

POLYTHIENYLES DE L'HUILE DE LA COMPOSEE TAGETES ERECTA DU SENEGAL : STRUCTURES ET PROPRIETES ANTIFONGIQUE ET ANTIBACTERIENNE

KANE Saliou ^{1*} : SAMB Abdoulaye² : MBOUP Souleymane³
et KORNPROBST Jean Michel⁴

¹Département de Sciences Physiques, Ecole normale Supérieure,
Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

²Laboratoire de Produits Naturels, Département de Chimie, Faculté de Sciences et
Techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

³Laboratoire de bactériologie, Faculté de Médecine Pharmacie Odontostomatologie,
Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

⁴Faculté de Pharmacie, groupe SMAB, ISOMER, Laboratoire de chimie marine,
1 rue Gaston Veil, BP 1024 NANTES Cedex 01, France.

(Reçu le 27/03/2001 – Révisé le 12/07/ 2002)

Summary : Polythienyls were identified as components of roots of *Tagetes erecta* and their structures obtained by spectroscopic analysis. Antifongic and antibacterian activities of polythienyls were shown by action on cultures of *Candida albican*, *Escherichia coli* and *Sarcina lutea*.

Key words : polythienyls, *Tagetes erecta*, antifongic and antibacterian activities, *Candida albican*, *Escherichia coli* and *Sarcina lutea*.

I - INTRODUCTION

Le genre *Tagetes* appartient à la famille des *Composées* de la tribu des *Hélénies*. Les *Tagetes* sont essentiellement connues et cultivées comme plantes ornementales. Il existe au moins une douzaine d'espèces de *Tagetes*.

Au Sénégal deux espèces sont connues : *Tagetes erecta* et *Tagetes patula* ou *pumila*.

De nombreuses recherches ont été menées sur les espèces de *Tagetes* connues et l'on peut répartir les produits identifiés en deux grandes catégories dont des cétones monoterpéniques à enchaînement normal avec quelques composés apparentés et des dérivés soufrés, en particulier le bithiényl et le terthiényl, ainsi que des composés apparentés.

Les *Tagetes* représentent les plus connues des plantes nématicides [1]. Des résultats de recherche ont prouvé que parmi les différentes espèces de *Tagetes* étudiées la plus efficace contre les nématodes serait la *Tagetes patula*[2]. Les travaux de UHLENBROEK et BIJLOO [3,4] ont montré que les propriétés nématicides des *Tagetes* sont dues à l'existence de polythiényles dans ces plantes. Formés essentiellement dans les racines ces dérivés du thiophène auraient ainsi une action de défense chimique contre ce type de parasites que sont les nématodes.

Une seconde propriété particulièrement intéressante des *Tagetes* et qui semble provenir des dérivés du thiophène est la phototoxicité [4, 5].

A notre connaissance aucune autre propriété des dérivés du thiophène n'a été signalée.

Le présent travail est une contribution à l'identification des produits soufrés de l'espèce *Tagetes erecta* du Sénégal et à l'étude de leurs propriétés biologiques.

Des racines de cette plante ont été extraits et identifiés des produits soufrés dérivés du thiophène : l' α -terthiényl qui représente environ 1% de l'extrait brut et le 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2 bithiényl.

Des tests réalisés avec des extraits frais de la plante sur une culture de *Candida albicans* d'une part et sur des souches d'*Escherichia coli* et de *Sarcina lutea* d'autre part, ont permis d'établir l'action antifongique et antibactérienne de ces extraits.

L' α -terthiényl a donné un résultat négatif pour ces tests.

II - MATERIEL ET METHODE

2.1 - Extraction et identification des polythiényles de la plante

Une masse de 3,5 Kg de racines de *Tagetes erecta* séchées et broyées est macérée pendant trois jours dans deux litres d'éther éthylique. Après évaporation lente du solvant, le résidu est partitionné dans l'eau et l'hexane. La phase organique évaporée donne 30 g de produit pâteux. Ce résidu est dissout au maximum par du méthanol (5x100 mL). L'évaporation de la phase alcoolique donne un liquide jaune visqueux.

