



**HAL**  
open science

# Propriétés pharmacologiques de l'oléorésine naturelle de copaïba et tests antibactériens

Maroi Mahrous

► **To cite this version:**

Maroi Mahrous. Propriétés pharmacologiques de l'oléorésine naturelle de copaïba et tests antibactériens. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01110359

**HAL Id: dumas-01110359**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01110359>**

Submitted on 28 Jan 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER  
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2015

N°

PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES DE  
L'OLÉORÉSINE NATURELLE DE COPAÏBA ET  
TESTS ANTIBACTÉRIENS

THÈSE  
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ÉTAT

Maroi MAHROUS

Né(e) le : 17/09/1990 à : Echirolles

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE  
GRENOBLE

Le : 12/01/2015

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury :

**M. Serge KRIVOBOK**, Docteur en pharmacie et Maitre de conférences en botanique,  
Université Joseph Fourier, Grenoble.

Membres :

**M. Ahcène BOUMENDJEL**, Professeur de chimie médicinale, Faculté de Pharmacie,  
Université Joseph Fourier, Grenoble.

**M. Julien BRAS**, Maitre de conférences en biomatériaux, Grenoble INP-Pagora,  
Grenoble.

**M. Gilles CORJON**, Docteur en pharmacie et enseignant en phytothérapie à l'Ecole  
Lyonnaise de Plantes Médicinales.

*La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT****Année 2014-2015****ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE**

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoît	D5	THEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	THEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoît	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)UCB

## UFR de Pharmacie de Grenoble



DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72  
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER [Lantou.Faure@ujf-grenoble.fr](mailto:Lantou.Faure@ujf-grenoble.fr)

MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	DURMORT- MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER- FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF- CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

DOMAINE DE LA MERCI  
 38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
 TEL : +33 (0)4 76 63 71 72  
 FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER [Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr](mailto:Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr)

MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
PAST	TROILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**\*\* D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »**

**D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »**

**D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)**

**D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »**

**D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »**

**D6 : Département « Anglais »**

**ATER** : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches  
**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire  
**CIB** : Centre d'Innovation en Biologie  
**CRI** : Centre de Recherche Institut  
**CNRS** : Centre National de Recherche Scientifique  
**DCE** : Doctorants Contractuels  
**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire  
 et de Cognition et Ontogénèse »  
**HP2** : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
**IAB** : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse  
 IPB :  
**IBS** : Institut de Biologie Structurale  
**JR** : Jean Roget  
**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes  
**LBFA** : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

**LCBM** : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
**LECA** : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
**LR** : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
**LR** : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
**MCU** : Maîtres de Conférences des Universités  
**MCU-PH** : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers  
**PAST** : Professeur Associé à Temps Partiel  
**PRAG** : Professeur Agrégé  
**PRCE** : Professeur certifié affecté dans l'enseignement  
**PU** : Professeurs des Universités  
**PU-PH** : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers  
**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation  
**UMR** : Unité Mixte de Recherche  
**UVHCI** : Unit of Virus Host Cell Interactions

*Toutes mes pensées vont au peuple syrien qui lutte contre la tyrannie*

*« Je sais qu'un jour viendra où l'aube éblouissante  
Au ciel resplendira !  
Malgré l'éternité qu'a duré notre attente :  
Je sais qu'un jour viendra !*

*Et tous, main dans la main bâtirons la patrie  
Fleurira le jasmin !  
Dans les rues de Damas, de toute la Syrie,  
Oui tous main dans la main !*

*Dans la liesse et la joie chanterons la victoire,  
D'une seule et même voix !  
Et nous réécrivons les pages de l'Histoire,  
Dans la liesse et la joie !*

*Je sais qu'un jour viendra fait de larmes, de rires,  
La paix triomphera !  
Et nous irons fleurir les tombes des martyrs,  
Je sais qu'un jour viendra ! »*

## **Remerciements**

**A monsieur Serge Krivobok**, pour avoir accepté de présider ce jury, j'en suis très honorée.

**Au professeur Ahcène Boumendjel**, un grand merci pour avoir accepté d'encadrer ce travail, pour votre aide durant la rédaction de cette thèse et vos encouragements.

**A monsieur Julien Bras**, pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire de recherche, encadré et conseillé tout au long de mon stage qui fut très intéressant.

**A monsieur Gilles CORJON**, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury et pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

**A l'équipe de la pharmacie Le Palladium,**

Merci aux titulaires de m'avoir accueillie dans votre officine et merci à toute l'équipe pour votre très grande gentillesse.

**A l'équipe du laboratoire de recherche de Pagora,**

Merci à toute l'équipe et surtout à Carolina Morelli et Natalie Lavoine, pour leur aide et leur disponibilité. J'ai apprécié leur gentillesse et leur confiance.

**A ma famille,**

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents, qui ont toujours été là pour moi et qui n'ont cessé de m'encourager, merci pour tout ce que vous faites pour moi, vous êtes mon soutien au quotidien. Un grand merci à mon frère, ma sœur et à Afnane mon rayon de soleil. Je souhaite également remercier tous les membres de ma famille de l'étranger qui malgré la distance m'ont encouragée et soutenue.

**A mes amies,**

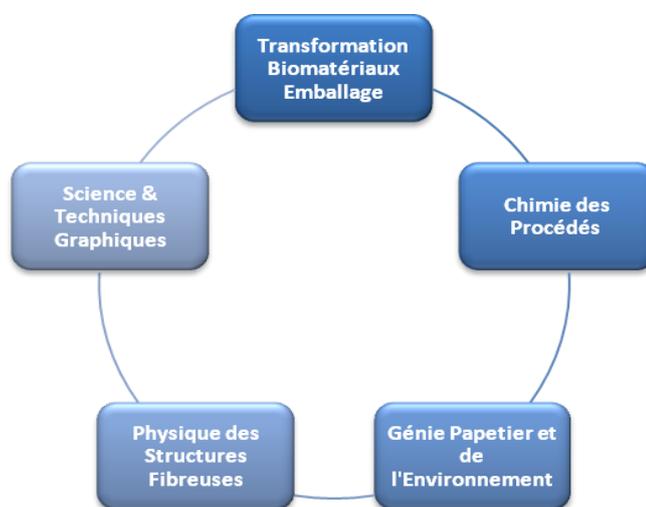
Amélie, Lucie, Salima, Céline, Marya, Amane, Meriem pour tous ces bons moments passés ensembles durant ces années d'études. Ça me manque déjà. Bonnes continuations à toutes. Et à mes amies d'enfance, un grand merci à Imen pour ton aide précieuse et à Rula pour tes messages d'encouragement, sans oublier Khadidja et Dania. On a vécu ensemble des moments inoubliables et ce n'est pas fini, le meilleur reste à venir.

**A tous ceux** qui n'ont cessé de m'encourager durant ces trois dernières années, vous avez été là pour me soutenir et vous avez su utiliser les bons mots, j'espère pouvoir être présente pour vous également.

## Avant propos

J'ai effectué un stage du 21/05/2012 au 03/08/2012 au laboratoire de recherche LGP2 : « *Laboratoire Génie des Procédés Papetiers* », situé sur le campus de Saint-Martin d'Hères. Ce laboratoire se trouve au sein de Pagora, une école d'ingénieurs en sciences du papier, de la communication imprimée et des biomatériaux, qui fait partie de Grenoble INP. Le LGP2 est une unité mixte de recherche, rassemblant de nombreux enseignants, chercheurs du CNRS, ainsi que des doctorants et post-doctorants, sans oublier les personnels techniques et administratifs.

Le LGP2 est composé de cinq équipes de recherche (Figure 1) :



**Figure 1** : Les différentes équipes de recherche du LGP2

L'équipe de Transformation Biomatériaux Emballage, dans laquelle j'ai travaillé, a pour objectif de développer les connaissances sur de nouveaux matériaux et procédés afin de proposer des solutions innovantes dans le domaine de l'emballage. Ses domaines de recherches englobent l'étude des matières premières, leur traitement, leur mise en forme et l'analyse des propriétés finales.

Elle s'appuie donc sur 3 thèmes :

- Bio-nano-particules et leurs utilisations
- Nouveaux biomatériaux : du traitement de surface aux composites
- Emballages fonctionnels : mise en forme et propriétés d'usage.

En 2011, les équipes du laboratoire de recherche du LGP2 ont publié une quarantaine d'articles scientifiques dans des journaux internationaux et ont participé à une trentaine de conférences internationales.

## Table des matières

Avant propos .....	7
Liste des tableaux et figures .....	10
Liste des abréviations, acronymes, symboles, et unités .....	12
Glossaire .....	14
Introduction .....	15
Partie 1 : Rappel historique et bibliographique .....	17
1. Généralité sur l'arbre de copaïba (partie botanique).....	17
2. L'oléorésine de copaïba : méthode d'extraction et composition chimique. ....	20
2-1 L'extraction : méthodes, régénération et facteurs influents.....	20
2-2 Composition chimique .....	24
3. Utilisation traditionnelle et propriétés thérapeutiques .....	27
3.1 Historique de l'utilisation de la copaïba .....	27
3.2 Usages traditionnels en Guyane française .....	28
3.3 Usages traditionnels en Amazonie .....	29
4. Avantages et inconvénients de l'utilisation de l'oléorésine.....	30
4.1 Les avantages .....	30
4.1.1 Propriétés médicinales démontrées .....	30
4.1.2 L'absence de génotoxicité .....	30
4.1.3 L'absence théorique de tératogénicité .....	31
4.1.4 Source renouvelable et développement durable .....	32
4.2 Les inconvénients .....	33
4.2.1 Les difficultés galéniques .....	33
4.2.2 Les effets indésirables .....	33
4.2.3 La variabilité dans la composition de l'oléorésine.....	34
Partie 2 : Matériels et méthodes des tests antibactériens.....	37
1. Démarche et objectif .....	37
2. Micro encapsulation.....	39
2.1 Micro-encapsulation par coacervation .....	39
2.2 Matériels utilisés .....	40
2.3 Protocole expérimental .....	42
3. Incorporation de l'oléorésine dans ou sur le plastique.....	44
3.1 Fabrication de film plastique contenant l'oléorésine .....	44
3.2 Enduction de l'oléorésine ou des microcapsules sur le film plastique.....	46
4. Tests antibactériens .....	47
4.1 Test antibactérien sur gélose selon la norme Afnor NF EN 1104.....	48

4.2 Test antibactérien en milieu liquide .....	49
Partie 3 : Résultats .....	50
1. Caractérisation de l'oléorésine de copaïba .....	50
2. Micro encapsulation et imprégnation.....	50
2.1 Caractérisation des micelles .....	50
2.2 Caractérisation des microcapsules .....	51
2.3 Caractérisation des films plastiques .....	53
3. Propriétés antibactériennes .....	54
3.1 Test antibactérien sur gélose .....	54
3.2 Test antibactérien dans un milieu liquide.....	56
Partie 4 : Discussion et perspectives d'utilisation .....	58
1. Analyse avec les données de la littérature .....	58
1.1 Composition chimique .....	58
1.2 Propriétés antibactériennes .....	58
2. Activités pharmacologiques des différents composés .....	61
2.1 Activités pharmacologiques des principaux sesquiterpènes .....	61
2.2 Activités pharmacologiques des principaux diterpènes .....	64
3. Utilisation possible dans les domaines pharmaceutique et cosmétique.....	67
3.1 Traitement des infections fongiques .....	67
3.2 Traitement de la leishmaniose .....	67
3.3 Prévention de la fièvre jaune .....	70
3.4 Traitement anticancéreux .....	71
3.5 Traitement neurologique .....	71
3.6 Traitement anti-nociceptif .....	73
3.7 Traitement anti-inflammatoire .....	74
3.8 Traitement du psoriasis .....	74
3.9 Traitement cicatrisant .....	76
3.10 Traitement de l'endométriose .....	78
3.11 Traitement des sepsis .....	78
3.12 Traitement des ulcères gastriques .....	79
3.13 Traitement de l'ischémie – reperfusion .....	79
3.14 Traitement bucco-dentaire .....	80
3.15 Traitement de l'acné .....	81
3.16 Autres perspectives d'utilisation possible.....	82
CONCLUSION .....	83
Bibliographie .....	85
Annexes .....	90

