphrotoxicité des composés actifs doit être faite à un stade précoce, compte tenu de la sensibilité de l'être humain à l'hémolyse et la néphrotoxicité de ces substances (Devecioglu *et coll.*, 2001) et le fait que certaines personnes peuvent être particulièrement vulnérables à leur action hémolytique (Raupp *et coll.*, 2001). Dans ce sens, la FDA recommande d'évaluer les seuils hémolytiques potentiels des composés administrés dans le corps humain (FDA, 2005). L'activité hémolytique des naphthoquinones peut être donc un inconvénient grave pour la poursuite du développement pharmaceutique des produits de synthèses. Les naphthoquinones sont connues pour présenter des activités cytotoxiques et hémolytiques qui sont fortement corrélées à la nature des substituants et des fonctions cétones libres (Chung *et coll.*, 2007).

- Les résultats obtenus à l'issue de l'évaluation de l'activité hémolytique des dérivés naphthoquinones permettent de dire que le greffage des groupements électro-attracteurs (ou groupements électro-donneurs faibles) sur les 1,4 NPQs à la position C-2 ou C-3, diminue l'activité antimicrobienne et la toxicité. L'ordre de substitutions électronégatives ($C > N > O > Cl$) en position 2 dans la structure 1,4 NPQ diminue l'activité hémolytique des dérivés NPQs. Le substituant morpholine présente un rôle majeur dans la diminution de la réactivité des dérivés **a1** et **b1**, composés qui ont des extrémités cétones 1,2 et 1,4 libres. Les propriétés nucléophiles et basiques de la morpholine exercent un effet bénéfique sur le noyau NPQ permettant ainsi de minimiser son effet toxique. L'introduction du substituant carbonitrile dans le dérivé **c4** entraîne non seulement une diminution de l'activité antibactérienne mais aussi une diminution du caractère toxique. L'effet hémolytique moyen révélé par le dérivé **a2** peut être expliqué par la présence du chlore en position C-2 et la nature du substituant greffé en C-3 qui est un isoquinoléine. Ce dernier, par son hydrophobicité élevée, entraîne une perte d'activité biologique et de ce fait diminue son réactivité vis-à-vis des globules rouges.

Nos résultats sont en corrélation avec ceux d'une étude qui a montré que les composés atovaquone, parvaquone et ménadione (figure N° 19 voir annexe I) étaient très cytotoxiques

vis-à-vis de l'espèce *Daphnia magna*. Une fraction hydrophobe, commune entre ces trois composés, a été notée dans la position C-2, tandis que le 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone qui a un groupe hydrophile en position C-2 avait la toxicité la plus basse vis-à-vis de l'espèce *Daphnia magna* (Song *et coll.*, 2011).

Dans une étude réalisée par Klaus *et coll.*, (2010), la lawsone, la 1,4-naphtoquinone, la 2-méthyl-1,4-naphtoquinone, la juglone, le plumbagin et le lapachol ont été étudiés pour leur cytotoxicité vis-à-vis de kératinocytes humains. Les composés 1,4-naphtoquinones, ménadione, juglone et la plumbagin étaient très cytotoxiques et induisaient fortement la formation d'espèces réactives d'oxygène et détruisaient la glutathion cellulaire. Cependant ni la lawsone ni le lapachol n'étaient cytotoxiques dans ces tests.

Le mécanisme du stress oxydatif se fait par une réduction du noyau quinone (avec ou sans la présence d'un hydroxyle en position 2) en semiquinone. Cela pourrait engendrer une réduction en un naphthalènediol qui est démontré par Flueraru *et coll.*, (2005) pour être cytotoxique uniquement dans le cas où il peut être recyclé en une quinone. La forme d'une semiquinone pourrait toutefois agir comme un pro-oxydant en donnant un deuxième d'hydrogène (ou électrons puisque la semiquinone possède un pKa faible), conduisant finalement à une quinone Q.

La présence d'une fonction cétone sur la position 4 semble être donc nécessaire pour l'activité des 1,4 NPQs. Dans notre cas, les composés de la série I possèdent un groupe hydroxyle sur la position 2, avec une cétone convertie en alcène sur la position 4. Durant la première réduction, ces composés devraient produire une moitié naphtol qui ne va pas être recyclée sous forme d'une cétone. Ceci prouve l'implication du cycle redox dans le centre du mécanisme. Si toutefois, le mécanisme le plus répandu implique le système des monooxygénases à cytochromes P-450, il serait en théorie conduit à un métabolite mutagène, qui pourrait être démontré. La question d'une possible corrélation entre l'activité antibactérienne et cytotoxiques reste toutefois pas très claire, même si Awadh *et coll.*, (2001) a suggéré l'absence de toute relation.

- La synthèse des 2-aminopyridines et 2-pyridones ne nous a pas permis de déceler des dérivés ayant une activité antimicrobienne, qu'elle soit antibactérienne ou antifongique. Cependant, l'initiative de l'association de ces composés avec certains dérivés naphtoquinones nous a permis de conclure une éventuelle synergie entre ces composés ou même une influence

des dérivés 2-aminopyridines et 2-pyridone sur l'activité du noyau naphthoquinone résultat déjà obtenu avec le dérivé **a2**.

Dans l'étude réalisée par Page *et coll.*, (2010), différents composés disposant d'un noyau 2-pyridone ont fait l'objet d'un criblage de leur activité antibactérienne vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes à gram négatif multi-résistantes telles qu'*Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*. LeBAL 30072, un composé parmi ces dérivés montre une CMI égale à 8 µg/ mL vis-à-vis d' *Acinetobacter baumannii* et 0,125 µg/ mL vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. Des études antérieures ont montré que l'activité antibactérienne attribuée aux dérivés des pyridones est due à la présence du noyau 2-pyridone [(Ahmed et Ismail, 2008) ; (El-Mariah et Nassar, 2008)]. Dans une autre étude, El-Mariah et Nassar, ont testé une série de dérivés carbomethoxy-2-pyridone qui contient une moitié sulfonamide. Ces dérivés ont révélé des activités intéressantes vis-à-vis des *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*. Cependant ces mêmes dérivés étaient inactifs vis-à-vis de *Candida albicans* et d'*Aspergillus niger* (El-Mariah et Nassar, 2008).

Enfin, plusieurs travaux ont rapporté que les dérivés 2-aminopyridines possèdent diverses activités pharmacologiques surtout vis-à-vis de d'un récepteur de facteur de croissance épidermique-tyrosine kinase et comme inhibiteurs de la dihydrofolateréductase [(Thompson *et coll.*, 1997) ; (Motta, 2009)].

Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus ne nous ont pas permis de tirer les conclusions plus approfondies sur le mécanisme d'actions des NPQs ou d'identifier les caractéristiques structurales spécifiques associées à l'effet antimicrobien, mais nous ont confirmé que les NPQs possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches évaluées dans ce travail.

L'extrait brut d'éthanol induit une inhibition totale de la croissance mycélienne de la souche *Fusarium oxysporum*.