Ce liquide brut est séparé par chromatographie sur colonne utilisant l'alumine comme support et l'éther éthylique comme éluant.

Les deux fractions majoritaires isolées ont été étudiées, en présence d'un témoin de α -terthiénylène synthétisé au préalable, par CCM sur support de silice, l'éluant utilisé étant l'éther de pétrole. Après élution des produits la plaque est séchée et révélée sous une lampe U.V (254nm). Ces fractions ont été ensuite purifiées par chromatographie préparative utilisant un support en silice et l'éther de pétrole comme éluant.

L' α -terthiénylène et le bithiénylène qui ont servi de témoin ont été synthétisés selon le protocole décrit par SEASE et al. [6].

Une CCM comparative avec révélation à l'UV des produits soufrés extraits des racines et des produits de synthèse suivie d'une étude par des méthodes spectroscopiques (spectroscopie U.V, IR et RMN du proton), a permis d'identifier les produits soufrés naturels.

2.2 - Activités antifongique et antibactérienne des extraits de *Tagetes erecta*

2.2.1 - Activité antifongique

La méthode utilisée pour l'action antifongique est celle de diffusion en milieu gélosé.

Principe : Des cylindres calibrés disposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une souche de *Candida albicans* sont remplis avec les extraits de la plante.

Si les extraits contiennent une substance antifongique, celle-ci va diffuser dans le milieu à partir des cylindres. La croissance des champignons s'arrêtera lorsqu'ils rencontreront une concentration d'antifongique suffisante pour les inhiber. La limite de la culture visible sera alors circulaire, centrée par le cylindre, et déterminera ainsi un diamètre d'inhibition.

Technique : une souche de *Candida albicans* provenant d'un prélèvement vaginal effectué à l'Hôpital A.LE DANTEC de Dakar, est cultivée pendant 18 heures à 37°C sur un milieu gélosé de SABOURAUD. Une partie de cette culture, prélevée avec une anse de platine calibrée est mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Cette suspension, diluée à raison d'une goutte dans 10 ml d'eau physiologique, constitue l'inoculum.

Une boîte de Pétri de 100 mm de diamètre sur 18 mm de hauteur contenant 10 ml de milieu gélosé de SABOURAUD est préalablement séchée à l'étuve à 37°C. Le milieu est inondé avec l'inoculum.

Après avoir retiré avec une pipette stérile l'excès de liquide, les cylindres calibrés en acier de 6 mm de diamètre sur 8 mm de hauteur remplis avec 0,2 ml des extraits, sont disposés sur le milieu gélosé de SABOURAUD.

Les boîtes sont alors incubées à 37°C à l'étuve pendant 18 heures sans faire bouger les cylindres.

2.2.2 - *Activité antibactérienne*

Nous avons cherché également à savoir si les extraits de *Tagetes erecta* possèdent une activité antibactérienne et, si oui, dans quelle condition.

La méthode employée est analogue à la précédente. Des cylindres calibrés disposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec, soit une souche d' *Escherichia coli* soit avec une souche de *Sarcina lutea* sont remplis avec les extraits de la plante.

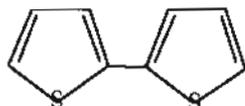
Pour la mise en évidence des activités antifongique et antibactérienne chacun des produits isolés est testé en deux temps :

- premier temps : test réalisé tout juste après extraction du produit.
- deuxième temps : test réalisé un jour après extraction.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

• Les produits de synthèse ont été identifiés comme étant du bithiényle $C_8H_6S_2$ (produit blanc cristallisé, point de fusion $F = 31$ à $33^\circ C$) et de l' α -terthiényle $C_{12}H_8S_3$ (produit solide jaune, point de fusion $F = 94$ à $95^\circ C$).

Dans la suite, par soucis de simplification, l' α -terthiényle et le bithiényle seront notés respectivement α -T et BT.