## Liste des tableaux et figures

### Figures

<b>Figure 1</b> : Les différentes équipes de recherche du LGP2.....	7
<b>Figure 2</b> : <i>Copaifera officinalis</i> .....	17
<b>Figure 3</b> : Les régions où l'on retrouve l'arbre de copaïba.....	19
<b>Figure 4</b> : Extraction de l'oléorésine de copaïba .....	20
<b>Figure 5</b> : Production d'oléorésine par arbre en fonction du diamètre du tronc au fil du temps.....	22
<b>Figure 6</b> : Fréquence de production de l'oléorésine par les arbres des quatre espèces de <i>Copaifera</i> .....	23
<b>Figure 7</b> : Principaux sesquiterpènes détectés dans l'oléorésine de copaïba.....	26
<b>Figure 8</b> : Principaux diterpènes détectés dans l'oléorésine de copaïba. ....	27
<b>Figure 9</b> : Méthodologie .....	38
<b>Figure 10</b> : Capsules mono ou multi nucléaire .....	38
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique de la micro-encapsulation par coacervation .....	39
<b>Figure 12</b> : Sonificateur .....	40
<b>Figure 13</b> : Dispermat.....	40
<b>Figure 14</b> : Granulomètre Cilas .....	41
<b>Figure 15</b> : Schéma d'une émulsion par sonification.....	42
<b>Figure 16</b> : Coacervation complexe avec la gélatine.....	43
<b>Figure 17</b> : Interactions électrostatiques lors de la micro-encapsulation .....	44
<b>Figure 18</b> : Fabrication de film plastique par coulage-évaporation.....	45
<b>Figure 19</b> : Endupap .....	46
<b>Figure 20</b> : Schéma d'une hotte à flux laminaire vertical .....	47
<b>Figure 21</b> : Test antibactérien et dépôt des échantillons sur gélose .....	48
<b>Figure 22</b> : Résultat de l'analyse de l'oléorésine de copaïba par GC-MS.....	50
<b>Figure 23</b> : Taille des particules de l'émulsion de copaïba.....	51
<b>Figure 24</b> : Taille des particules des microcapsules de copaïba.....	52
<b>Figure 25</b> : Observation des microcapsules par microscopie optique .....	52
<b>Figure 26</b> : Observation des microcapsules par MEB .....	53
<b>Figure 27</b> : Les témoins 1- Gélose non contaminée 2- Gélose contaminée 3- Disques de pénicilline.....	55
<b>Figure 28</b> : Tests antibactériens 1- Oléorésine de copaïba 2- Vapeurs de copaïba 3- Vapeurs de cannelle.....	55
<b>Figure 29</b> : Tests antibactériens 1- films plastiques couchés d'oléorésine ou 2- de microcapsules .....	56
<b>Figure 30</b> : Propriété antibactérienne par contact.....	57
<b>Figure 31</b> : Structure moléculaire des $\beta$ -caryophyllène, l'oxyde de $\beta$ -caryophyllène, et $\alpha$ -humulène .....	61
<b>Figure 32</b> : Structure moléculaire des $\delta$ -cadinène et $\alpha$ -cadinol .....	63

<b>Figure 33</b> : Structure moléculaire du $\beta$ -élémane .....	64
<b>Figure 34</b> : Structure moléculaire de l'acide copalique .....	65
<b>Figure 35</b> : Structure moléculaire de l'acide hardwickie.....	65
<b>Figure 36</b> : Structure moléculaire de l'acide kaurenoïque .....	66
<b>Figure 37</b> : Image MEB de <i>T. mentagrophytes</i> .....	67
<b>Figure 38</b> : MEB des formes promastigotes et amastigotes axéniques de <i>L. amazonensis</i> traités avec l'oléorésine de copaïba pendant 72 h.....	68
<b>Figure 39</b> : Évaluation du développement de la leishmaniose cutanée chez les souris traitées avec de l'oléorésine de copaïba .....	70
<b>Figure 40</b> : Le traitement par l'oléorésine réduit l'infiltration des polynucléaires neutrophiles comme révélé par immunohistochimie.....	72
<b>Figure 41</b> : Patient 1 .....	75
<b>Figure 42</b> : Patient 2 .....	75
<b>Figure 43</b> : Patient 3 .....	76
<b>Figure 44</b> : Photographies de rats de chaque groupe montrant les aspects macroscopiques et microscopiques de lambeau de peau.....	77

## Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Classification du <i>Copaifera</i> .....	17
<b>Tableau 2</b> : (a) Pourcentage des sesquiterpènes et (b) pourcentage des diterpènes contenus dans l'oléorésine de copaïba des différentes espèces .....	25
<b>Tableau 3</b> : Terpènes contenues dans l'oléorésine des différentes espèces .....	34
<b>Tableau 4</b> : Quantité théorique et réelle d'oléorésine ou de microcapsules dans les films PLA .....	53
<b>Tableau 5</b> : Résultats des différents tests antibactériens sur gélose .....	54
<b>Tableau 6</b> : L'activité antimicrobienne d'oléorésine de copaïba obtenue à partir de plusieurs espèces de <i>Copaifera</i> .....	59
<b>Tableau 7</b> : Concentration minimale inhibitrice de 11 oléorésines de Copaïba.....	60

## Liste des abréviations, acronymes, symboles, et unités

<b>Gpe</b>	<b>groupe</b>
<b>Diam.</b>	<b>diamètre</b>
<b>l</b>	<b>litre</b>
<b>ml</b>	<b>millilitre</b>
<b>kg</b>	<b>kilogramme</b>
<b>g</b>	<b>gramme</b>
<b>mg</b>	<b>milligramme</b>
<b>µg</b>	<b>microgramme</b>
<b>pg</b>	<b>picogramme</b>
<b>n</b>	<b>nombre d'individu</b>
<b>&gt;</b>	<b>supérieur</b>
<b>h</b>	<b>heure</b>
<b>GC-MS</b>	<b><i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)</b>
<b>NOAEL</b>	<b><i>no-observed-adverse-effect-level</i> (dose sans effet toxique observable)</b>
<b>PLA</b>	<b>acide polylactique</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodécyl sulfate de sodium</b>
<b>CMCel</b>	<b>Carboxyméthylcellulose</b>
<b>CMC</b>	<b>concentration micellaire critique</b>
<b>MEB</b>	<b>Microscope optique à balayage</b>
<b>pH</b>	<b>Potentiel hydrogène</b>
<b>ρ*</b>	<b>masse volumique expérimentale</b>
<b>UV</b>	<b>Ultraviolets</b>
<b>HEPA</b>	<b><i>High Efficiency Particulate Air</i></b>
<b>CFU</b>	<b><i>Colony Forming Unit</i></b>
<b>SBR</b>	<b><i>Styrene-Butadiene Rubber</i></b>
<b>Rpm</b>	<b>Rotation par minute</b>
<b>DO</b>	<b>Densité optique</b>
<b>CR</b>	<b>Croissance relative</b>
<b>CMI</b>	<b>Concentration minimale inhibitrice</b>
<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>Concentration inhibitrice à 50%</b>
<b>NO</b>	<b>monoxyde d'azote</b>

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>peroxyde d'hydrogène</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>facteur de nécrose tumorale (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>interferon-gamma</b>
<b>IL-n</b>	<b>interleukine n</b>
<b>NF-kB</b>	<b><i>nuclear factor-kappa B</i></b>

## Glossaire

- Produit forestier non ligneux : Toute marchandise tirée de la forêt sans nécessiter la coupe d'arbres.
- Implantation (nidation): attachement du blastocyste à l'épithélium de l'utérus, ainsi que sa pénétration à travers l'épithélium utérin, et son incorporation dans l'endomètre.
- Résorption: produit de conception qui, après avoir été implanté dans l'utérus, décède par la suite et est résorbé.
- Test de *Tail Flick* : La queue de l'animal est soumise à une source de chaleur rayonnante. Lorsque l'animal ressent un inconfort, il réagit par un mouvement brusque de la queue qui stoppe automatiquement la stimulation et le chronomètre mesurant le temps de latence de la réaction.
- Psoriasis : maladie auto-immune de la peau d'origine inconnue et non contagieuse. Elle se manifeste par l'apparition d'épaisses plaques de peau rouges, sèches et squameuses à différents endroits du corps. Le psoriasis touche environ 1 à 2 % de la population française, soit environ plus d'un million de personnes. Cette dermatose évolue de façon chronique avec des poussées entrecoupées de périodes de rémissions de durée variable au cours desquelles les lésions sont minimales.

## Introduction

Les médecins d'aujourd'hui tout comme les pharmaciens savent combien rude a été la lutte contre les infections et combien certaines infections résistent encore à la thérapeutique conventionnelle la mieux conduite en milieu hospitalier avec des antibiotiques et des antiviraux qui ne s'utilisent qu'en milieu spécialisé. Tous connaissent le danger de certaines infections nosocomiales multi-résistantes. Les historiens peuvent nous rappeler le nombre de morts par infections de plaies de guerre et de gangrène jusqu'à la découverte et l'apport fabuleux de la pénicilline (1). Or bien avant cette découverte, l'utilisation de plantes ou d'extraits de plantes en thérapeutique (phytothérapie) et l'utilisation d'huiles essentielles (aromathérapie) étaient très pratiquées dans la médecine traditionnelle. Actuellement, il y a un regain d'intérêt pour la phytothérapie ancienne, auprès d'un public soucieux de traitements « naturels ».

L'oléorésine de copaïba (ou copahu) illustre bien ce phénomène. Elle eut une importance considérable aux XVIII et XIXème siècles dans la pharmacopée européenne, notamment dans le traitement de la blennorragie. L'arbre dont elle est extraite, est originaire de la région tropicale d'Amérique Latine ainsi que d'Afrique de l'Ouest. Elle a été considérée en Europe, d'abord comme une panacée, puis comme "l'anti-blennorragique par excellence", puis est tombée dans l'oubli après la découverte de la pénicilline. Toutefois, elle a continué à être employée dans les pharmacopées traditionnelles en Amazonie et en Guyane (2).

De nombreux scientifiques travaillent aujourd'hui pour caractériser cette oléorésine, improprement appelée huile ou baume de copaïba. Un grand nombre d'études lui confère de nombreuses propriétés thérapeutiques et ouvrent d'importantes perspectives pour son utilisation aussi bien dans la médecine classique, la phytothérapie, la cosmétologie ou dans l'industrie de l'emballage.

On considère actuellement que près de 60% des médicaments chimiques présents sur le marché sont issus ou dérivés de substances naturelles, généralement d'origine végétale. En vue de ses très nombreuses propriétés, l'oléorésine de copaïba permettra peut être dans quelques années de créer un puissant médicament anti-infectieux, ou un médicament révolutionnaire qui traitera une pathologie jusqu'à ce jour incurable par manque de traitement efficace, ou sera un substitut beaucoup moins toxique que certains

médicaments. Il se peut également qu'elle soit utilisée en complément d'un traitement pour augmenter son efficacité et diminuer les effets indésirables.

Ce travail va donc permettre de présenter l'oléorésine de copaïba, d'étudier ses propriétés antibactériennes suite aux tests mis en place, et de s'interroger sur les domaines d'utilisation. Nous ferons d'abord un rappel historique et bibliographique sur l'arbre de copaïba, sur l'oléorésine qui peut en être extraite, sa composition chimique, son utilisation traditionnelle, ses nombreuses propriétés, ses activités pharmacologiques et les avantages et inconvénients de son utilisation. Nous verrons ensuite quels sont les matériels et les méthodes qui ont permis d'effectuer les tests antibactériens et quels sont les différents supports sur lesquels a été incorporée l'oléorésine de copaïba. Enfin nous présenterons les résultats des tests antibactériens avant d'en discuter avec les données de la littérature et de s'interroger sur les perspectives d'utilisation aussi bien dans le domaine pharmaceutique que dans d'autres domaines, et enfin de conclure.

# Partie 1 : Rappel historique et bibliographique

## 1. Généralité sur l'arbre de copaïba (partie botanique)

Le *Copaifera* ou copayer (copaïer) est un arbre qui pousse dans l'ensemble des zones tropicales (figure 2). Il se divise en plusieurs dizaines d'espèces en Amazonie et en Afrique, et d'une espèce en Malaisie (3). En Amérique latine, on retrouve des espèces qui s'étendent de la région du Mexique jusqu'au nord de l'Argentine. Cet arbre, qui fait partie des Fabacées, peut atteindre entre 25 et 40 mètres de hauteur et peut vivre jusqu'à 400 ans (4).



Figure 2 : *Copaifera officinalis* (5)

Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous-famille	<i>Caesalpinioideae</i>
Genre	<i>Copaifera</i>

Tableau 1 : Classification du *Copaifera*

La famille des Fabacées aussi appelée couramment Légumineuses (*Leguminosae*) est une famille de plantes dicotylédones. C'est une famille cosmopolite, très nombreuse et évoluée de l'ordre des Fabales. Elle est composée de plantes herbacées, d'arbustes, d'arbres ou de lianes, qui poussent dans les zones froides à tropicales. Elle est divisée en trois sous-familles :

- sous-famille *Caesalpinioideae* avec une fleur pseudo-papilionacée ;
- sous-famille *Mimosoideae* avec une fleur régulière ;
- sous-famille *Faboideae* ou *Papilionoideae* avec une fleur typique en papillon.

La famille des Fabacées comprend par exemple des plantes alimentaires de grande consommation comme : l'arachide (*Arachis hypogaea* L.), le pois (*Pisum sativum* L.), le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), le soja (*Glycine max* L.), les lentilles (*Lens culinaris* Medik.), les haricots (*Phaseolus* sp.)...(6)

L'arbre de copaïba fait partie donc de la famille des Fabacées et de la sous-famille *Caesalpinioideae* (tableau 1). L'espèce fut décrite pour la première fois par Marcgrave et Pison en 1648, sous le nom de *Copaiba*, son nom guarani. Jacquin la décrivit ensuite sous le nom de *Copaiva*, puis le scientifique suédois Carl von Linné la dénomma *Copaifera officinalis*. Par la suite, il a été décrit plusieurs espèces qui fournissent de l'oléorésine de copaïba. Perrot en 1944 énumère huit espèces botaniques différentes (2). La taxonomie de cet arbre reste néanmoins peu étudiée durant l'histoire. Le travail le plus récent sur la description de nouvelles espèces a été celui de Harms et Ducke, ces derniers ont apporté leur contribution sur la description des différentes espèces en Amazonie, ainsi que Dwyer, qui a mené une enquête sur les espèces qui poussent en Amérique.

Selon la dernière édition de l'index Kewensis (*International Plant Names Index*), le genre *Copaifera* est divisé en 72 espèces, dont seize d'entre elles se trouvent au Brésil.