Ce travail nous a permis de mettre au point des composés moins cytotoxiques (**b1** et **c1**) que la lawsone. Le greffage des groupements électro-attracteurs à la position C-2 ou C-3 diminue la cytotoxicité des naphthoquinones. L'ordre de substitutions électronégatives en C-2 et la présence du substituant morpholine diminue l'activité hémolytique des dérivés NPQs.

En revanche, les dérivés 2-aminopyridines et 2-pyridones n'ont montré aucune activité antimicrobienne. Ce que nous n'avons pas pu expliquer. Une nouvelle stratégie de synthèse de ces composés devrait être mise au point probablement par l'assemblage des noyaux pyridine ou pyridine avec les structures NPQs.

Pour compléter cette étude, il serait souhaitable de :

- Etudier l'association avec d'autres antibiotiques en tant qu'agents perméabilisants.
- Déterminer les requis structuraux pour les différentes activités.
- Envisager une utilisation des produits actifs comme des désinfectants ou même des pommades.
- Voir la potentialité de ces composés dans différents modèles de cellules à savoir les cellules cancéreuses, *in vitro*.
- Utiliser la lawsone et des composés moins actifs par voie locale ou sous forme d'aérosol.
- Etudier l'effet de l'extrait éthanol sur d'autres souches comme les dermatophytes systémiques ou mycoses.
- Etudier les composés actifs sur des modèles *in vivo*.

Références bibliographiques

- [1]. **Abreu F.C., Ferraz P.A. et Goulart M.O. (2002).** Some applications of electrochemistry in biomedical chemistry. Emphasis on the correlation of electrochemical and bioactive properties. *J. Braz.Chem. Soc.* 13: 19–35.
- [2]. **Agarwal S.R., Ghatak S.N. et Dhingra D.R. (1959).** Chemical examination of the seed oil of *Lawsonia alba*. *Indian Oil Soap J.*, 25: 145-149.
- [3]. **Ahmad I., Aqil F. et Owais M. (2006).** *Modern Phytomedicine*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [4]. **Ahmed S.M. et Ismail D.A. (2008).** Synthesis and Biological Activity of 8-Hydroxyquinoline and 2-Hydroxypyridine Quaternary Ammonium Salts. *J. Surfactants Deterg.* 11: 231-235.
- [5]. **Ahmed S., Rahman A., Alam A., Saleem M., Athar M. et Sultana S. (2000).** Evaluation of the efficacy of *Lawsonia alba* in the alleviation of carbon tetrachloride-induced oxidative stress. *J. Ethnopharmacol.* 69: 157-64.
- [6]. **Akiola O.O., Isiaka A.O., Tameka M.W. et William N.S. (2007).** Study on the essential oil of *Lawsonia inermis* (L) Lythraceae. *J. Essent. Oil Bear. P.* 10: 184-188.
- [7]. **Akroum S., Satta D. et Lalaoui K. (2009).** Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical screening of some Algerian plants. *Eur. J. Sci. Res.* 31(2): 289-295.
- [8]. **Ali B.H., Bashir A.K. et Tanira M.O., (1995).** Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic effects of *Lawsonia inermis* L (henna) in rats. *Pharmacol.* 51: 356–63.
- [9]. **Ambrogi V., Artini D., De Carneri I., Castellino S., Dradi E., Logemann W., Meinardi G., Di Somma M. et Tosolini G. (1970).** Studies on the antibacterial and antifungal properties of 1,4-naphthoquinones. *Br. J. Pharmacol.* 40: 871-880.
- [10]. **Amr A.E. et Abdulla M.M. (2006).** Anti-inflammatory profile of some synthesized heterocyclic pyridone and pyridine derivatives fused with steroidal structure. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 4341–4352.
- [11]. **Arenas P. (1987).** Medicine and magic among the Maka Indians of the Paraguayan Chaco. *J. Ethnopharmacol.* 21: 279–295.
- [12]. **Ashnagar A., Bruce J.M., Dutton P.L. et Prince R.C. (1984).** One- and two-electron reduction of hydroxy-1,4-naphthoquinones and hydroxy-9,10-anthraquinones. The role of internal hydrogen bonding and its bearing on the redox chemistry of the anthracycline antitumour quinones. *Biochim. Biophys. Acta.* 801: 351-359.

- [13]. Atal C.K., Srivastava J.B., Wali B.K., Chakraborty R.B., Dhawan B.N. et Rastogi R.P. (1978). Screening of Indian plants for biological activity. Part VIII. *Indian J. Exp. Biol.* 16: 330-349.
- [14]. Awadh-Ali N.A., Juelich W.D., Kusnick C. et Lindequist U. (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *J. Ethnopharmacol.* 74:173–9.
- [15]. Babula P., Mikelova R., Adamb V., Kizek R., Havel L. et Sladky Z. (2006). Using of liquid chromatography coupled with diode array detector for determination of naphthoquinones in plants and for investigation of influence of pH of cultivation medium on content of plumbagin in *Dionaea muscipula*. *J. Chromatogr. B.* 842: 28–35.
- [16]. Badri B. M. et Burkinshaw S. M. (1993). Dyeing of wool and nylon 6.6 with henna and lawsone. *Dyes Pigm.* 22: 15-25.
- [17]. Bakkali A.T., Jaziri M., Foriers A, Vander Heyden Y., Vanhaelen M. et Homes J. (1997). Lawsone accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*. *Plant. Cell. Tiss. Org.* 51: 83–87.
- [18]. Bastien J.W. (1983). Pharmacopeia of Qollahuaya Andeans. *J. Ethnopharmacol.* 8: 97–111
- [19]. Ben M'Rad S., Merai S., Grairi H., Yaalaoui S., Tritar F. et Djenayah F. (2004). Allergie immédiate au henné pur. *Rev. Fr. Allergol.* 44: 159–160.
- [20]. Benabdallah M. 2012. Préparation et étude de la réactivité de quelques dérivés de naphthoquinones en vue de leurs applications biologiques potentielles. Thèse de doctorat, Université Abou-BekrBelkaid-Tlemcen.
- [21]. Berg V., Sellstedt M., Hedenstrom M., Pinkner J.S., Hultgren S.J. et Almqvist F. (2006). Design, synthesis and evaluation of peptidomimetics based on substituted bicyclic 2-pyridones—Targeting virulence of uropathogenic *E. coli*. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 7563–7581.
- [22]. Bernardino A.M.R., Da Silva P.L.C., Rodrigues C.R., Loureiro N.I., Castro H.C., Lanfredi-Rangel A., Sabatini-Lopes J., Borges J.C., Carvalho J.M., Romeiro G.A., Ferreira V.F., Frugulhetti I.C.P.P. et Vannier-Santos M.A. (2006). Design, synthesis, SAR, and biological evaluation of new 4-(phenylamino)thieno[2,3-b]pyridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 14(16): 5765-70.
- [23]. Bhardwaj D.K., Murari R., Seshadri T.R. et Singh R. (1976). Lacoumarin from *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry.* 15:1789.