Bithiényle : BT



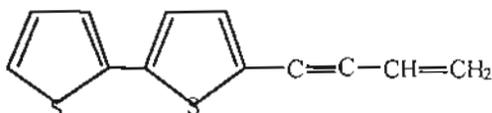
α -terthiényle : α -T

Les données spectrales ont permis d'identifier les produits extraits des racines (Cf données numériques et spectrales à la fin du document).

De l'extrait brut des racines de *Tagetes erecta* ont été isolés deux dérivés soufrés :

- Produit P₁ : l' α -terthiényne de formule C₁₂H₈S₃, substance jaune solide à la température ambiante.

- Produit P₂ : le 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bithiényne de formule C₁₂H₈S₂, produit jaune liquide à la température ambiante ; il sera noté 5-BBT pour la suite.



5-BBT

L' α -T représente environ 1 % de l'extrait brut. Le pourcentage du 5-BBT n'a pu être estimé du fait de son instabilité : ce produit se transforme progressivement en un résidu pâteux insoluble dans l'éther ; probablement du fait de sa tendance à la polymérisation.

• Le 5-BBT isolé présente une activité antifongique : son action sur une culture de *Candida Albicans* conduit à un **diamètre d'inhibition de d = 13 mm**.

Par ailleurs ce produit des racines présente une activité antibactérienne juste après l'extraction ; les diamètres d'inhibition suivants sont notés :

d = 14 mm avec *Escherichia coli* **d = 25 mm** avec *Sarcina lutea*

Les tests réalisés avec l'extrait brut sont également positifs.

Il est important de noter que les tests antifongiques et antibactériens réalisés avec le 5-BBT et l'extrait éthéré brut des racines de *Tagetes erecta* se sont révélés négatifs lorsque ces produits sont conservés pendant quelques heures (un jour environ). Le 5-BBT et l'extrait brut de *Tagetes erecta* conservés à l'air se transforment progressivement en un

résidu rouge insoluble dans les solvants tels que l'éther éthylique. Cette transformation pourrait être liée à une polymérisation du bithiényle. produit connu pour cette propriété.

Ce fait semble courant pour les tests réalisés avec les extraits d'autres espèces de *Tagetes*. VERHAGEN^[7] signale que l'effet des extraits de *Tagetes minuta* sur la peau disparaît si la plante est séchée au préalable ou conservée pour longtemps avant utilisation. Cet auteur ne semble pas avoir publié d'autres travaux sur cette question et, à notre connaissance, il n'a pas encore identifié le ou les produits responsables de l'activité. Tous les tests qu'il a réalisés ont, du reste, été faits avec la pâte végétale ou avec l'extrait brut obtenu à l'éther éthylique.

Quant à l' α -T les tests antifongiques et antibactériens ont donné un résultat négatif même avec le produit fraîchement isolé.

- Beaucoup de recherches ont été menées sur les plantes nématocides ^[1-4]. Les *Tagetes* se distinguent des espèces de la famille des Composées par leurs propriétés nématocides et phototoxiques particulièrement marquées. GOOD et al.^[8] ont conclu de leurs recherches que *Tagetes minuta* contrôle les nématodes *Meloidogyne incognita* et *Meloidogyne javanica* mais contrôle moins *Meloidogyne halpa* et pas du tout *Meloidogyn arenaria*. SIDDIQUI et ALAM^[9] ont obtenu un très bon contrôle de *Meloidogyne incognita* avec des résidus de *Tagetes* qui consistait en feuilles, fleurs ou tiges de *Tagetes lucida*, *Tagetes minuta* et *Tagetes tenuifolia*.

Les résultats de ces recherches trouvent leurs applications en agriculture en particulier. POINAR et JOHNSON^[10] suggèrent d'utiliser les œillets d'Inde français – *Tagetes patula* – des variétés Tangerine ou Park's nemagold et de les cultiver comme engrais vert. Lawrence HILLS du Henry Doubleday Research Association en Angleterre cité par DUVAL ^[11] préfère quant à lui *Tagetes minuta*, une tagète qui peut devenir très grande (jusqu'à 3 mètres !) et donc constitue un engrais vert très intéressant.