Populairement connu pour son oléorésine, l'arbre de copaïba est répandu de façon importante dans la région amazonienne et le Centre ouest du Brésil. Parmi les espèces les plus abondantes, on retrouve :

- *Copaifera officinalis* L. (Amazonie du Nord, Roraima (Brésil), Colombie, Venezuela et San Salvador)
- *Copaifera guianensis* Desf. (Guyane),
- *Copaifera reticulata* Ducke (Amazonie),
- *Copaifera multijuga* Hayne (Amazonie),
- *Copaifera confertiflora* Bth (Piauí (Brésil)),
- *Copaifera langsdorffii* Desf. (Brésil, Argentine et Paraguay),
- *Copaifera coriacea* Mart. (Bahia (Brésil)),
- *Copaifera duckei* Dwyer (Brésil),
- *Copaifera martii* Hayne (Pará (Brésil)),
- *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (Ceará (Brésil)).

Les espèces les plus fréquemment utilisées pour produire l'oléorésine sont *C. reticulata* (70%), *C. guianensis* (10%), *C. multijuga* (5%) et *C. officinalis* (5%).

Au Brésil, l'espèce *C. langsdorfii* Desf. est particulièrement abondante et pousse sur tout le territoire (de Santa Catarina au Sud, jusqu'à dans le Nord-Est). Elle est divisée en quatre différentes variétés: *C. langsdorfii* var. *grandifolia*, *C. langsdorfii* *grandiflora*, *C. langsdorfii* *laxa* et *C. langsdorfii* *glabra*.

En Afrique de l'Ouest, 19 espèces sont décrites dans la région qui comprend le Congo, le Cameroun, la Guinée et l'Angola. Parmi ces espèces, on retrouve : *Copaifera convertifolia*, *Copaifera demeusii*, *Copaifera religiosa*, *Copaifera coleosperma*, *Copaifera conjugata*, *Copaifera hymenaefolia*, *Copaifera chodatiana* et *Copaifera fissicuspis*.

Il y a également la description d'une espèce qui se trouve sur l'île de Bornéo, en Malaisie, appelée *Copaifera palustris* (Symington) de Wit, et qui dispose de caractères assez semblables à ceux des espèces africaines (4).



**Figure 3** : Les régions où l'on retrouve l'arbre de copaïba (4)

Le Copayer officinal est un grand arbre de la forêt, inerme\*, élevé d'un beau port à feuilles alternes paripennées composées de 3 à 8 folioles presque sessiles ovales-lancéolées acuminées entières luisantes ponctuées et un peu coriaces. L'inflorescence est disposée en épis ou en grappes à l'aisselle des feuilles ou l'extrémité des jeunes rameaux. Les fleurs sont petites blanchâtres avec un calice à quatre sépales un peu inégaux oblongs et aigus. La corolle manque. Les étamines au nombre de 10 sont libres, égales et étalées à filaments filiformes portant des anthères petites, arrondies et jaunâtres. L'ovaire est pédiculé ovoïde glabre, le style capillaire arqué et le stigmate capité punctiforme. Le fruit est une gousse stipitée, orbiculaire, oblique, pointue, glabre, coriace et bivalve contenant une graine oblongue entourée d'un arille charnu (2,7). Le tronc est rugueux, de couleur foncée, mesurant entre 0,4 et 4 mètres de diamètre. La floraison a lieu entre Octobre et Juillet et la fructification de Juin à Octobre, avec des variations au sein de ces intervalles, en fonction de la région et du climat (4).

\* Plante se distinguant des espèces voisines par l'absence de crochets ou d'épines.

## 2. L'oléorésine de copaïba : méthode d'extraction et composition chimique

### 2-1 L'extraction : méthodes, régénération et facteurs influents

L'oléorésine de copaïba se recueille habituellement au milieu de l'été, directement sur les Copayers en perçant leur tronc (figure 4). Il en découle un fluide résineux plus ou moins abondant. L'oléorésine est d'abord limpide et incolore puis s'épaissit peu à peu et jaunit au contact de l'air. Sa consistance et sa couleur varient un peu suivant l'arbre dont il provient et suivant sa composition (7).

L'oléorésine de copaïba a été historiquement extraite par une méthode entraînant des dommages irréversibles sur l'arbre. Une incision profonde était faite à l'aide d'une hache dans le tronc de l'arbre pour accéder à l'oléorésine, mais après la récupération de ce fluide, l'arbre mourrait la plupart du temps ou ne servait plus qu'à l'abattage pour le bois. De nos jours, la récolte a lieu avec une technique alternative moins invasive. Des trous sont percés dans le tronc avec une tarière. À la partie supérieure du tronc, le trou doit atteindre l'axe de l'arbre, il doit ensuite être bouché avec un tampon de bois préparé à cet effet. On fait un trou semblable à la partie inférieure du tronc et on y adapte un tube en bambou. Dès qu'on débouche l'orifice supérieur, l'oléorésine s'écoule lentement par le tube et peut-être facilement recueillie durant 1 à 3 jours. L'opération terminée, on obture les deux trous avec de l'argile. Si l'oléorésine est récoltée soigneusement de cette façon, l'arbre peut vivre de nombreuses années et resservir à plusieurs reprises pour des extractions supplémentaires (8).



**Figure 4** : Extraction de l'oléorésine de copaïba (9)

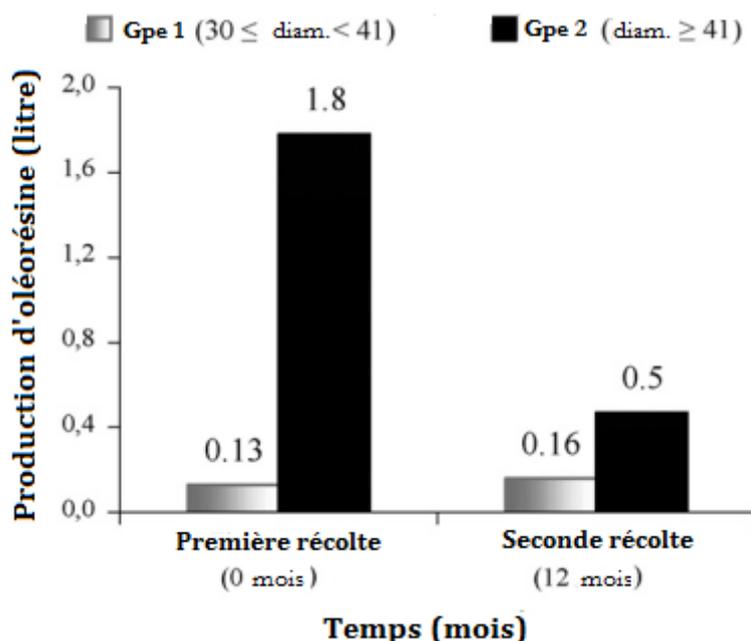
L'état d'Amazonas au Brésil est la principale source d'oléorésine de copaïba dans le commerce du monde entier. En 2008, 91% de l'oléorésine de copaïba produit au Brésil était originaire d'Amazonas (8). Cet État brésilien a adopté des politiques d'encouragement pour la production et la commercialisation de produits forestiers non ligneux, comme un moyen de générer des revenus à la population locale des régions rurales d'Amazonie. Le principal objectif de ce projet est de développer l'exploitation durable des produits de la forêt autres que le bois.

Tous les arbres de copaïba ne produisent pas d'oléorésine. La quantité d'oléorésine produite par l'arbre ne semble pas corrélée au type de forêt, à l'altitude à laquelle se trouve l'arbre, ni à la saison de la récolte. La quantité semble dépendre de l'espèce de l'arbre et de sa taille (8). La plupart des chercheurs pensent que l'oléorésine de copaïba est produite comme un moyen de défense par l'arbre contre les agressions d'agents biologiques. Il est également possible que les contraintes mécaniques et biologiques exercées sur l'arbre, par des insectes, induisent sa formation d'huile. Cette huile est une oléorésine, un exsudat composé d'acides, de résine et de composés volatils. La majorité des arbres qui produisent l'oléorésine ont été infestés par les termites.

Une étude (10) menée sur un total de 43 *C. multijuga*, montre que plus de la moitié des arbres produisent de l'oléorésine à chaque récolte, mais certains arbres n'ont rien produit durant la période de l'étude. L'étude sépare les arbres en deux groupes selon le diamètre de leur tronc. Le groupe des petits diamètres comprend les arbres avec des diamètres de troncs compris entre 30 et 41 cm. Le second groupe comprend les arbres dont le diamètre du tronc est supérieur à 41 cm. Les arbres du second groupe étaient plus infestés que les arbres de petit diamètre, ce qui signifie que plus les arbres sont grands plus ils sont prédisposés à l'attaque des termites. Un fait encore plus intéressant, est que dans les deux groupes, les arbres qui ne produisent pas d'oléorésine n'ont montré aucun signe d'infestation par les termites au cours de l'étude.

Il est plus avantageux d'utiliser les arbres avec un diamètre supérieur à 41 cm pour l'extraction de l'oléorésine en raison de leur forte production à la première récolte. Cependant, les petits arbres dont le diamètre du tronc est compris entre 30 et 41 cm, retrouvent leur production plus rapidement que les grands arbres. Ils sont capables de récupérer 100% de leur quantité initiale d'oléorésine en une seule année. Les arbres avec des petits diamètres de troncs produisent de l'oléorésine avec une plus grande continuité, puisque 82% des arbres donnent de l'oléorésine à chaque récolte, tandis que les arbres avec un plus grand diamètre nécessitent une plus longue période pour récupérer leur contenu

initial. La production d'oléorésine, dans ce groupe, a diminué de 14% après la première récolte. Par conséquent, l'extraction de l'oléorésine semble être écologiquement plus durable pour les arbres ayant un diamètre compris entre 30 et 41 cm (figure 5).

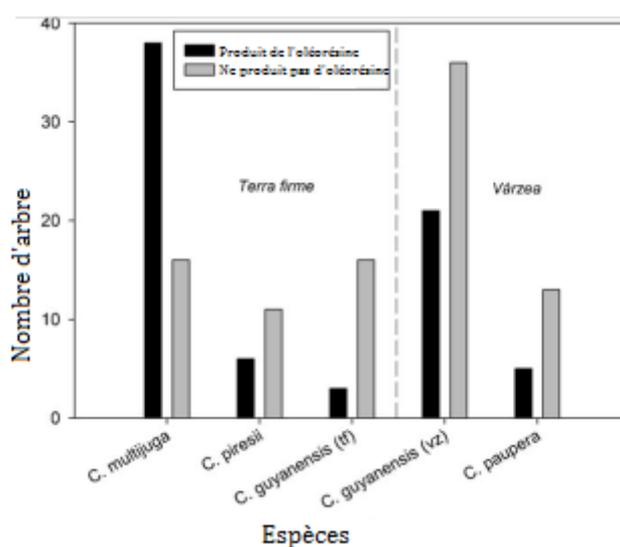


**Figure 5 :** Production d'oléorésine par arbre en fonction du diamètre du tronc au fil du temps. 1er récolte (Novembre 2004); 2ème récolte (Novembre 2005). N = 27 *C. multijuga*, au Brésil. Cette analyse n'incluait que les arbres qui ont produit de l'oléorésine dans les deux groupes lors de la récolte (10).

Au départ, seulement 63% des arbres produisent de l'oléorésine, avec un total de 28,2L soit une moyenne d'environ 1L par arbre. Parmi les arbres productifs, 57% sont classés dans le groupe 2 des diamètres supérieurs à 41 cm, et représentent 94,5% de la production totale. Douze mois après, il a été constaté que les arbres avec un diamètre compris entre 30 et 41 cm récupéraient totalement la quantité d'oléorésine qui avait été extraite lors de la première récolte, tandis que les arbres avec un diamètre supérieur à 41 cm récupéraient seulement 28% de leur volume d'extraction initial. Les deux arbres ayant la plus forte production d'oléorésine produisent seulement 5,5 et 7,2 L d'oléorésine à la première récolte, avec des diamètres de troncs respectifs de 68,8 et 61,4 cm. Pendant la récolte suivante, ces arbres ont produit seulement 0,16 et 1,2 L, respectivement (10).

La quantité d'oléorésine qui peut être récoltée dépend également de l'espèce de l'arbre du Copayer. Une étude (8) a été menée sur l'extraction d'oléorésine de quatre espèces d'arbres, *C. multijuga*, *C. guyanensis*, *C. piresti* et *C. paupera* dans deux réserves

extractives de l'ouest de l'Amazonie brésilienne. L'expérimentation a eu lieu sur un grand nombre d'arbres soit 179 copayers auparavant non exploités. Les arbres creux ont ensuite été exclus de l'analyse. Sur les 165 arbres forés non-creux restants, seulement 43% ont donné de l'oléorésine ( $\geq 1$  ml). Les autres ne contenaient pas d'oléorésine ou le procédé de forage n'a pas pu drainer l'oléorésine qu'ils contiennent. La probabilité qu'un arbre produise une oléorésine était principalement déterminée par l'identité de l'espèce: *C. multijuga* était la seule espèce qui donne régulièrement de l'oléorésine (70% des arbres). Le rendement en volume varie selon l'espèce : *C. multijuga* a le plus grand rendement moyen de 505 ml, tandis que *C. guyanensis* a produit des volumes plus élevés d'oléorésine dans la région Várzea (139 ml) que dans la région de Terra Firme (15 ml) (figure 6). Les différences intra-spécifiques sont principalement dues à la différence de taille des arbres (8).



**Figure 6 :** Fréquence de production de l'oléorésine par les arbres des quatre espèces de *Copaifera*. *C. guyanensis* est présent dans différentes régions et a donc été séparé par type de forêt (tf: forêt de Terra Firme et vz: forêt de Várzea) (8).