- [24]. **Bhuvaneswari K., Gnana P.S., Kuruvilla A. et Appala R.B. (2002)**. Inhibitory concentrations of *Lawsonia inermis* dry powder for urinary pathogens. *Indian J. Pharmacol.* 34: 260-263.
- [25]. **Billert T., Beckert R., Fehling P., Doring M. et Gorls H. (1997)**. A new synthetic entry to fused azaquinones by a cycloaddition/ ring transformation sequence starting from pyrido[1,2-a]pyrazines. *Tetrahedron.* 15: 5455-5462.
- [26]. **Bodor E.T. et Offermanns S. (2008)**. Nicotinic acid: an old drug with a promising future. *Br. J. Pharmacol.* 53: 68-75.
- [27]. **Boizot N. et Charpentier J.P. (2006)**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration génétique et physiologie Forestières, Laboratoire d'analyses biochimiques, le cahier des technique de l'INRA, P 79, 80.
- [28]. **Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G. et Monks T.J. (2000)**. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 135–160.
- [29]. **Boschelli D.H., Connor D.T. et Bornemeier D.A.D. (1993)**. 1,3,4-Oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole analogs of the fenamates: *In vitro* inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activities. *J. Med. Chem.* 36: 1802-1810.
- [30]. **Bouboulis D.A., Rubinstein A., Shliozberg J., Madden J. et Frieri M. (1995)**. Cerebral toxoplasmosis in childhood and adult HIV infection treated with 1-4 hydroxynaphthoquinone and rapid desensitization with pyrimethamine. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 74(6): 491-4.
- [31]. **Brown B.G et Zhao X.Q.(2008)**. Nicotinic acid, alone and in combinations, for reduction of cardiovascular risk. *Am. J. Cardiol.* 101 (8A): 58-62.
- [32]. **Bruneton J. (1993)**. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Technique & documentation, Lavoisier, Paris. p:107-109.
- [33]. **Brunmark A. et Cadenas E. (1989)**. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free. Rad. Biol. Med.* 7: 435–477.
- [34]. **Butler M.S.(2008)**. Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 25: 475–516.
- [35]. **Bryskier A.(1999)**. Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques. *Ed Ellipses.* p: 75-76.
- [36]. **Chakrabartty T., Poddar G. et Pyrekt J.S., (1982)**. Isolation of dihydroxylupene And dihydroxylupane from the bark of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry.* 21: 1814-1816.

- [37]. **Chung Y., Yoo J., Park S., Kim B.H., Chen X., Zhan C. et Cho H. (2007).** Dependence of antitumor activity on the electrophilicity of 2-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives. *Bull. Korean Chem. Soc.* 28 (4): 691-694.
- [38]. **Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI. (2009).** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. CLSI document. M07-A8. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- [39]. **Cocco M.T., Congiu C. et Onnis V. (2000).** Synthesis and antitumour activity of 4-hydroxy-2-pyridone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 35: 545–552.
- [40]. **Constantino L. et Barlocco D. (2006).** Privileged structures as leads in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* 13: 65–85.
- [41]. **Cowan M.M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564–582.
- [42]. **Crawford P.W., Carlos E., Ellegood J.C., Cheng C.C., Dong Q., Liu D.F. et Luo Y.L. (1996).** The electrochemistry of antineoplastic furanquinones: Electrochemical properties of Benzo[b]naphtho[2,3-d]furan-6,11-dione derivatives. *Electrochim. Acta* 41: 2399-2403.
- [43]. **Croteau R., Kitchan T.M. et Lewis N.G. (2000).** Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, M.D.: American society of plant physiologists; 24:1250-1251.
- [44]. **Cuendet M. (1999).** Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : *Fagraea blumei* (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : *Bartsia alpina* (Scrophlariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) et *Campanula barbata* (Campanulaceae). Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, p. 24
- [45]. **David T.N. (1968).** A study of the effects of pyridinolcarbamate (p-23) on angina pectoris. *J. Clin. Pharm.* 8: 259-267.
- [46]. **De Mello H., Echevarria A., Bernardino A.M., Canto-Cavalheiro M. et Leon L.L. (2004).** Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: synthesis and structure-activity relationship analysis. *J. Med Chem.* 47(22):5427-32.
- [47]. **Devecioglu C., Katar S., Dogru O. et Tab M.A. (2001).** Henna-induced hemolytic anemia and acute renal failure. *Turk. J. Pediatr.* 43: 65–66.

- [48]. **Dixit S.N., Srivastava H.S. et Tripathi R.D. (1980).** Lawsone, the antifungal antibiotic from the leaves of *Lawsonia inermis* and some aspects of its mode of action. *Indian Phytopathol.* 31: 131-133.
- [49]. **Dollé V., Fan E., Nguyen C.H., Aubertin A.M., Kirn A., Andreola M.L., Jamieson G., Tarrago-Litvak L. et Bisagni E. (1995).** A new series of pyridinone derivatives as potent non-nucleoside human immunodeficiency virus type 1 specific reverse transcriptase inhibitors. *J. Med. Chem.* 38:4679-4686.
- [50]. **Dweck A.C. (2002).** Natural ingredients for colouring and styling. *International Journal of Cosmetic Science.* 24. 287-302.
- [51]. **El-demerdash F.M., Yousef M.I. et Zoheir M.A. (2005).** Stannous chloride induces alterations in enzyme activities, lipid peroxidation and histopathology in male rabbit: Antioxidant role of vitamin C. *Food. Chem. Toxicol.* 43:1743–1752.
- [52]. **El-Mariah F. et Nassar E. (2008).** Synthesis and antimicrobial of some novel-5-carbomethoxy-2-pyridone derivatives containing sulfonamide moiety. *Phosphorus Sulfur.* 183 (12): 3145-3155.
- [53]. **FDA. (2005).** Guidance for industry - Nonclinical studies for the safety evaluation of pharmaceutical excipients.
- [54]. **Epifano F., Genovese S., Menghini L. et Curini M. (2007).** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry.* 68:939-953.
- [55]. **Epsinel-ingroff A. (2007).** Standardized disk diffusion method for yeasts. *Clin. Microbiol. Newsl.* 29: 97-100.
- [56]. **Finke P.E., Meurer L.C., Debenham J.S., Toupençe R.B. et Walsh T.F. (2007).** Cannabinoid CB1 receptor antagonists in therapeutic and structural perspectives. *US. Patent.* 90-153.
- [57]. **Flueraru M., Chichirau A., Chepelev L.L., Willmore W.G., Durst T., Charron M., Barclay L.R.C., Wright J.S. (2005).** Cytotoxicity and cytoprotective activity in naphthalenediols depends on their tendency to form naphthoquinones. *Free Radical Biol. Med.* 39, 1: 368-77.
- [58]. **Franco R., Li S., Rodriguez-Rocha H., Burns M. et Mihalís I. P. (2010).** Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-Biological Interactions,* 188, 2: 289-300.