Si les propriétés nématocides et phototoxiques des *Tagetes* ont été mises en évidence qualitativement, rares sont les recherches qui ont porté sur l'identification des substances chimiques responsables de ces activités. A titre d'exception on peut souligner les travaux de UHLEN-BOOK et al. ^{13,4)} qui ont mis en évidence les propriétés nématocides des polythiényles extraits d'une espèce de *Tagetes* mais, à notre connaissance, ces auteurs n'ont pas publié de résultats de recherche indiquant d'autres propriétés de ces produits soufrés.

IV - CONCLUSION

L'extrait brut des racines de *Tagetes erecta* contient de l' α -terthiényle et du 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bithiényle.

Des recherches antérieures effectuées sur différentes espèces de *Tagetes* ont mis en évidence les propriétés nématocides et phototoxiques des extraits des ces plantes et établi que ces propriétés sont dues aux polythiényles présents dans ces plantes, le 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bithiényle et l' α -terthiényle. Par ailleurs, d'après les résultats publiés, chacun de ces produits s'est révélé actif.

A notre connaissance aucune autre propriété de ces dérivés n'a été signalée.

Les tests antifongiques et antibactériens que nous avons réalisés avec les produits soufrés extraits des racines de *Tagetes erecta* sont positifs avec le 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bithiényle et l'extrait brut fraîchement isolés. Ces tests deviennent négatifs lorsque ces produits sont conservés pendant un jour environ ; corrélativement ils se transforment en un résidu rouge devenant insoluble dans l'éther. Il est possible que ces faits trouvent leur explication dans la tendance à la polymérisation des dérivés polyacétyléniques du thiophène.

L' α -terthiényle, même fraîchement isolé, conduit à un résultat négatif pour les tests antifongique et antibactérien.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] - J. DUVAL, Les plantes nématicides. AGRO-BIO, (1993), **04**, 360
- [2] - S.R WINOTO, Studies of the effect of *Tagetes* species on plant parasitic nematodes. Stichting Fonds Landbouw Export Bureau publicatie **47**. Veenan und Zonen N.W Wageningen, The Nederlands, (1969), 132.
- [3] - J.H.UHLENBROEK, J.D. BIJLOO, Investigation of nematicides, isolation and structure of a nematicidal principle occurring in *Tagetes* roots. *Recueil*, (1968), **77**, 1004-1009.
- [4] - J.H.UHLENBROEK, J.D. BIJLOO, Investigations on nematicides, polythienyls and related compounds. *Recueil*, (1960), **79**, N° 11, 1181-1196.
- [5] - G.F.Q. CHAND, J. CWSKA, G.H. NEIL TOWERS, Photosensitizing thiophene in *Porophyllum*. *Tessaria* and *Tagetes*. *Phytochemistry*, (1979), **18**, 1536.
- [6] - J.W. SEASE, L. ZECHMEISTER, Chromatographic and spectra characteristics of some polythienyls. *J.Amer.Chem.Soc*, (1947), **69**, 270-273.
- [7] - A.R. VERHAGEN, M.N. JOHN, Contact dermatitis from *Tagetes minuta*, a new sensitizing plant of the *Canpositae* Family. *Arch.of Dermatology*, (1979), **110**, N°3. 441- 443.
- [8] - J.M. GOOD, N.A. MINTON, C.A. JAWORSKY, Relative susceptibility of selected cover crops and coastal bermudagrass to plant nematodes. *Phythopalogy*, (1965), **55**, 1026 – 1030.
- [9] - M.A. SIDDIQUI, M.M. ALAM, Possible utilization of a noxious weed in nematode contrpl. *Biological wastes*, (1989), **28**, 181 – 188.
- [10] - L.F. JOHNSON, N.B. SHAMIYEH, Effect of soil amendements on hatching of *Meloidogyne incognita* eggs. *Phytopathology*, (1975), **65**, 1178 – 1181.