Une deuxième étude (11) met également en évidence l'influence de l'espèce du copayer sur la production d'oléorésine dans la région amazonienne du Brésil. Sur 110 arbres appartenant à quatre espèces de copayer, la proportion d'arbres produisant de l'oléorésine ( $> 1$  ml) a été significativement plus élevée pour *C. reticulata* (62,1%) et *C. paupera* (46,7%) que *C. pubiflora* (31,4%), et *C. multijuga* (18,8%). Le rendement en volume d'oléorésine des arbres *C. pubiflora* était significativement plus élevé que celui de

*C. reticulata*, *C. paupera*, ou encore *C. multijuga* (Annexe 1). Aucune des caractéristiques morphologiques des arbres étudiés n'avaient d'influence sur leur rendement (11).

La proportion d'arbres qui donnent de l'oléorésine selon les espèces ainsi que la quantité donnée le cas échéant diffèrent selon les études, puisqu'elles dépendent probablement de plusieurs facteurs, tels que la taille des arbres choisis, l'infestation par les termites, la région dans laquelle se trouve l'arbre...

## 2-2 Composition chimique

L'oléorésine de copaïba peut être chimiquement divisée en 2 parties, la première contient les composés volatils, qui donnent l'huile essentielle, et la seconde correspond à la fraction résineuse. Comme de nombreuses plantes, le copayer produit essentiellement des terpènes, qui sont des hydrocarbures formés à partir d'unités isoprène  $C_5H_8$  pour donner des structures mono, sesqui- et diterpéniques (respectivement volatiles, volatiles et non volatiles), comme les acides terpéniques (acides résiniques) non volatils. Ces acides sont présents dans les résines des plantes et plus particulièrement dans celle des conifères. Ils sont produits par les cellules épithéliales parenchymateuses qui entourent les conduits de résine des arbres pour la protection et la préservation du bois. Les acides terpéniques sont des métabolites secondaires des plantes, c'est-à-dire que ce sont des substances qui ne sont pas fondamentalement vitales pour les plantes mais qui sont fabriquées par cette dernière pour se protéger et lutter contre les agressions extérieures comme les insectes, les champignons, les blessures...

Dans une étude récente (12), tous les composés de l'oléorésine issus de *Copaifera langsdorffii* Desf., ont été analysés. Ils ont été identifiés et caractérisés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

La fraction volatile (avec un rendement massique de 22,51%) est constituée d'un mélange d'une quarantaine de terpènes et de paraffines. Elle contient très majoritairement des sesquiterpènes (96,36%), dont le principal étant le trans-bergamotène (48,38%), puis himachalène (11,17%), caryophyllène (5,47%), élémène (5,06%), cyclosativène (5,02%), et selinène (5,00%), ainsi que des paraffines (2,21%), sesquiterpénols (0,85%), et esters de méthyle diterpènes (0,47%).

La fraction non volatile de la résine est composée d'acides diterpéniques et de diterpènes conjugués, comme l'acide copalique, pimarique, isopimarique, abiétique, daniellique, gibbérellique, et d'acide à structure labdanique. L'analyse de cette fraction met

notamment en évidence la présence de 44,73% d'acides diterpéniques, 31,74% de sesquiterpènes, 1,21% de phythormones et phéromones, 3,85% d'acides gras, et 5,58% de diterpènes, parmi lesquels 35,68% avaient des structures conjuguées insaturées (Annexe 2) (12).

La composition de l'oléorésine a également été analysée sans séparer la fraction volatile de la non volatile, dans une étude (13) sur l'extrait d'oléorésine de *Copaifera multijuga*. Les résultats de l'analyse par GC-MS montrent que l'oléorésine est composée très majoritairement de sesquiterpènes avec la prédominance de  $\beta$ -caryophyllène (36,0%), suivie par  $\alpha$ -copaène (18,8%),  $\beta$ -bisabolène (8,5%), et  $\alpha$ -trans-bergamotène (7,0%).

Une autre étude (14) compare les oléorésines de copaïba obtenues à partir de trois espèces différentes : *C. multijuga* Hayne, *C. cearensis* Huber (ex Ducke) et *C. reticulata*.

(a) Percentual sesquiterpene content in copaiba oils

Sesquiterpene	RI	<i>Copaifera multijuga</i>	<i>Copaifera cearensis</i>	<i>Copaifera reticulata</i>
$\alpha$ -elemene	1344	0.3	–	0.4
$\alpha$ -cubebene	1352	0.3	1.8	0.4
$\alpha$ -copaene	1382	2.5	8.2	3.0
$\beta$ -cubebene	1393	–	3.3	–
$\alpha$ -cedrene	1400	1.1	–	1.5
calarene	1417	0.3	–	0.2
longifolene	1423	0.1	0.5	0.2
$\beta$ -caryophyllene	1426	57.5	19.7	40.9
$\alpha$ -bergamotene	1436	2.6	2.1	4.1
$\beta$ -sesquiphellandrene	1442	0.1	0.8	0.3
aromadendrene	1447	0.2	1.7	–
$\alpha$ -humulene	1457	8.3	3.7	6.0
$\alpha$ -curcumene	1468	–	0.1	0.9
$\gamma$ -amorphene	1478	1.9	0.9	2.2
germacrene D	1483	2.4	0.4	5.0
$\alpha$ -aromadendrene	1490	–	3.8	–
germacrene B	1499	1.0	3.6	1.9
$\beta$ -bisabolene	1509	0.3	2.8	0.8
$\gamma$ -cadinene	1515	0.6	–	2.1
$\delta$ -cadinene	1524	1.7	7.2	2.6
$\alpha$ -cadinene	1531	0.2	0.1	0.1
$\alpha$ -selinene	1536	–	0.1	0.2
$\beta$ -vetivene	1542	0.1	0.5	0.2
$\alpha$ -caryophyllenol	1554	0.7	0.1	–
ledol	1565	0.2	0.5	–
multigenol	1572	–	–	0.3
caryophyllene oxide	1582	0.5	1.5	2.4
guaïol	1595	0.2	0.3	–
cedrol	1616	0.4	1.4	0.6
NI	1625	0.2	0.2	–
cadalene	1637	0.4	0.4	0.6
NI	1642	0.7	–	0.7
$\alpha$ -cadinol	1649	–	0.7	0.6
$\alpha$ -bisabolene oxide	1655	0.4	–	–
$\beta$ -bisabolol	1666	0.1	8.2	0.4
acetoxycaryophyllene	1700	0.2	–	–
methyl 3-methyl-5(2,2,6-trimethyl-6-hydroxy-1-cyclohexyl)-pentanoate		–	2.1	–
sesquiterpene content (%)		85.5	76.5	78.2

NI, not identified.

(b) Percentual diterpene content in copaiba oils

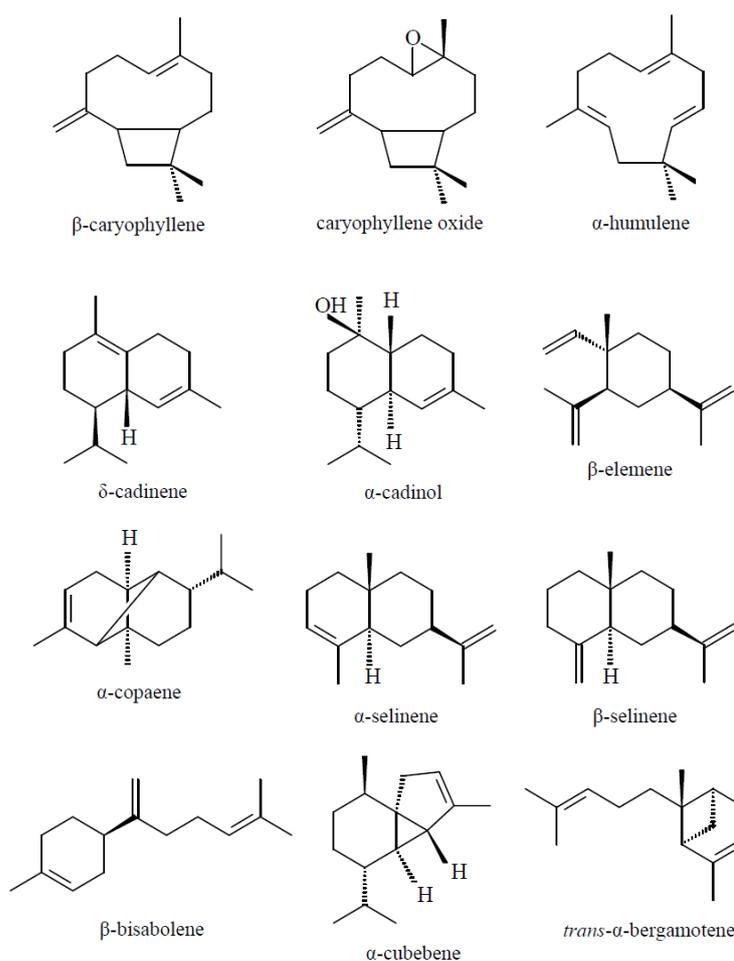
Diterpenes	<i>Copaifera multijuga</i>	<i>Copaifera cearensis</i>	<i>Copaifera reticulata</i>
NI	–	–	0.3
16-kaurene	–	–	1.6
methyl eperuate	0.4	0.8	–
NI	–	–	2.3
NI	–	–	1.7
methyl cativate	–	0.5	–
methyl kaurenate	–	–	3.9
methyl copalate	6.2	2.1	2.4
methyl kolavenate	–	0.5	3.4
NI	–	1.1	–
methyl hardwickiate	–	6.2	2.3
dimethyl pinifolate	0.2	–	–
NI	1.3	–	–
methyl clorechinatate	–	11.3	0.1
NI	0.4	1.0	–
dimethyl clerod-3-en-15,18-dioate	–	0.1	–
dimethyl agathate	2.1	–	1.5
methyl 3-hydroxy-copalate	0.6	–	–
methyl 3-acetoxy-copalate	3.4	–	1.4
NI	–	–	1.2
diterpene content (%)	14.5	23.5	21.8
Total (%)	100	100	100

NI, not identified.

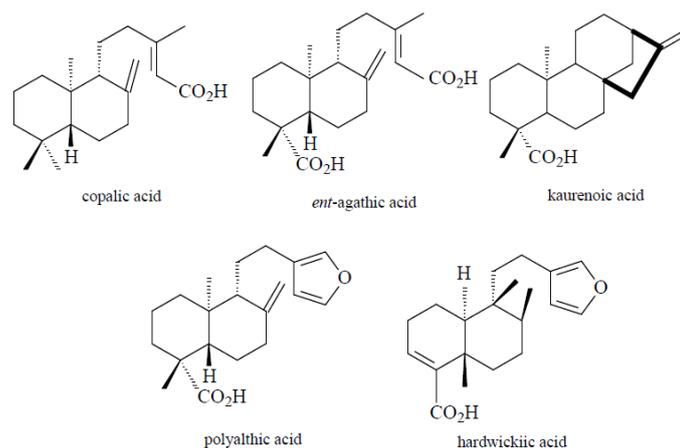
**Tableau 2 :** (a) Pourcentage des sesquiterpènes et (b) pourcentage des diterpènes contenus dans l'oléorésine de copaïba des différentes espèces (14).

Cette étude met en évidence la grande hétérogénéité dans la composition chimique de l'oléorésine entre les différentes espèces (tableau 2). Certaines molécules ne sont présentes que chez une ou deux espèces (à des taux très faibles) et d'autres molécules sont présentes chez les trois espèces mais à des pourcentages différents. Mais globalement, les compositions des différents extraits sont assez proches avec une majorité de sesquiterpènes totaux (entre 76,5% et 85,5%) et la présence entre 14,5% et 23,5% de diterpènes. Les sesquiterpènes qui sont présents avec les taux les plus élevés, sont retrouvés chez toutes les espèces comme le  $\beta$ -caryophyllène qui est largement majoritaire dans chaque extrait, ainsi que les  $\alpha$ -bergamotène,  $\alpha$ -humulène, cadinène,  $\alpha$ -copaène, et  $\beta$ -bisabolène...

En résumé, les principaux sesquiterpènes trouvés dans l'oléorésine de copaïba sont:  $\beta$ -caryophyllène, l'oxyde caryophyllène,  $\alpha$ -humulène,  $\delta$ -cadinène,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -cubébène,  $\beta$ -sélinène  $\alpha$ - et  $\beta$ -élémente,  $\alpha$ -copaène, *trans*- $\alpha$ -bergamotène, et  $\beta$ -bisabolène (figure 7). Et les diterpènes le plus souvent trouvés sont l'acide copalique, polyalthique, hardwickique, kaurenoïque et l'acide enantio-agathique (Figure 8) (15).



**Figure 7:** Principaux sesquiterpènes détectés dans l'oléorésine de copaïba (15).



**Figure 8** : Principaux diterpènes détectés dans l'oléorésine de copaïba (15).

### 3. Utilisation traditionnelle et propriétés thérapeutiques

#### 3.1 Historique de l'utilisation de la copaïba

Dans le passé, le Baume de Copahu faisait partie des pharmacopées de divers pays européens. Il eut une importance considérable aux XVIII et XIX<sup>ème</sup> siècles, notamment dans le traitement de la blennorrhagie. Le Père Labat (1741), qui a vécu plusieurs années aux Antilles, en fait un éloge tout à fait remarquable : [Il est tellement ami de l'homme qu'il ne fait aucun mal, il est subtil, il pénètre partout, et ne manque jamais d'inciter les humeurs, et par ce moyen de tirer d'affaire les malades les plus désespérés]. Il énumère ensuite toutes ses indications, le décrivant comme une panacée utile contre tous les maux. On peut y lire notamment [cette huile est merveilleuse pour refermer promptement toutes sortes de plaies faites avec le fer, le bâton, les chutes et autres accidents ...].