- [59]. Gafner S., Wolfender J.L., Nianga M., Stoeckli-Evans H. et Hostettmann K. (1996). Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia leavis* roots. *Phytochemistry*. 42: 1315-1320.
- [60]. Gbolade A.A. (2009). Inventory of antidiabetic plants in selected districts of Lagos State, Nigeria. *Journal of Ethnopharmacol.* 121: 135–139.
- [61]. Geddes A. (2005). The future of infectious diseases. *Antibiotiques*, 7: 75-76.
- [62]. Gehin A., Guyon C. et Nicod L. (2006). Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22: 27–34.
- [63]. Gershon, H. et Shanks L. (1975). Fungitoxicity of 1,4- naphthoquinones to *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Can. J. Microbiol.* 21: 1317-1321.
- [64]. Goulart M.O., Falkowski P. Ossowski T. et Liwo A. (2003). Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. *Bioelectrochemistry*.59: 85–87
- [65]. Grotzinger E. et Campbell M.I. (1972). Intermediate symmetry in Lawsone biosynthesis. *Phytochemistry*. 11: 675 - 679.
- [66]. Grotzinger E. et Campbell M.I. (1974). 4-(2'-carboxyphenyl)-4-oxobutyrate: an obligatory intermediate in lawsone biosynthesis. *Phytochemistry*. 13: 923 -926.
- [67]. Guerrier C.J.W., Abdulwahab A., Basr N. et Revill S. (1988). Henna as an antimicrobial agent. *Int. J. Cosmetic Sci.* 10: 131-136.
- [68]. Guérin M., Leduc M.M. et Azerad R.G. (1970). Biosynthèse du noyau naphthoquinonique des menaquinones bactériennes. *Eur. J. Biochem.* 15: 421-427.
- [69]. Gupta S., Ali M., Alam M., Niwa M. et Sakai T. (1992). 24,β ethylcholest-4-en-3β-ol from the roots of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*.31: 2558 -2560.
- [70]. Habbal O.A., Al-Jabri A.A., El-Hag A.H., Al-Mahrooqi Z.H. et Hashmi N.A. (2005). In-vitro antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* Linn (henna). A pilot study on the Omani henna. *Saudi. Med. J.* 26: 69-72.
- [71]. Hatcher P.E. (2003). Biological Flora Of The British Isles: *Impatiens noli-tangere* L. *J. Ecol.* 91: 147–167.
- [72]. Hazra B., Das Sarma M. et Sanyal U. (2004). Separation methods of quinonoid constituents of plants used in Oriental traditional medicines. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 812: 259–275.
- [73]. Hillard E.A., Abreu F.C., Ferreira D.C., Jaouen G., Goulart M.O. et Amatore C. (2008). Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. *Chem. Commun.* 23: 2612–2628.

- [74]. Hoffmann O., Ostenhof W. et Krappup O. (1947). Bacteriostatic quinones and other antibiotics. *Monatsh. Chem.* 77: 86–96.
- [75]. Jallad K.N. et Espada-Jallad C. (2008). Lead exposure from the use of *Lawsonia inermis* in temporary paint-on-tattooing and hair dying. *Sci. Total. Environ.* 397: 244-250.
- [76]. Jelly R., Lewis S.W., Lennard C., Lim K.F. et Almog J. (2008). Lawsone: a novel reagent for the detection of latent fingerprints on paper surfaces. *Chem. Commun.* 14, (30): 3513–3515.
- [77]. Kamal A., Shankaraiah N., Devaiah V., Laxma R.K., Juvekar A., Sen S., Kurian N. et Zingde S. (2008). Synthesis of 1,2,3-triazole-linked pyrrolobenzodiazepine conjugates employing 'click' chemistry: DNA-binding affinity and anticancer activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (4): 1468-73.
- [78]. Kathem A.K., Jaber N.N., Al-Mhaawe B.H. et Alrubaiy L.K. (2008). Antimicrobial efficacy of henna extracts. *Oman Medical Journal.* 23 (4): 252-256.
- [79]. Khare C.P. (2007). Indian medicinal plants. *Springer Science, BusinessMedia, LLC.*
- [80]. Kibou Z. (2013). Nouvelles voies de synthèse des hétérocycles azotés dans les conditions de la « chimie verte » : Application aux 2-Pyridones, 1-Aminopyridines et Chroménopyridines. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences. Université AbouBekr Belaid-Tlemcen.
- [81]. Kirkland D. et Marzin D. (2003). An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of henna. *Mutat. Res.* 537 (2): 183-99.
- [82]. Klaus V., Hartmann T., Gambini J., Graf P., Stahl W., Hartwig A. et Klotz L. (2010). 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 496: 93–100.
- [83]. Kozikowski A.P., Campiani G., Sun L.Q., Wang S. et Saxena A. (1996). Doctor, B. Identification of a more potent analogue of the naturally occurring alkaloid huperzine A. Protective molecular modeling of its interaction with AChE. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 11357-11362.
- [84]. Kubinyi H. (1993). *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*. New York: VCH Publishers.
- [85]. Kulkarnatak M.V., Patil V.D., Biradar V.N. et Nanjappa S. (1981). Synthesis and biological properties of some 3-heterocyclic substituted coumarins. *Arch. Pharm. Chem. Life. Sci.* 314: 435-439.

- [86]. Kumagai Y., Shinkai Y., Miura T. et Cho A.K. (2011). The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52: 221-247.
- [87]. Kurakane S. et Igarashik. K. (2006). A radical scavenging compound, 3-pyridinol, in instant coffee and its hepatoprotective activity. *Food Sci. Technol. Res.* 12: 148-151
- [88]. Lee J.Y., Cho P.Y., Kim T.Y., Kang S.Y., Song K.Y., et Hong S.J. (2002). Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 1238–1244.
- [89]. Malekzadeh F. et Shabestari P. P. (1989). Therapeutic effects and *in vitro* activity of an extract from *Lawsonia inermis*. *J. Sci. Islam. Repub. Iran.* 1: 7-12.
- [90]. Milcent R. et Chau F. (2003). Chimie organique hétérocyclique. EDP Sciences.
- [91]. Monks T.J., Hanslik R.P., Cohen G.M. et Ross D. (1992). Graham, D.G. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112: 2–16.
- [92]. Monks T.J. et Jones D.C. (2002). The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Curr. Drug Metab.* 3: 425–438.
- [93]. Mont N., Teixidó J. et Borrell J.I. (2009). A diversity oriented, microwave assisted synthesis of N-substituted 2-hydro-4-amino-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. *Mol. Divers.* 13 (1): 39-45.
- [94]. Morello A., Pavani M., Garbarino J.A., Chamy M.C., Frey C., Mantilla J., Guerrero A., Repetto Y. et Ferreira J. (1995). Effects and mode of action of 1,4-naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilison* tumoral cells and *Trypanosoma parasites*. *Camp. Biochem. Physiok.* 112: 119-128.
- [95]. Mostefa-Kara B., Ziani-Cherif C., Benabdallah M., Rahmoun N.M., Villemin D., Choukchou-Braham N. et Boucherit K. (2010). New chemical tools for the assessment of hemolytic anemia induced by naphthoquinones. *Der Pharma Chemica.* 2: 14-21.
- [96]. Motta C.L., Sartini S., Tuccinardi T., Nerini E., Settimo F.D., et Martinelli A. (2009). Computational studies of epidermal growth factor receptor: docking reliability, three-dimensional quantitative structure/activity relationship analysis, and virtual screening studies. *J. Med. Chem.* 52 (4): 964-975.
- [97]. Muhammad H. S. et Muhammad S. (2005). The use of *Lawsonia inermis* linn. (henna) in the management of burnwound infections. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 934-937.
- [98]. Munday R. (2000). Autoxidation of naphthoquinones: Effects of pH, naphthoquinones and superoxide dismutase. *Free Rad. Res.* 32: 245–253.