[11] - J.W. SEASE. L. ZECHMEISTER, A blue fluoresceing compound, terthiényl, isolated from Marigolds. *J.Amer.Chem. Soc.* (1947), **69**.

DONNEES NUMERIQUES ET SPECTRALES DES PRODUITS SOUFRES

1 - Analyse comparée des points de fusion

Produit	Point de fusion trouvé (°C)
Produit P ₁ (extrait de la plante)	95 - 96
Terthiényle de référence (synthèse)	94 - 95
Indication de la littérature	94 - 95,5

2 - Résultats de la microanalyse P1

Produit	Pourcentages		
	Carbone	Hydrogène	Soufre
Produit P ₁	57,97	3,29	38,31
Terthiényle C ₁₁ H ₆ S ₃ (calculé)	57,97	3,25	38,73

3 - Spectres IR comparés du produit P1 et de l' α -terthiényle de référence.

Le produit P1 extrait des racines et le terthiényle de référence ont le même spectre d'absorption IR à l'exception de quelques détails mineurs comme le montre le tableau comparatif suivant :

Bandes d'absorption en cm^{-1} du Produit P_1	Bandes d'absorption en cm^{-1} du Terthiénylyle de référence
3080 (f)	3100 (f)
1780 (F)	1790 (f)
1685 (f)	1593 (f)
1580 (f)	1055 (f)
1050 (f)	883 (f)
835 (f)	837 (F)
820 (F)	825 (F)
792 (f)	798 (F)
690 (F)	690 (F)

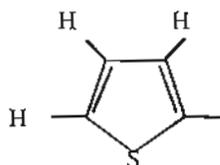
4 - Spectres RMN du proton comparés du produit P_1 et du terthiénylyle de référence :

Pris en solution dans du deutérochloroforme à 60 MHz, le spectre RMN du produit soufré naturel présente essentiellement un massif à $\tau = 2,9$ ppm.

Il s'agit d'un massif attribuable aux protons des noyaux thiophènes monosubstitués.

C'est en fait un système A MX : les 3 protons sont différents et correspondent à des déplacements de 3, 1 ; 2,9 et 2,69 ppm dans l'échelle des τ respectivement pour les protons M, X et A. Ces protons

doivent, avec une bonne résolution donner trois quadruplets côte à côte ; dans la pratique, c'est presque toujours un massif qui est obtenu.



	Déplacements chimiques δ en ppm		
	A	M	X
Produit extrait des racines	2,69	3,1	2,9
Terthiényle témoin	2,69	3,2	2,89

5 - Spectroscopie UV des produits P₁ et P₂

Les spectres UV (360 à 200 nm) obtenus pour les produits soufrés des racines comme des fruits présentent essentiellement deux pics absorbant à 350 et 254nm, résultats conformes à ceux obtenus pour le terthiényle (3).

6 - Spectroscopie IR du produit P₂

Plusieurs bandes caractéristiques des thiophènes sont retrouvées : 3080, 2170, 1603, 1455, 1420, 1287, 1190, 1080, 1050, 1035 968 920 850, 690 cm^{-1} .

NB : la présence de bandes aux fréquences voisines de 1700 cm^{-1} d'une part et aux fréquences comprises entre 2.000 à 3.000 cm^{-1} d'autre part indique la présence dans la molécule de groupements méthylène - CH_2 - ou méthyle CH_3 - et de liaisons insaturées Carbone - carbone ; une forte absorption dans ces domaines est notée en plus de l'absorption due aux liaisons C-H thiophéniques. Ces bandes sont absentes dans le spectre IR du bithiényle non substitué (11).

7 - Spectroscopie RMN du proton du produit P₂

C'est également un multiplet à $\tau = 2,9$ ppm caractéristique des protons thiophéniques qui est obtenu.