En 1739, Chomel le cite dans les plantes "vulnéraires astringentes" : [il a celle (la vertu) d'arrêter les cours de ventre, la dysenterie et les pertes rouges ou blanches des femmes. On le prend dans un œuf frais, ou en bol à douze ou quinze gouttes avec un peu de sucre, ou en lavement. On en frotte la région de l'estomac et du nombril pour les indigestions et la colique ...]. Il figure également dans le Dictionnaire des drogues (1807) de Lémery : [Le baume de Copahu est employé ... pour déterger et consolider les plaies, pour fortifier les nerfs, pour les fractures et les dislocations. On l'emploie intérieurement par goutte sur du sucre, en émulsion par l'intermédiaire du jaune d'œuf, pour arrêter les écoulements blancs et rouges des femmes, et les gonorrhées].

Descourtilz (1829) vante également, dans sa flore médicale des Antilles, les qualités innombrables du "copaïer balsamifère" : "adouçissant, pectoral, très-détersif et

excellent pour consolider les plaies; c'est un des spécifiques des maladies vénériennes et des blennorragies suspectes ... "

Notons que c'est seulement en 1838 que Ph. Ricord fit clairement la distinction entre la syphilis et la blennorragie. C'est cette dernière indication qui a fait le plus grand succès du baume de Copahu au XIX<sup>ème</sup> siècle. Il "est l'anti-blennorragique par excellence".

Son importance déclina au XX<sup>ème</sup> siècle, probablement suite à la découverte de la pénicilline (1929). Actuellement, il est seulement prescrit parfois en aromathérapie comme antiseptique urinaire et anti-inflammatoire ostéo-articulaire. Il est également utilisé comme fixateur en parfumerie. Actuellement, c'est dans le domaine de la cosmétique (produits d'hygiène corporelle) qu'il semble trouver un certain renouveau : il est ainsi commercialisé comme produit naturel "pour protéger la peau contre les agressions externes et en massage comme décontracturant". Récemment, un brevet français a été déposé sur un de ses composants comme conservateur naturel (2).

### 3.2 Usages traditionnels en Guyane française

Dès 1650, le Père Pelleprat, en mission chez les Galibis, en "constate les effets merveilleux". Barrère, médecin et botaniste du Roi en mission à Cayenne en 1741, note que les Indiens attribuent un pouvoir quasi surnaturel au baume de Copahu et qu'ils l'emploient pour cicatriser les plaies et pour guérir un certain nombre de maladies.

Le Copahu continue à être utilisé de nos jours dans les pharmacopées traditionnelles : chez les Créoles et les Palikur du bas-Oyapock, l'oléorésine de *C. guianensis* Desf. est utilisée comme lotion capillaire et en friction contre les rhumatismes et les crampes. Chez les Wayãpi de Camopi, l'écorce du tronc préparée en décoction est bue contre la dysenterie.

Sur le Maroni, le Lieutenant Ronmy, au XIX<sup>ème</sup> siècle, nous précise que "le copahu est tellement commun qu'il n'est pas un de nos campements où ne nous foulions ses graines à nos pieds". Chez les Bonis (A1uku), habitants du Suriname et de la Guyane française, nous avons noté l'usage de l'oléorésine de *C. guianensis*, en mélange avec un jaune d'œuf, comme remède, réputé très efficace, contre la "chaude-pisse", c'est-à-dire la blennorragie. Il est recommandé ensuite de boire un jus de citron. Le traitement doit être fait le matin, à jeun, trois jours de suite. Un autre usage a attiré notre attention : la résine est appliquée pour soigner les plaies, notamment celles dues à la leishmaniose américaine.

Cette espèce est également employée sous d'autres formes : la macération des feuilles dans l'eau froide est bue contre la diarrhée et le mal de ventre et la macération de l'écorce dans du rhum pour lutter contre "le froid". L'écorce de l'arbre est utilisée en bain de siège pour les femmes après l'accouchement.

Son emploi, en émulsion dans un jaune d'œuf, est identique à celui décrit par le père Labat (1728) aux Antilles, puis dans les pharmacopées européennes du XVIIIème. Il fait nul doute que l'emploi médicinal du baume de copahu revienne en premier lieu aux Amérindiens et qu'il s'est transmis ensuite aux Européens. Il est possible que les esclaves noirs l'aient appris de leurs maîtres sur les plantations. Il faut toutefois noter l'usage en Afrique (au sud-Cameroun) de l'écorce de *Copaifera religiosa* en décoction contre la blennorragie et la syphilis. Les femmes l'utilisent également en bain de siège après une fausse-couche ou en prévention de celle-ci (2).

### 3.3 Usages traditionnels en Amazonie

L'usage du baume de Copahu comme topique est retrouvé dans d'autres pharmacopées traditionnelles, notamment au Brésil où Maffei mentionnait dès 1588, "qu'il a une merveilleuse vertu pour guérir les plaies et ôter la marque des cicatrices" (cité par Pintat, 1984). Le Cointe (1922) souligne également cette propriété : "Appliquée sur les blessures, elle en facilite singulièrement la cicatrisation". Teixeira précise que "par son pouvoir cicatrisant, à l'intérieur du pays, on employait l'huile au nombril des nouveau-nés pour en éviter les tétanos.

Dans l'état du Para, l'oléorésine de l'espèce *Copaifera multijuga* est utilisée contre la fièvre, le mal de tête et comme fortifiant : on met quelques gouttes de l'huile dans une tisane.

A Manaus, l'oléorésine et l'écorce de *C. multijuga* sont commercialisées sur le marché comme cicatrisant, anti-inflammatoire et contraceptif. L'oléorésine de copaïba y est très réputée pour soigner les blessures (en frictions), combattre la toux (ajoutée à du miel) et les inflammations (mélangée à du lait ou du miel). On l'utilise également en Amazonie brésilienne pour soigner les ulcères et les cancers.

Un usage (*C. reticulata*) contre le psoriasis a également été relevé chez les Indiens du Rio Solimoes. En Colombie, le baume de copahu (*C. publijlora* Benth.) est également utilisé comme topique pour soigner les ulcères rebelles et les plaies infectées.

Dans un tout autre domaine, son intérêt comme combustible dans les moteurs diesel pourrait en faire une source renouvelable d'hydrocarbure, un "pétrole vert".

L'usage du copahu est donc très répandu en Amazonie ; il est actuellement commercialisé par plusieurs laboratoires pharmaceutiques ou cosmétiques, conditionné en flacon ou en gélules, comme phytothérapie, complément alimentaire ou cosmétique (2). Il est actuellement commercialisé par exemple chez Dieti-Natura, Laboratoire Takiwasi, Copaíba Nature...

## **4. Avantages et inconvénients de l'utilisation de l'oléorésine**

### **4.1 Les avantages**

#### **4.1.1 Propriétés médicinales démontrées**

De nombreuses propriétés médicinales de l'oléorésine de copaíba ont été démontrées au cours des années comme :

- Pour les voies urinaires : propriétés anti-blennorragique, anti-inflammatoire, anti-gonorrhéique, antiseptique, traitement des cystites, stimulant urinaire, traitement de l'incontinence urinaire, et traitement de la syphilis.

- Pour les voies respiratoires : propriétés antiasthmatiques, expectorantes, traitement des bronchites, traitement des maux de gorge (pulvérisation direct), traitement des hémoptysies, des pneumonies, et des sinusites.

- Pour les affections de la peau : antifongique, traitement des dermatites, de l'eczéma, du psoriasis, ainsi que la cicatrisation des plaies et ulcères.

- Pour les affections digestives : gastroprotecteur.

- Autres propriétés : aphrodisiaque, antitétanique (chez le nouveau-né), antitétanique (contre le bacille du tétanos et les convulsions), antirhumatismale, anti-herpétique, antiparasitaire, insecticide, anticancéreux, anti-tumorale, traitement de la leishmaniose, des leucorrhées, de la paralysie, des maux de tête, anxiolytique, anti-nociceptive, et contre les morsures de cobra (4,16–21).

#### **4.1.2 L'absence de génotoxicité**

Comme, il existe peu d'études évaluant la génotoxicité de l'oléorésine commerciale, les fractions volatiles ainsi que résineuses, ont été évaluées chez la souris par test des

comètes et micronoyaux. Une dose unique de l'oléorésine, avec la fraction volatile ou résineuse à une quantité de 500, 1000 et 2000 mg/kg de poids corporel, a été administrée par gavage. Par le test des comètes, aucun dommage à l'ADN n'a été observé. De même, aucune activité mutagène au niveau chromosomique n'a été observée avec le test des micronoyaux. Ainsi, on peut supposer que la résine et les fractions volatiles de l'oléorésine du produit commercial ne sont pas génotoxiques ou mutagènes (22).

#### 4.1.3 L'absence théorique de tératogénicité

Une étude, réalisée sous la direction de l'Organisation de coopération et développement économique, fournit des données sur la toxicité pour le développement fœtal de l'oléorésine de *C. reticulata* chez les rats en gestation. Des rats Wistar (25 par groupe de dose) ont été traités par gavage avec l'oléorésine à des doses allant de 0, 500, 1000 à 1250 mg/kg de poids corporel par jour, pendant une période 6 à 19 jours de gestation suivie d'une césarienne pratiquée au 20<sup>e</sup> jour de gestation. Les implantations, les fœtus vivants et morts et les résorptions ont été enregistrés. La moitié des fœtus de chaque portée a été examiné à la recherche d'anomalies viscérales et le reste a été défriché et coloré pour l'évaluation du squelette. L'oléorésine est toxique pour la mère (diminution des apports alimentaires et diminution du poids) et embryotoxique (poids fœtal inférieur et augmentation de la fréquence des variations du squelette du fœtus) aux deux doses les plus élevées, mais n'a pas causé ni décès des embryons ni malformations fœtales, aux doses étudiées. L'étude conduit à l'observation d'une dose sans effet toxique observable par voie orale (*no-observed-adverse-effect-level* : NOAEL) à 500 mg/kg de poids corporel par jour pour la toxicité maternelle et le développement fœtal induit par l'oléorésine. Les résultats suggèrent que l'oléorésine de copaïba ne pose pas de risque pour la santé des femmes enceintes lorsqu'elle est utilisée aux doses recommandées (jusqu'à cinq gouttes, trois fois par jour) (23).

En raison de l'utilisation de l'oléorésine copaïba sous forme de suppositoire pour les infections gynécologiques, une autre étude évalue les effets du copaïba issu de *Copaifera duckei* Dwyer, sous forme d'une crème vaginale, sur les performances de reproduction de rats Wistar femelles. A cet effet, trois groupes (n = 5-6/groupe) de rats femelles ont été traitées comme suit: 1 - crème vaginale d'oléorésine de copaïba (28,6 mg/kg), 2 - Base de la crème vaginale et 3 - contrôle (sérum physiologique à 0,9%), administrés par voie intra-vaginale, sur une période de 30 jours avant la grossesse, et à

partir du 1<sup>er</sup> jour jusqu'au 20<sup>e</sup> jour de la grossesse. Une laparotomie a été réalisée au 21<sup>e</sup> jour, suivie de la détermination de certaines variables de la reproduction comme : le nombre de fœtus vivants et de fœtus morts, la masse des fœtus, la masse du placenta, le nombre d'implantations et de résorptions, le nombre de corps jaunes, avant et après la perte de l'implantation, ainsi que l'analyse des fœtus à la recherche d'anomalies externes et internes et/ou de malformations squelettiques et viscérales. Le trans-caryophyllène présent dans les échantillons est utilisé en tant que marqueur phyto-chimique.

Les résultats de cette étude mettent en évidence une absence de toxicité maternelle, de foetotoxicité ou d'embryofœtototoxicité à la dose administrée, ce qui correspond à dix fois la dose recommandée pour une utilisation chez l'homme. Par conséquent, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les groupes traités et le groupe contrôle, pour les variables analysées. Ainsi, il a été conclu que la crème vaginale contenant 2,5% d'oléorésine de copaïba est sans danger pendant la grossesse, chez les rats femelles (*Rattus norvegicus*) de la souche Wistar (24).

Cependant, il n'existe pas de corrélation systématique entre l'homme et l'animal, mais des résultats non tératogènes chez l'animal sont rassurants. Il est actuellement demandé des tests sur deux espèces d'animaux dont au moins l'une deux ne doit pas être un rongeur, pour pouvoir supposer l'utilisation sans danger chez la femme enceinte. Mais le modèle animal ne suffit pas, seul le recul clinique peut apporter la preuve réelle de l'innocuité gestationnelle.

#### **4.1.4 Source renouvelable et développement durable**

L'extraction de l'oléorésine auparavant limitée à un usage par les populations locales, a pris une nouvelle proportion et a été introduite sur le marché international. L'Amazonie est la principale source d'oléorésine de copaïba commerciale dans le monde. Avec l'utilisation croissante de cette oléorésine, son extraction s'est étendue à plus grande échelle, ce qui suscite des préoccupations sur sa durabilité.