- [99]. Munday R., Smith B.L. et Munday C.M. (2007). Structure-activity relationships in the haemolytic activity and nephrotoxicity of derivatives of 1,2- and 1,4-naphthoquinone. *J. Appl. Toxicol.* 27: 262–269.
- [100]. National Clinical Committee Laboratory Standards-NCCLS. (2006). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; *Approved Standard Ninth Edition*; 26. M2-A9.
- [101]. Natarajan M.R. et Lalitha D.K. (1987). Leaf extracts of *Lawsonia inermis* as antifungal agent. *Curr. Sci.* 56: 1021-1022.
- [102]. Newman D.J. et Cragg G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J.Nat. Prod.* 70: 461–477.
- [103]. Nikam T.D. et Savant R.S. (2009). Multiple shoot regeneration and alkaloid cerpegin accumulation in callus culture of *Ceropegia juncea* Roxb. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 15 (1): 71-77.
- [104]. O'Brien P.J. (1991). Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 80: 1–41.
- [105]. OMS, (2002). The World Health Report. *Reducing risks, promoting healthy life.* Geneva, World Health Organisation.
- [106]. OMS. (2008). Rapport sur la santé dans le monde. Les soins de santé primaires: maintenant plus que jamais. http://www.who.int/whr/2008/08_report_fr.pdf
- [107]. Organisation de Coopération et de Développement Économiques-OCDE. (2002). Rapport sur les maladies infectieuses. Biotechnology for infectious diseases: addressing the global needs.
- [108]. Orth G. et Sansonetti P. (2006). La maîtrise des maladies infectieuses: un défi de santé publique, une ambition médicocientifique. Rapport sur la science et la technologie N° 24. Académie des sciences, France.
- [109]. Osadchii O.E. (2007). Pyridazinone derivatives: design, synthesis, and *in vitro* vasorelaxant activity. *Cardiovasc. drugs. Ther.* 21: 171-194.
- [110]. Otten L. S. et Rosazzag P. J. (1983). Oxidative ring fission of the naphthoquinones lapachol and dichloroallyl lawsone by *Penicillium notatum*. *J. Biol. Chem.* 258: 1610-1613.
- [111]. Page M.G., Dantier C. et Desarbre E. (2010). *In vitro* properties of BAL30072, a novel siderophore sulfactam with activity against multiresistant gram-negative Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 2291-302.

- [112]. **Paniker U. et Levine N. (2001)**. Dapsone and sulfapyridine. *Dermatol. Clin.* 19 (1) : 79-86.
- [113]. **Paul I. (2001)**. Encyclopédie des plantes médicinales. *Dorling Kindersley Limited, Londres*, p: 226.
- [114]. **Pequignot F., Michel E., Le Toullec A. et Jouglu E. (2002)**. Mortalité par maladies infectieuses en France. Tendances évolutives et situation actuelle. Surveillance nationale des maladies infectieuses 1998-2000. *Institut de veille sanitaire*: 27-34.
- [115]. **Perrucci S., Mancianti F., Ciont P.L, Flamini G., Morelli I. et Macchioni G. (1994)**. *In vitro* antifungal activity of essential oils against some isolates of *Microsporum canis* and *M.gypseum*. *Planta Medi.* 60: 184–187.
- [116]. **Peters R., Althaus M. et Nagy A.L. (2006)**. Practical formal total synthesis of (rac)- and (S)-camptothecin. *Org. Biomol. Chem.* 4 (3): 498-509.
- [117]. **Pierpont C.G. (2001)**. Unique properties of transition metal quinone complexes of the MQ3 series. *Coord. Chem. Rev.* 219–221: 415–33.
- [118]. **Pinto C.M.F., Maffia L.A., Casali V.W.D. et Cardoso A.A. (1998)**. *In vitro* effect of plant leaf extracts on mycelial growth and sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*. *J. Phytopathol.* 146: 421-425.
- [119]. **Pinto A.V. et De Castro S.L. (2009)**. The Trypanocidal activity of naphthoquinones. *Molecules.* 14: 4570-4590.
- [120]. **Plyta Z.F., Li T.H., Papageorgiou V.P., Mellidis A.S., Assimopoulou A.N., Pitsinos E.N. et Couladouros E.A. (1998)**. Inhibition of topoisomerase I by naphthoquinone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 3385–90.
- [121]. **Powis G. (1987)**. Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents. *Pharmacol. Ther.* 35: 57–162.
- [122]. **Rahmoun M.N. (2009)**. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de produits dérivés de la lawsone. Mémoire de magister, université Abou bekr belkaid – Tlemcen.
- [123]. **Rahmoun M.N., Benabdallah M., Villemin D., Boucherit K., Mostefa-Kara B., Ziani-Cherif C. et Choukchou-Braham N. (2010)**. Antimicrobial screening of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Der Pharma Chemica.* 2: 320-326.
- [124]. **Rahmoun N.M., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Benabdallah M., Villemin D. et Choukchou-Braham N. (2012)**. Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. *Med. Mal. Infec.* 42: 270–275.

- [125]. **Rascol O., Hain T.C., Brefel C., Benazet M., Clanet M. et Montastruc J.L. (1995).** Antivertigo medications and drug-induced vertigo. A pharmacological review. *Drugs*. 50 (5): 777-91.
- [126]. **Raupp, P., Hassan, J.A., Varughese, M. et Kristiansson, B. (2001).** Henna causes life threatening haemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Arch. Dis. Child*. 85: 411–412.
- [127]. **Raveesha K.A., Satish S., Mohana D.C. et Raghavendra M.P. (2007).** Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. *J. Agric. Technol*. 3: 109-119.
- [128]. **Robins D. J., Campbell I. M. et Bentley R. (1970).** Glutamate-a precursor for the naphthalene nucleus of bacterial menaquinones. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 39: 1081-1086.
- [129]. **Ross D. et Siegel D. (2004).** NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol*. 382: 115–144.
- [130]. **Rostkowska H., Nowak. M.J., Lapinski L. et Adamowicz L. (1998).** Molecular structure and infrared spectra of 2-hydroxy-1,4- naphthoquinone; Experimental matrix isolation and theoretical Hartree–Fock and post Hartree–Fock study. *Spectrochim. Acta Part A*. 54: 1091–1103.
- [131]. **Salunke-Gawali S., Rane S.Y., Puranik V.G., Guyard-Duhayon C. et Varret F. (2004).** Three dimensional hydrogen-bonding network in a copper complex of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone: structural, spectroscopic and magnetic properties. *Polyhedron*. 23: 2541–2547.
- [132]. **Sayed H.H. et colli M.A. (2008).** Synthesis of 3-[(4-Chloro-phenyl) oxiranyl] thiophen-2-yl-propanone and their reactions with some nucleophilles for antiviral evaluations. *Phosphorus Sulfur*. 183 (1): 156-167.
- [133]. **Sayed H., Morsy E. et Flefel E. (2010).** Synthesis and reactions of some novel nicotinonitrile, thiazolotriazole, and imidazolotriazole derivatives for antioxidant evaluation. *Synth. Commun*. 40 (9): 1360-1370.
- [134]. **Sayedali T.E. (2009).** Synthesis of some novel pyrazolo pyridine and pyrazolo pyrimidine derivatives bearing 5,6-diphenyl-1,2,4-triazine moiety as potential antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem*. 44: 1237-47.

- [135]. Scozzafava A. et Supuran C.T. (2000). Carbonic anhydrase and matrix metalloproteinase inhibitors: sulfonylated amino acid hydroxamates with MMP inhibitory properties act as efficient inhibitors of CA isozymes I, II, and IV, and N-hydroxysulfonamides inhibit both these zinc enzymes. *J. Med.Chem.* 43 (20): 3677-87.
- [136]. Sharma V.K. (1990). Tuberculostatic activity of henna (*Lawsonia inermis* Linn.). *Tubercle.* 71: 293-295.
- [137]. Stafford A.E., Black D.R., Haddon W.F. et Waiss A.C. (1972). Analysis and improved synthesis of parasorbic acid. *J. Sci. Food Agric.* 23 (6): 771-776.
- [138]. Shaukat A., Tanveer H. et Rakhshanda N. (2009). Optimization of alkaline extraction of natural dye from Henna leaves and its dyeing on cotton by exhaust method. *J. Clean. Prod.* 17 (1): 61-66.
- [139]. Shojaei H., Li-Böhmer Z. et Von Zezschwitz P. (2007). Iromycins: a new family of pyridone metabolites from *Streptomyces* sp. II. Convergent total synthesis. *J. Org. Chem.* 72 (14): 5091-7.
- [140]. Sivapriya M. et Srinivas L. (2007). Isolation and purification of a novel antioxidant protein from the water extract of Sundakai (*Solanum torvum*) seeds. *Food Chem.* 104: 510–517.
- [141]. Song W., Guo J., Feng D., Hu W., Li Z. et Gao M. (2011). Study on acute toxicity and structure–activity relationship of *Daphnia magna* exposed to naphthoquinones. *Environ. Toxicol. Phar.* 32:102–106.
- [142]. Spellberge B., Guidos R., Gilbert D., Bradley J., Boucher H.W., Scheld W.M., Bartlett J.G. et Edwards J.J.R. (2008). The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 46 :155-164.
- [143]. Stasevych M.V., Chervetsova V.G., Plotnikov M.Yu., Platonov M.O., Sabat S.I., Musyanovych R.Y. et Novikov V.P. (2006). Synthesis and antimicrobial evaluation of novel 2-substituted, 3-mercapto 1,4 naphthoquinones. *Ukr. Bioorg. Acta.* 2: 33-39.
- [144]. Strunecka A., Patocka J. et Connett P. (2004). Fluorine in medicine. *J. Appl. Biomed.* 2, 141-150.
- [145]. Surup F., Shojaei H., Zezschwitz P.V., Kunze B. et Grond S. (2008). Iromycins from *Streptomyces* sp. and from synthesis: New inhibitors of the mitochondrial electron transport chain. *Bioorg. Med. Chem.* 16: 1738–1746.

- [146]. **Tagboto S. et Townson S. (2001)**. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Adv. Parasitol.* 50: 199–295.
- [147]. **The Scientific Committee On Cosmetic Products and Non-Food Products Intended For Consumers (SCCNFP), (2004)**. Opinion concerning lawsone colipa N° c146.
- [148]. **Thompson A.M., Murray D.K., Elliott W.L., Fry D.W., Nelson J.A., Showalter H.D., Roberts B.J., Vincent P.W. et Denny W.A. (1997)**. Tyrosine kinase inhibitors. Structure-activity relationships for soluble 7-substituted 4-[(3-bromophenyl) amino] pyrido [4,3-d] pyrimidines designed as inhibitors of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. *J. Med. Chem.* 40 (24): 3915-25.
- [149]. **Thompson S. (1982)**. Aminopyridine Block of Transient Potassium Current. *J. Gen. Physiol.* 80: 1-18.
- [150]. **Tripathi R.D., Srivastava H.S. et Dixit S.N. (1978)**. A fungitoxic principle from the leaves of *Lawsonia inermis* Linn. *Experientia.* 15: 51-2.
- [151]. **Vaysse L. (1990)**. Synthèses de Benzoquinones et de naphthoquinones à activité cutanée potentielle. Thèse de doctorat, Strasbourg, France: p 10-12.
- [152]. **Velíšek J. Davídek J. et Cejpek K. (2007)**. Biosynthesis of food constituents: natural pigments, part 1 – a review. *Czech. J. Food Sci.* 2: 291–315.
- [153]. **Vermerris W. et Nicholson R. (2006)**. Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p 211–234.
- [154]. **Vilamil-Fernandez S. Stoppani A.O. et Dubin M. (2004)**. Redox cycling of β -lapachone and structural analogues in microsomal and cytosol liver preparations. *Methods Enzymol.* 378: 67–87.
- [155]. **Villemin D. et Nechab B. (2000)**. Use of a new hydrophilic phosphine: DPPP. Rapid and convenient Heck reaction in aqueous medium under microwave irradiation *J. Chem. Res.* 9: 429–431.
- [156]. **Villemin D., Benabdallah M., Rahmoun N., Jouannic C., Choukchou-Braham N. et Mostefa-Kara B. (2010)**. A Green route for synthesis of new 1,2-naphthoquinomethane acetonitriles in water. *Synth. Commun.* 40: 23, 3514-3521.
- [157]. **Wichtl M. (1999)**. Plantes thérapeutiques: Tradition, pratique officinale. Science et thérapeutique 3^{ème} édition. Edition française par Robert Anton. *Technique et documentation.* p: 262-264.

- [158]. **Wujec M., Pitucha M., Dobosz M., Kosikowska U. et Malm A. (2004).** Synthesis and potential antimycotic activity of 4-substituted-3-(thiophene-2-yl-methyl)-Delta2-1,2,4-triazoline-5-thiones. *Acta Pharm.* 54 (3): 251-60.
- [159]. **Wren R.C. (1988).** Potter's new cyclopaedia of botanical drugs and preparations. Revised edition. *Saffron Walden: CW Daniel Co. Ltd.* p: 143.
- [160]. **Yadav J. S., Swamy T. et Rao D. K. (2007).** Organic synthesis in water: Green protocol for the conjugate addition of thiols to p-quinones. *J. Mol. Cat. (A) Chem.* 274: 116–119.
- [161]. **Yogisha S., Samiulla S. D., Prashanth D., Padmaja R. et Amit A. (2002).** Trypsin inhibitory activity of *Lawsonia inermis*. *Fitoterapia*.73: 690–691.
- [162]. **Yun M. K., Samuel F. et Ronald H.B. (2006).** Structure—antimicrobial activity relationship comparing a new class of antimicrobials, silanols, to alcohols and phenols. Department of Materials Science and Engineering, University of Florida, Gainesville, FL 32611.
- [163]. **Zhang L. et Arnold L. D. (2005).** Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine. *Humana Press Inc.*
- [164]. **Zhang Y. et Lewis K. (1997).** Fabatins: New antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol Lett.* 149: 59–64.
- [165]. **Zhang Y.M., Fan X., Chakaravarty D., Xiang B., Scannevin R.H., Huang Z., Ma J., Burke S.L., Karnachi P. Jackson K.J. et Paul F. (2008).** 1-Hydroxy-2-pyridinone-based MMP inhibitors: Synthesis and biological evaluation for the treatment of ischemic stroke. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 18 (1): 409-413.