L'État brésilien d'Amazonas a adopté des politiques d'encouragement de la production et la commercialisation de produits forestiers non ligneux, comme un moyen pour générer des revenus pour les populations des régions rurales d'Amazonie. Dans le cadre de cet effort, le gouvernement a créé une agence chargée des produits forestiers ainsi qu'un centre de cosmétiques utilisant des produits naturels. Des projets de gestion, scientifiques et technologiques ont également été financés, pour le développement de

forêts. L'objectif principal de ces projets est de développer des techniques pour l'utilisation durable des produits de la forêt qui permettrait une augmentation des revenus des populations locales. Sur le plan économique, l'augmentation de la demande pour l'oléorésine de copaïba, locale et internationale, est favorable.

Les gestionnaires de ces aires protégées en Amazonie, visent à concilier le maintien de l'intégrité de la forêt, de la biodiversité et de l'écosystème tout en favorisant les activités extractives durables. Ces réserves représentent plus de 35% de l'Amazonie brésilienne. Sans oublier que les huiles et résines des arbres, représentent une option de ressources extractive attrayante, puisque ces produits sont non-périssables et ont une valeur relativement élevée par unité de poids (8,10).

## **4.2 Les inconvénients**

### **4.2.1 Les difficultés galéniques**

Les caractéristiques organoleptiques de l'oléorésine sont désagréables. L'odeur du copahu est forte et pénétrante. Sa saveur aromatique est âcre, amère et très désagréable (7). Parmi les causes qui ont participé à l'oubli du copahu, doivent figurer : [son insupportable saveur, ... ces renvois tellement désagréables que beaucoup de malades n'en veulent absolument plus après quelques jours de son emploi] (2).

Comme expliqué précédemment, certains composés de l'oléorésine sont volatiles, ce qui pose un problème pour la conservation. La quantité de ces composés risque de baisser ou même de disparaître par évaporation avec le temps, ce qui est très problématique surtout s'il s'agit des composés actifs. Certains composés sont également sensibles à l'oxydation en contact avec l'air, puisque ces molécules possèdent de nombreuses liaisons insaturées. Des dérivés oxydatifs sont produits et peuvent être actifs ou non. De plus, l'oléorésine est probablement photosensible et thermolabile car certaines molécules comme le dinorlabdane est un produit de réaction suite à l'exposition de l'oléorésine à la lumière et à la température qui a conduit à la perte d'une partie de la chaîne latérale (15).

### **4.2.2 Les effets indésirables**

Les effets indésirables de l'oléorésine de copaïba sont peut étudiés. On trouve dans la littérature : Son administration est quelquefois suivie de vomissements, de diarrhée par irritation de l'intestin, surtout à fortes doses. Il n'est pas rare de voir survenir une éruption de la peau, nommée roséole de copahu par Pomme d'Oloron, en 1836 (2).

A une certaine concentration, l'oléorésine peut montrer des signes de toxicité sur les cellules de mammifères. En utilisant l'oléorésine de 8 espèces de copaïba différentes, une étude met en évidence cette toxicité. Les oléorésines montrent une cytotoxicité modérée sur les cellules nucléées, avec une plage de concentration nécessaire pour réduire l'intégrité de la monocouche de 50% étant de 17,5 à 32,5 pg/ml selon l'espèce. La toxicité sur les globules rouges a été observée par un effet hémolytique à 50% au-dessus de 500pg/ml, pour la moitié des oléorésines issues des différentes espèces. Différentes oléorésines ont causé la peroxydation des lipides, l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire et ont modifié le potentiel mitochondrial (17).

#### 4.2.3 La variabilité dans la composition de l'oléorésine

Actuellement, seules les caractéristiques physiques, telles que la densité et la couleur, sont couramment utilisées pour différencier les oléorésines de copaïba (14). Or, il existe une grande variabilité de composition chimique entre les espèces comme nous montre l'étude sur 8 espèces de copaïba (Tableau 3). Le principal sesquiterpène et le principal acide diterpénique ne sont pas qualitativement ou quantitativement les mêmes chez toutes les espèces (17). Une autre étude sur la composition et l'activité des oléorésines de copaïba obtenues à partir de *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke et *Copaifera reticulata* Ducke, démontre que, bien qu'apparemment similaires, ces oléorésines possèdent une variabilité dans la composition et l'activité anti-inflammatoire (14).

<i>Copaifera</i> species	Sesquiterpenes (%)		Acid diterpenes (%)	
	Total content	Main compound	Total content	Main compound
<i>C. reticulata</i>	78.2	$\beta$ -caryophyllene (40.9)	21.8	kaurenoic (3.9)
<i>C. martii</i>	37.7	$\beta$ -bisabolene (10.7)	62.3	kovalenic (29.0)
<i>C. cearensis</i>	76.6	$\beta$ -caryophyllene (19.7)	23.5	hardwickiic (6.2)
<i>C. paupera</i>	45.5	$\beta$ -bisabolene (20.2)	54.5	kaurenoic (13.3)
<i>C. langsdorfii</i>	40.4	$\beta$ -caryophyllene (32.8)	59.6	kaurenoic (44.3)
<i>C. multijuga</i>	85.5	$\beta$ -caryophyllene (57.5)	14.5	copalic (6.2)
<i>C. officinalis</i>	22.7	$\beta$ -caryophyllene (8.5)	77.3	hardwickiic (30.7)
<i>C. lucens</i>	18.6	$\beta$ -caryophyllene (1.8)	81.4	polyaltic (69.8)

**Tableau 3 :** Terpènes contenues dans l'oléorésine des différentes espèces (17).

Cette variabilité chimique impacte donc sur les propriétés médicinales de l'oléorésine. L'activité biologique va donc dépendre également de l'espèce à partir de

laquelle l'oléorésine a été extraite. Une étude a rassemblé les propriétés biologiques suivantes de l'oléorésine de chaque espèce évaluée :

- *C. cearensis* Huber ex Ducke: antimicrobien, anti-inflammatoire, anti-leishmaniose
- *C. duckei* Dwyer: antiprolifératif, antimutagène, embriotoxique, anti-inflammatoire, analgésique
- *C. langsdorffii* Desf. : Antimicrobien, atténuation de l'effet ischémie/reperfusion intestinale induite, effet gastroprotecteur sur l'ulcère gastrique expérimental (modèles chez le rat), anti-leishmaniose, cicatrisant, antioxydant, insecticide, anti-inflammatoire, antimutagène
- *C. lucens* Dwyer: antimicrobien, anti-leishmaniose
- *C. martii* Hayne: antimicrobien, anti-leishmaniose
- *C. multijuga* Hayne: Anti-inflammatoire, antimicrobien, anti-tumorale, anti-nociceptif, anti-leishmaniose, cicatrisant
- *C. officinalis* (Jacq.) L.: antimicrobien, anti-ischémique, anti-inflammatoire, anti-leishmaniose, inhibition de l'élastase leucocytaire humaine, effet anti-tumoral
- *C. paupera* Dwyer: antimicrobien, anti-leishmaniose
- *C. reticulata* Ducke: anti-inflammatoire, antimicrobien, insecticide, anti-nociceptif, tératogène et embriotoxique, anti-leishmaniose, cicatrisant, anxiolytique
- *C. sp.* (Oléorésine commerciale de copaïba): antimicrobien, anti-inflammatoire, améliore la perfusion cutanée, insecticide (15).

Un autre inconvénient dans l'utilisation de cette oléorésine est l'hétérogénéité dans la composition chimique chez une même espèce de copayer. Dans le but de connaître les différences de composition chimique des oléorésines de copaïba, 22 échantillons de l'espèce *C. multijuga* Hayne ont été collectés, estérifiés avec  $\text{CH}_2\text{N}_2$ , caractérisés par GC couplée à un détecteur à ionisation de flamme et analysés par GC-MS. Cette étude a permis d'identifier au total 35 composants dans les oléorésines et les analyses ont permis de diviser les échantillons en trois groupes, en fonction du principal sesquiterpène présent. La différence entre les oléorésines était principalement influencée par le contenu en  $\beta$ -caryophyllène (principal composé dans 14 échantillons) et en oxyde de caryophyllène (composé principal dans six échantillons). Ces oléorésines, généralement caractérisées par la présence de sesquiterpènes et de diterpènes, contenaient sept composés qui ont été détectés dans tous les échantillons analysés mais à des concentrations différentes (copaène,

$\alpha$ -humulène, amorphène,  $\beta$ -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène, l'acide copalique, et acide pinifolique), avec une majorité quantitative de sesquiterpènes dans toutes les oléorésines étudiées.

Bien que les diterpènes et sesquiterpènes soient présents dans des proportions similaires dans toutes les oléorésines, un profil qualitatif différent a été observé, confirmant la possibilité d'une variation de la composition chimique des échantillons d'oléorésine de la même espèce d'arbres qui ont poussé dans des conditions similaires et ce qui suggère l'existence de trois types d'oléorésines de compositions chimiques différentes chez *C. multijuga* (25).

Dans une autre étude, la composition chimique de l'oléorésine de *C. reticulata* a été caractérisée et sa variabilité liée à des variations saisonnières (sec ou saison des pluies), à des extractions successives, à plusieurs facteurs associés à la morphométrie de l'arbre, la maladie, et la structure de la végétation environnante ont été étudiés. L'oléorésine a été recueillie auprès de 24 arbres de *C. reticulata* entre Octobre 2006 et Mars 2008. Pour sept d'entre eux, les oléorésines ont été extraites une seconde fois entre trois et neuf mois après la première extraction. Pour chaque arbre, plusieurs variables morphométriques, à savoir : la présence de termites, de plantes grimpantes, et des trous ainsi que le type de sol et la structure de la végétation environnante, ont été enregistrées. La composition chimique et la concentration des composés volatils ont été identifiées par GC/MS. Près de 100% des composants volatils étaient des sesquiterpènes, les trois principaux étant  $\beta$ -caryophyllène, trans- $\alpha$ -bergamotène, et  $\beta$ -bisabolène. Une analyse de classification sépare les échantillons de *C. reticulata* en deux groupes principaux, et la division d'un de ces groupes en deux sous-groupes, selon les différentes concentrations des trois composés principaux. Les résultats ont montré une grande variabilité intra-population dans la composition et la concentration de sesquiterpènes, ce qui est comparable à la variabilité de la composition chimique interspécifique. Il n'a pas été démontré d'influence significative des différents facteurs tels que l'environnement, la morphométrie de l'arbre et la structure de la végétation environnante sur la composition de l'oléorésine. Cependant la composition de certaines molécules varient en fonction du type de sol, du volume d'extraction de l'oléorésine, et de la surface de la couronne (partie de l'arbre allant de la première branche à la cime) (26).

## Partie 2 : Matériels et méthodes des tests antibactériens

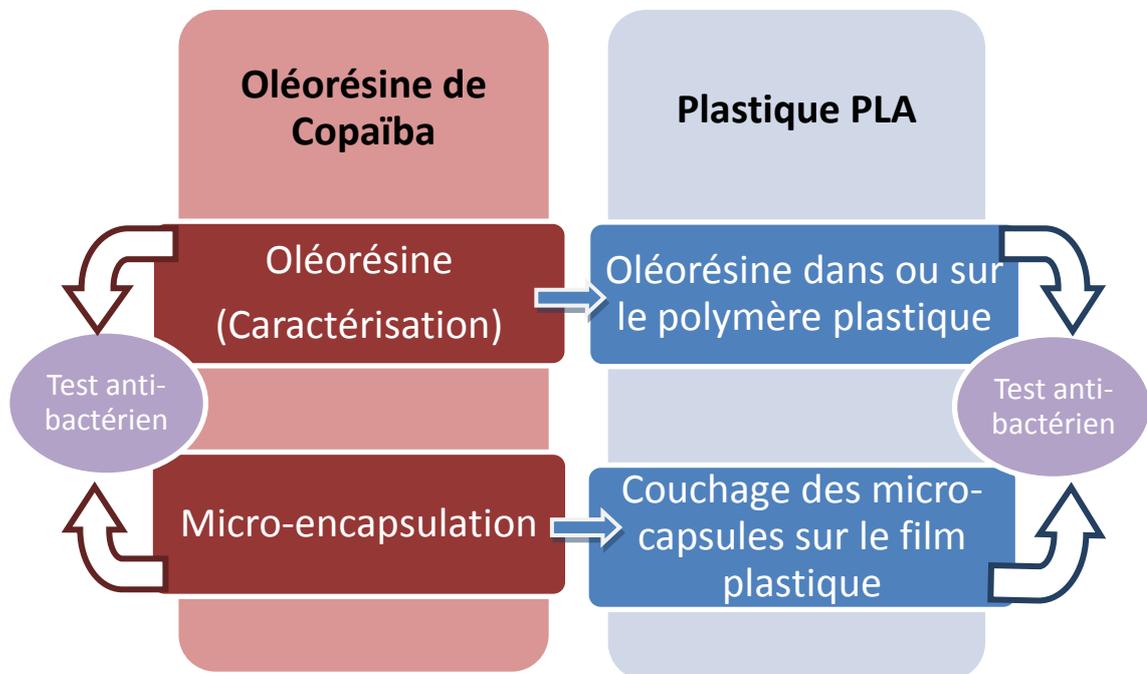
### 1. Démarche et objectif

L'objectif de ce travail est d'évaluer les propriétés antibactériennes d'une oléorésine de copaïba commercial provenant du Brésil. Cet extrait de copaïba est un mélange d'oléorésines provenant de différentes espèces de *Copaifera*. Après l'avoir caractérisé et avoir vérifié ses propriétés antibactériennes, une réflexion s'est tenue pour savoir si ses propriétés antibactériennes étaient toujours présentes si l'oléorésine est micro-encapsulée ou est incorporée dans un film plastique, ainsi que sur les différents moyens d'exploiter ses propriétés. J'ai donc réalisé différents tests antibactériens sur une bactérie gram positif *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) au laboratoire de recherche LGP2, après avoir micro-encapsulé et créé différents films plastiques contenant l'oléorésine de copaïba.