Annexe I

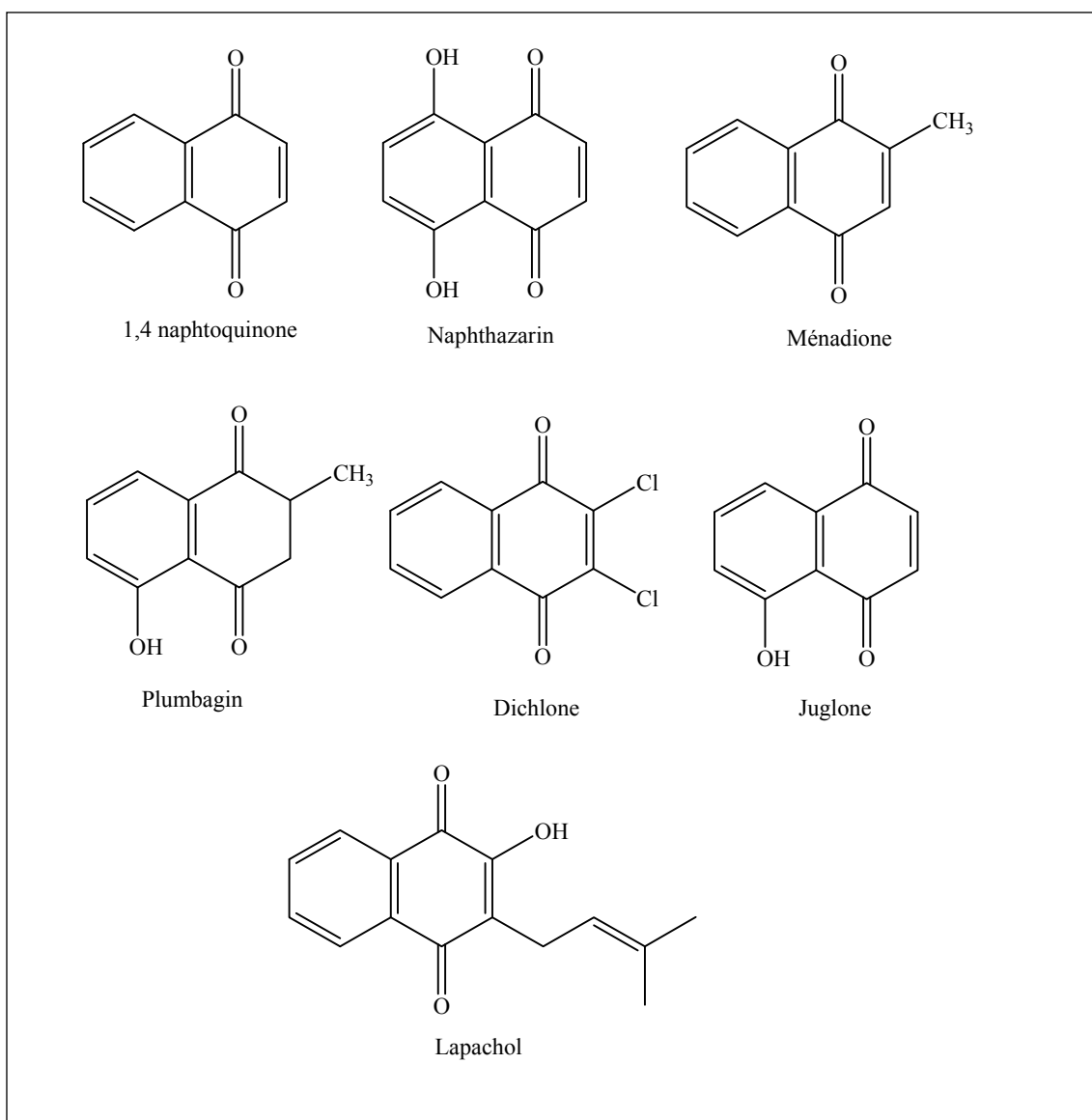


Figure N° 19. Structure chimiques de quelques dérivés 1,4 naphthoquinones

Annexe II

Tableau N°19. Diamètres des zones d'inhibition des dérivés 2-pyridone et 2-aminopyridine vis-à-vis des bactéries à gram positifs

Composés	Zone d'inhibition (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
A	6	6	6	6
B	6	6	6	6
C	6	6	6	6
D	6	6	6	6
E	6	6	6	6
F	6	6	6	6
G	6	6	6	6
H	6	6	6	6
I	6	6	6	6
J	6	6	6	6
K	6	6	6	6
L	6	6	6	6
M	6	6	6	6
N	6	6	6	6
O	6	6	6	6
Q	6	6	6	6
R	6	6	6	6
S	6	6	6	6
T	6	6	6	6
U	6	6	6	6
V	6	6	6	6

Tableau N° 20. Diamètres des zones d'inhibition des dérivés 2-pyridone et 2-aminopyridine vis-à-vis des levures

Composés	Zones inhibition (mm)		
	<i>Candida albicans</i> IP 444	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida albicans</i> ATCC 26790
A	6	6	6
B	6	6	6
C	6	6	6
D	6	6	6
E	6	6	6
F	6	6	6
G	6	6	6
H	6	6	6
I	6	6	6
J	6	6	6
K	6	6	6
L	6	6	6
M	6	6	6
N	6	6	6
O	6	6	6
Q	6	6	6
R	6	6	6
S	6	6	6
T	6	6	6
U	6	6	6
V	6	6	6

Tableau N° 21. Pourcentages d'inhibition mycéliennes des dérivés 2-pyridone et 2-aminopyridine