Le plastique utilisé est constitué d'acide polylactique (PLA), entièrement biodégradable et biosourcé. Ces polyesters sont des polymères d'acide lactique obtenus par fermentation, et ont récemment été introduits sur le marché pour leurs utilisations dans les produits où la biodégradabilité est recherchée. L'acide polylactique est fabriqué à partir de matières premières agricoles renouvelables (amidon, sucre) (27). L'utilisation de ce plastique devient de plus en plus répandue comme dans l'emballage alimentaire, dans la fabrication de sacs plastiques distribués dans les commerces, par certaines imprimantes 3D, ainsi que dans la fabrication de dispositifs médicaux et de très nombreux objets injectés, extrudés ou thermoformés. Les sutures résorbables par exemple en chirurgie, sont réalisées avec ces polymères biodégradables. Il est également utilisé dans les nouveaux stents biorésorbables qui se dissolvent progressivement dans l'organisme au bout de 2 ans et permettent de réduire la durée du traitement antiagrégant et les complications de thromboses tardives (28).

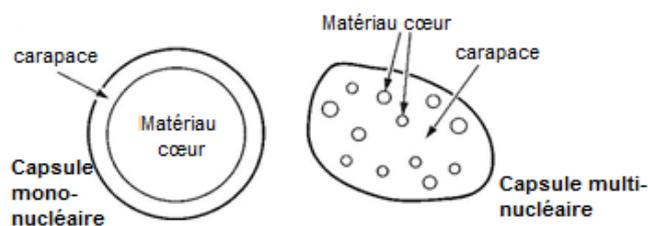
On peut imaginer incorporer à ce plastique un principe actif antibactérien sous forme libre ou micro-encapsulée, et l'utiliser pour emballer des dispositifs médicaux ou l'injecter dans l'organisme.

L'oléorésine a été dans une première expérience directement incorporée lors de la fabrication du film plastique. Puis dans une deuxième expérience, elle a été couchée sous forme libre ou micro-encapsulée, sur le film de polymère plastique. A chaque étape, la préservation des propriétés antibactériennes de l'oléorésine par le plastique a été vérifiée (Figure 9).



**Figure 9 :** Méthodologie

L'objectif de la micro-encapsulation est d'emprisonner des substances solides ou liquides (matériau cœur), dans une membrane (carapace) constituée d'un polymère ou d'un lipide. La fabrication des microcapsules permet d'isoler et de protéger le cœur contre les variations de température, les ultraviolets (UV), les solvants, l'oxydation, etc.... L'objectif est de libérer la substance cœur au moment souhaité, soit par rupture de la membrane (largage rapide) lors de l'augmentation de la température ou de l'application d'une pression, soit par diffusion lente et progressive à travers la membrane. Le diamètre des microcapsules, le type de microcapsule (mono ou multi nucléaire) (Figure 10), et la forme sphérique ou ovoïde peut varier suivant la technique de fabrication utilisée (29).



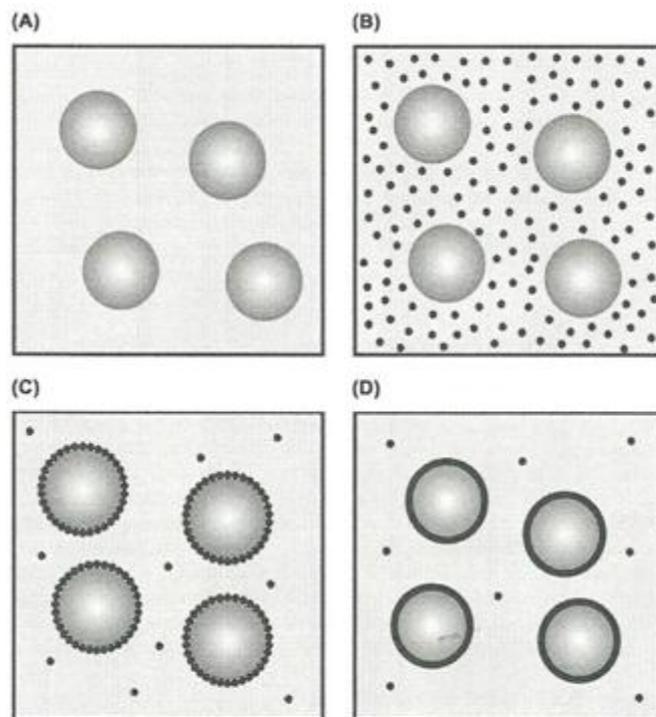
**Figure 10 :** Capsules mono ou multi nucléaire

## 2. Micro encapsulation

### 2.1 Micro-encapsulation par coacervation

La micro-encapsulation regroupe l'ensemble des procédés de fabrication de microcapsules. Un des procédés physico-chimiques de fabrication est la coacervation. Elle repose sur la maîtrise de la solubilité et les conditions de précipitation des matériaux carapaces. Cette technique consiste à disperser le produit à encapsuler dans une suspension colloïdale de la substance carapace, puis à modifier la solubilité de ce colloïde en faisant varier une ou plusieurs conditions expérimentales telles que le pH, la concentration, la température, l'activité...

Ces gouttelettes, devenues moins solubles, se rassemblent autour du principe actif pour créer la paroi de la capsule. Elles forment par coalescence un enrobage continu. Les capsules sont enfin obtenues après solidification de l'enveloppe (Figure 11). On parle de coacervation simple quand il y a coacervation avec un seul colloïde, et de coacervation complexe pour plusieurs colloïdes (30).



**Figure** Schematic representation of microencapsulation through coacervation: (A) dispersed liquid or solid drug particles, (B) induction of phase separation, (C) deposition of microdroplets at the surface, and (D) fusion into a membrane.

**Figure 11 :** Représentation schématique de la micro-encapsulation par coacervation (30)

## 2.2 Matériels utilisés

### - Sonificateur à ultrasons (Figure 12) :

Le sonificateur Sonifier (Branson) est un appareil qui émet des ultrasons (vibrations mécaniques) de très haute intensité. La sonde de l'appareil est introduite dans la solution et l'énergie produite va permettre une agitation intense de la solution. La puissance peut être réglée en pourcentage de la puissance maximale. Les ultrasons peuvent être émis par cycle ou en continu.

### - Disperseur – broyeur Dispermat (Figure 13) :

Cet appareil, utilisé comme broyeur à billes permet d'obtenir des particules solides ultra fines et de réaliser des émulsions dont les micelles ont une petite taille. La qualité de la dispersion est liée à la vitesse de rotation de la turbine et à la distance séparant la turbine du fond du réacteur.

On dispose d'un pot de 400 ml à double enveloppe, ce qui permet de contrôler la température par circulation d'eau thermostatée. Lors des expériences menées, l'élément de mélange est une hélice de 5 cm de diamètre placée à 2 cm du fond du pot.

Le moteur peut être réglé en puissance ou en vitesse de rotation. Cette dernière sera fixée entre 1000 et 10000 tr/min selon les besoins expérimentaux.



Figure 12 : Sonificateur



Figure 13 : Dispermat

### - Granulomètre Cilas 1190 (Figure 14) :

La taille des particules synthétisées est déterminée à l'aide d'un granulomètre Cilas. Il comprend une unité de mesure optique déterminant la taille des particules de base, et un ordinateur contrôlant la mesure et effectuant l'analyse.

L'appareil dispose d'un bac de 500 ml, muni d'une hélice pour une agitation mécanique. Il est également possible d'utiliser des ultrasons afin de casser les agglomérats. La concentration à laquelle se fait l'étude est très faible (environ 0,075%), ce qui correspond à une valeur d'obscurité optimale mesurée par l'appareil entre 13 et 17%.

Les résultats obtenus peuvent être traités en volume et en nombre. L'étude en nombre traite les particules à égale importance. L'étude en volume en revanche administre à chaque particule un coefficient égal à son volume.

L'appareil fournit également des renseignements comme le diamètre médian (tel que 50% des particules sont plus petites), au dixième percentile (tel que 10% des particules sont plus petites) et au quatre-vingt-dixième percentile (tel que 90% des particules sont plus petites).



**Figure 14** : Granulomètre Cilas

- Microscope optique

Les images des microcapsules ont été réalisées avec un microscope optique de marque Olympus surmonté d'une caméra numérique. Un logiciel, Optimas, permet ensuite l'acquisition et le traitement des images.

- Microscope électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Différents détecteurs permettent d'analyser ces particules et de reconstruire une image de la surface. L'appareil utilisé est de marque FEI.

### 2.3 Protocol expérimental

La coacervation complexe avec la gélatine a été utilisée pour micro-encapsuler l'oléorésine de copaïba.

Produits :

- Oléorésine de copaïba du Brésil
- Dodécyl sulfate de sodium (SDS) de chez SIGMA
- Gélatine faible poids moléculaire de chez SIGMA
- Carboxyméthylcellulose (CMC<sub>el</sub>) de moyenne viscosité de chez FLUKA
- Acide acétique
- Soude

La première étape consiste à mettre en émulsion l'oléorésine de copaïba dans l'eau. L'eau contient un surfactant le SDS, un tensioactif anionique, à une concentration dix fois supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC) pour assurer la stabilité de l'émulsion. La CMC est la concentration en tensioactif dans un milieu au-dessus de laquelle ce dernier forme des micelles spontanément. Pour cela 2,85 g de SDS sont dissous dans 200 ml d'eau. Ensuite 52 ml de la solution sont prélevés et mélangés avec 48 ml d'oléorésine pour garantir une émulsion du type huile dans eau. Le mélange est alors introduit dans le sonificateur 2 minutes à une puissance constante de 20%. Cette énergie apportée au système permet la formation de micelles de petites tailles (Figure 15).

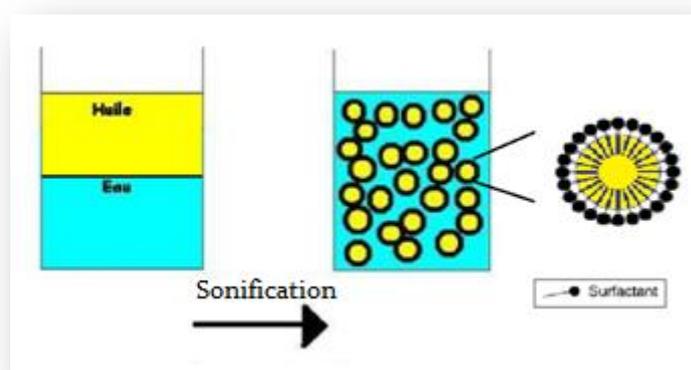
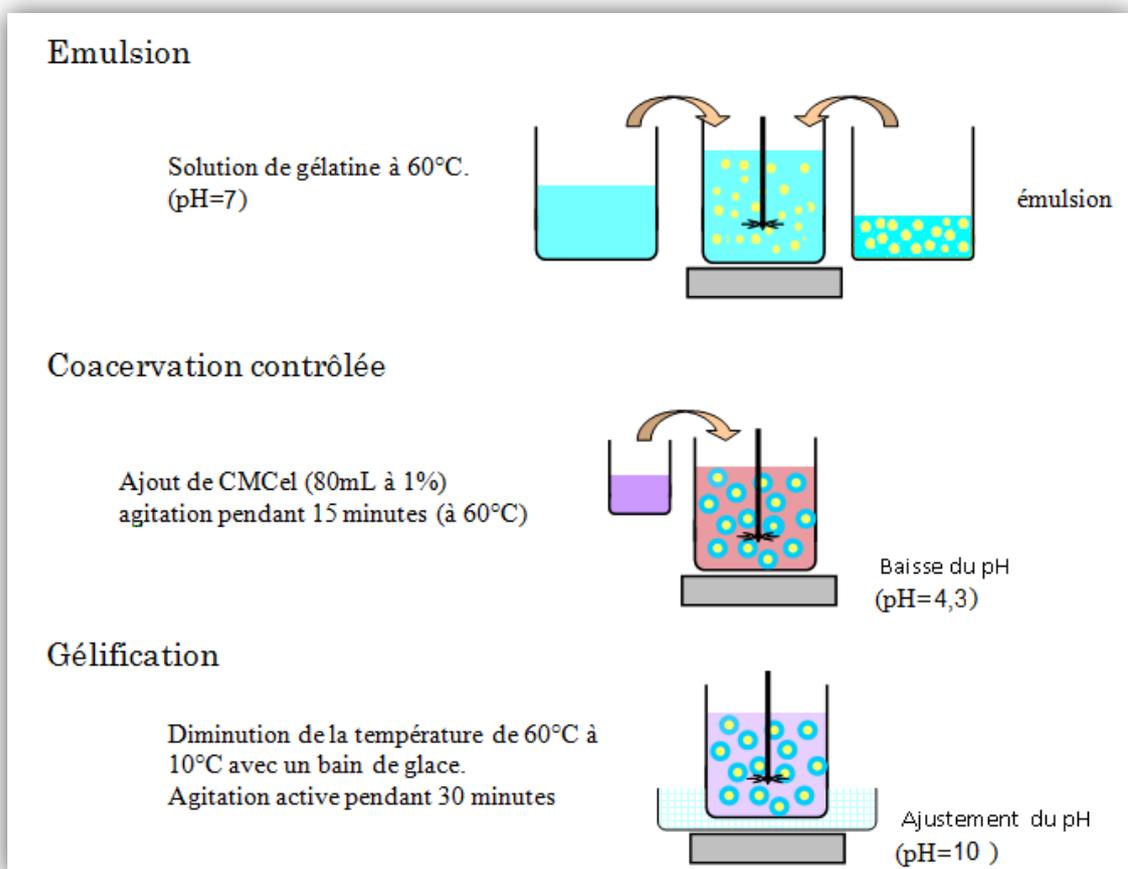