	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. alternaria</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. herbarum</i>
Amph B	88,29 ± 0,4	90,62 ± 0	79,64 ± 0	88,12 ± 0	68,82 ± 2,2
A	33,44± 0,2	22,56±1,2	40,09± 3,1	00,00 ± 0	00,00 ± 0
B	12,62± 0,95	00,00 ± 0	35,65± 3,6	00,00 ± 0	00,00 ± 0
C	8,06± 0,6	1,43± 0,3	1.34± 0,1	00,00 ± 0	12.61±0,1
D	14,93± 1,3	30,87±0,6	28,52± 2,0	00,00 ± 0	00,00 ± 0
E	9,20± 0,9	16,90± 2,3	22,27± 1,6	00,00 ± 0	00,00 ± 0
F	4,5± 0,2	29,58± 1,6	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0
G	2,27± 0,1	00,00 ± 0	24,04± 2,3	00,00 ± 0	00,00 ± 0
H	3,44± 0,1	23,96± 0,36	8,84± 0,74	00,00 ± 0	00,00 ± 0
I	9,20± 0,5	1,39± 0,6	39,41± 1,5	00,00 ± 0	19.42± 0,5
J	10,34± 0,9	7,01± 2,9	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0
K	1,13± 0,1	5,62± 1,4	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0
L	10,34± 0,2	1,39± 0,3	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0
M	2,31± 0,1	8,45± 0,8	20,48± 0,8	00,00 ± 0	00,00 ± 0
N	1,13± 0,2	26,74± 0,9	14.20± 1,0	00,00 ± 0	00,00 ± 0
O	10,34± 0,3	15,46± 1,3	4,4 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0
Q	18,29 ± 0,4	17,47 ± 1,6	10,62 ± 0,3	00,00 ± 0	19,02 ± 3,2
R	18,96 ± 0,6	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0	21,19 ± 1,4
S	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0
T	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0	00,00 ± 0
U	21,95 ± 0,7	00,00 ± 0	09,46 ± 0,4	00,00 ± 0	25,01 ± 2,9
V	12,42 ± 0	05,62 ± 0	07,9 ± 0	02,87 ± 0	11,69 ± 0

ملخص

تهتم هذه الدراسة بتقييم النشاط المضاد للمكروبات لمستخلصات الحناء (*Lawsonia inermis*) و 40 منتج مركب ينتمي لعائلات المركبات، النفثوكينون (naphthoquinones)، 2- الأمينوبيريدين (2-aminopyridines) و 2- البيريدون (2-pyridones). نوعين من الطرق تم إتباعهما لتقييم النشاط المضاد للبكتيريا والمضاد للخمائر وطريقة التسمم الغذائي لتقييم النشاط المضاد للفطريات.

أظهرت النتائج أن **b1** و **c1** مركبات فعالة. حيث أن الحد الأدنى للتركيز المثبط للمنتج **c1** المتحصل عليه هو 8 µg/ مل ضد *Acinitobacter baumannii* و 16 µg/ مل ضد *Citrobacter freundii* و *Salmonella typhimurium*. هذه النتائج هي أحسن 128 مرة مقارنة مع المتحصل عليها بالتمثائل الهيكلي، اللوسون. المركبات **a1** و **a2** و **a** هي فعالة ضد الفطريات بتثبيط نمو الفطر يفوق 50%. أظهر مستخلص الإيثانول الخام للحناء تثبيط كامل للنمو فطر *Fusarium oxysporum*. مركبات 2- الأمينوبيريدين و 2- البيريدون لم تكشف عن أي نشاط ملحوظ مضاد للميكروبات. أظهرت دراسة التسمم الخلوي للمركبات النشطة لخلايا الدم الحمراء البشرية أن المركبين **b1** و **c1** هما الأقل تسببا للتسمم الخلوي. اللوسون يظهر تسمم خلوي متوسط مقارنة مع الخلايا الشاهدة.

يمكننا أيضا أن نقول إن الهيكل ثنائي كيتون هو هام لنشاط مركبات النفثوكينون. تثبيط القواعد المثيرة للإلكترون في النقاط C-2 أو C-3 يقلل من النشاط المضاد للميكروبات، وفي الوقت نفسه التسمم الخلوي لمركبات النفثوكينون.

الكلمات المفتاحية: المنتجات المركبة - نشاط مضاد للميكروبات - التسمم الخلوي - العلاقة هيكل/ نشاط

Résumé

Notre travail a porté sur un criblage antimicrobien de deux extraits du Henné (*Lawsonia inermis*) et de 40 dérivés de synthèse qui appartiennent aux familles de composés, naphthoquinones, 2-aminopyridines et 2-pyridones. Nous avons utilisé deux méthodes pour l'évaluation de l'activité antibactérienne ainsi que antifongique et la méthode d'empoisonnement de la nourriture pour l'évaluation de l'activité vis-à-vis des moisissures.

Les résultats obtenus ont montré que les dérivés **b1** et **c1** sont efficaces. En effet, le dérivé **c1** révèle une CMI de 8 µg/ mL vis-à-vis d'*Acinitobacter baumannii* et de 16 µg/ mL vis-à-vis de *Salmonella typhimurium* et *Citrobacter freundii*. Ces valeurs sont inférieures jusqu'à 128 fois par rapport à celles de l'analogue structural, la lawsone. Les dérivés **a**, **a1** et **a2** sont efficace vis-à-vis des moisissures avec une inhibition dépassant les 50% de la croissance mycélienne. L'extrait brut d'éthanol montre une inhibition totale de la croissance mycélienne de la souche *Fusarium oxysporum*. Les dérivés 2-aminopyridines et 2-pyridones ne montrent aucun résultat antimicrobien marquant.

L'étude de la cytotoxicité des composés actifs vis-à-vis des globules rouges humains a montré que les composés **b1** et **c1** sont les moins toxiques. La lawsone révèle une cytotoxicité moyenne par rapport aux cellules témoins.

Nous pouvons dire également que la structure di-cétonique est un dispositif important pour l'activité des naphthoquinones. Le greffage des groupements électro-attracteurs sur la position C-2 ou C-3 diminue l'activité antimicrobienne et en même temps la cytotoxicité des naphthoquinones.

Mots clés : Produits de synthèse - Activité antimicrobienne - cytotoxicité - Relation Structure/Activité

Summary

Antimicrobial screening of two extract from Henna (*Lawsonia inermis*) and 40 synthetic derivatives belong to the families of compounds, naphthoquinones, 2-aminopyridine and 2-pyridones has been studied in this work. The antibacterial and antifungal activity were determined using two methods and the poisoned food technique against the mold.

Results showed that **b1** and **c1** presented a good antibacterial effectiveness. Indeed, compound **c1** exhibited MIC of 8 µg/ mL against *Acinitobacter baumannii* and 16 µg/ mL against *Salmonella typhimurium* and *Citrobacter freundii*. These values are up to 128 fold lower in comparison with those of the structural analogue, lawsone. Compound **a**, **a1** and **a2** are the most potent against mold with over 50% inhibition of mycelial growth. The crude ethanol extract showed complete inhibition of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* strain. No antimicrobial potency was observed for the derivatives 2-aminopyridines and 2-pyridone.

Cytotoxicity study of active compounds against human red blood cells showed that the compounds **b1** and **c1** are the less cytotoxic. Lawsone shows average cytotoxicity compared to control cells.

We can also say that the di-keton structure is important for naphthoquinones activity. Grafting withdrawing electron groups at C-2 or C-3 positions decreases the antimicrobial activity and the cytotoxicity of naphthoquinones at the same time.

Keywords: Synthetic compounds - Antimicrobial Activity - cytotoxicity - Relationship Structure / Activity