Figure 15 : Schéma d'une émulsion par sonification

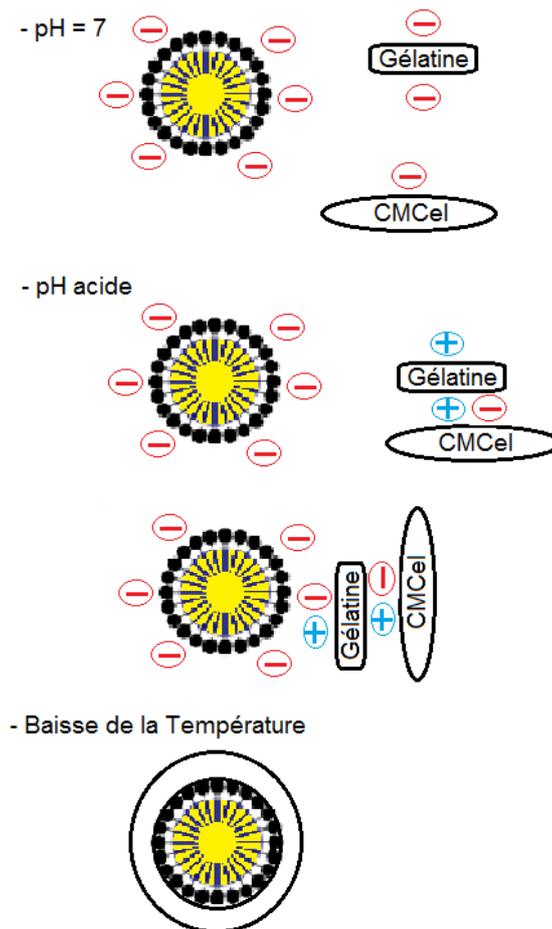
La deuxième étape (Figure 16), consiste à micro-encapsuler par la méthode de coacervation complexe avec la gélatine. Pour préparer la gélatine, 4 g de cette dernière sont mis à gonfler dans 150 ml d'eau. La gélatine est ensuite fondue au bain marie à 60°C à un

pH de 7 où elle est chargée négativement, en la mélangeant avec le disperseur-broyeur Dispermat à une vitesse de 1500 tours/min. Le produit à encapsuler peut alors être ajouté à hauteur de 80 g d'émulsion (soit environ 40g d'oléorésine). La température est maintenue à 60°C et le pH est maintenu à 7. Pour que la coacervation complexe commence, 80 ml d'une solution de CMCel (également chargé négativement) à 1% (0.8 g dans 80 ml d'eau) sont lentement ajoutés à la dispersion. L'agitation est maintenue pendant 15 minutes à 2000 tours/min. La préparation est ensuite acidifiée par l'ajout d'acide acétique à 10%. Le pH est baissé progressivement jusqu'à 5,2 en 20min, puis 15min après, jusqu'à 4,3 en 20min. La gélatine devient progressivement cationique et forme un complexe avec le CMCel qui reste chargé négativement. Ce complexe va ensuite s'enrober autour des micelles contenant le surfactant anionique par une interaction charge-charge avec la gélatine (Figure 17).

Un bain de glace est alors utilisé pour porter la température du milieu à 10°C. Le complexe de gélatine se solidifie autour des micelles pour former les capsules. Le mélange doit être actif pour éviter la gélification du milieu. Au bout de 30 minutes, on ajoute de la soude à 10% pour atteindre un pH de 10. L'expérience est arrêtée 10 minutes plus tard.



**Figure 16 :** Coacervation complexe avec la gélatine



**Figure 17 :** Interactions électrostatiques lors de la micro-encapsulation

On encapsule 80g d'émulsion soit 40 g d'oléorésine avec 4 g de gélatine et 0,8 g de CMCei, on a donc le rapport :  $\frac{\text{carapace}}{\text{cœur}} = \frac{4,8}{40} \times 100 = 12\%$ .

### 3. Incorporation de l'oléorésine dans ou sur le plastique

#### 3.1 Fabrication de film plastique contenant l'oléorésine

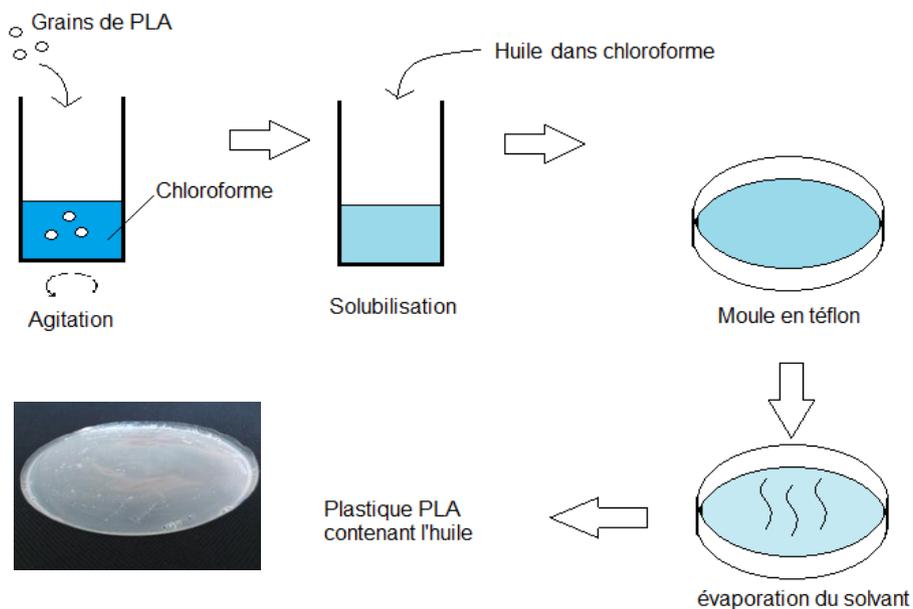
La fabrication de film plastique contenant plusieurs concentrations d'oléorésine a suivi le procédé de coulage évaporation.

Produits :

- Oléorésine de copaïba
- Grain de PLA (polymère)
- Chloroforme

Procédure (Figure 18) :

- Préparation de la solution du polymère:
  - Introduire 2,1 g de polymère dans 15 ml de chloroforme dans un flacon avec bouchon.
  - Fermer le flacon et agiter à température ambiante en utilisant un agitateur magnétique à 300 rpm jusqu'à solubilisation totale du polymère (environ 2 h).
- Préparation de la solution d'oléorésine de copaïba:
  - Mettre dans des flacons avec bouchon, différentes quantités d'oléorésine (1, 5, 10, 20, 30, 40 et 50% de la masse de PLA) puis compléter avec le chloroforme jusqu'à 10 ml.
  - Fermer le flacon et agiter à température ambiante en utilisant un agitateur magnétique à 300 rpm jusqu'à homogénéisation du mélange.
- Coulage - évaporation:
  - Ajouter la solution d'oléorésine à la solution de polymère contenue dans le flacon et utiliser 2 x 2,5 ml de chloroforme pour bien rincer le flacon utilisé pour l'oléorésine ; on obtient 30 ml de solution au total.
  - Verser le mélange sur le support en téflon et couvrir avec une boîte en carton trouée pour laisser évaporer et sécher le film à température ambiante sous hotte. Récupérer le film après évaporation complète du chloroforme (environ 24h après).



**Figure 18** : Fabrication de film plastique par coulage-évaporation

### 3.2 Enduction de l'oléorésine ou des microcapsules sur le film plastique

Produits :

- latex SBR (*styrene-butadiene rubber*) à 50% dans l'eau de chez DOW
- microcapsules obtenues comme décrit précédemment
- Plastique: Film de PLA obtenu par extrusion

Formulation de Couchage : Mélanger 15 parts sèches de Latex, qui occupe le rôle de liant, pour 100 parts sèches de capsules.

Déposer la formulation sur le plastique à enduire sur l'appareil Endupap. Utiliser une barre Meyer de 0,7 mm et coucher à une vitesse de 5 cm/s. Laisser sécher à température ambiante.

L'endupap (Figure 19) est un appareil permettant de procéder à des tests de couchage semi-industriel. Le dispositif de couchage est une barre Meyer qui permet une enduction régulière car la vitesse de défilement du papier est contrôlée (maximum jusqu'à 10 m/min).

La pression entre la barre et le papier est réglée à l'aide de contrepoids. Le plastique à enduire se trouve sous forme de feuilles. De plus, l'endupap dispose d'un poste de séchage infrarouge qui ne sera pas utilisé dans le cas présent.



Figure 19 : Endupap

#### 4. Tests antibactériens

Tous les tests antibactériens sont effectués sous hotte à flux laminaire vertical. Une hotte à flux laminaire est conçue pour éviter la contamination microbienne de la manipulation.

Cette hotte génère un air purifié en particules, unidirectionnel et homogène. Le flux d'air est soufflé verticalement à travers un filtre HEPA sur le plan de manipulation. Le plan de travail aspire le débit d'air soufflé du filtre avec un débit supplémentaire provenant de l'ouverture frontale de manipulation. Ce débit d'air frontal aspiré par la hotte permet de protéger le manipulateur en évitant toute sortie de danger microbologique. Enfin l'air est rejeté au travers d'un autre filtre HEPA protégeant l'environnement de toute éventuelle pollution (Figure 20) (31).

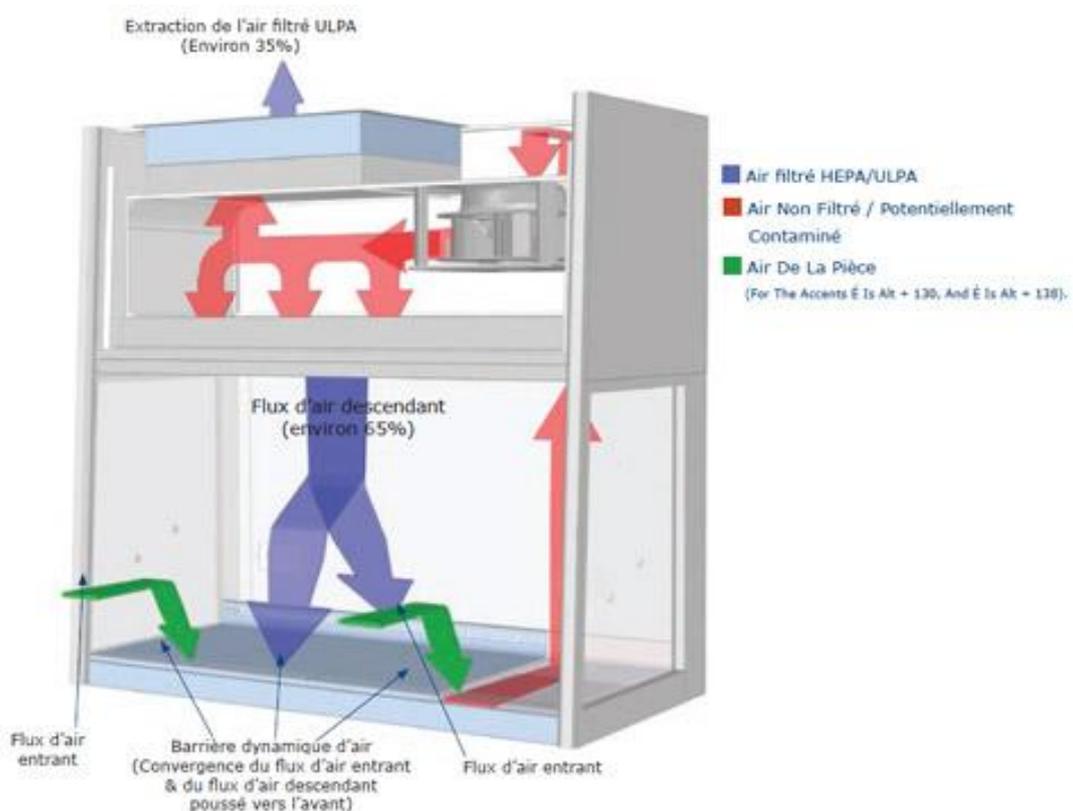


Figure 20 : Schéma d'une hotte à flux laminaire vertical (31)

#### 4.1 Test antibactérien sur gélose selon la norme Afnor NF EN 1104

Produits :

- Milieu de culture : Agar de chez Roth
- Bactérie *Bacillus subtilis* à une concentration de  $10^7$  CFU/ml
- échantillons à tester
- disques de pénicilline (témoin positif)
- disques de papier filtre

Stériliser tout le matériel nécessaire à 121°C pendant 15 min. Stériliser l'agar et laisser refroidir jusqu'à une température d'environ 60°C.

Sous hotte à flux laminaire, ajouter 1 ml de la suspension de bactérie pour 1 L de milieu de culture et agiter. Verser 15 ml de gélose dans chaque boîte de pétri. Laisser refroidir jusqu'à ce qu'elle devient semi-solide pour y déposer les échantillons à tester ou les disques de pénicilline pour le témoin positif. Prévoir un témoin négatif contenant la bactérie seule dans l'agar et un témoin contenant l'agar avant sa contamination par la bactérie.

Les échantillons sont déposés en nombre de trois par boîte en triangle espacé (Figure 21). Les produits liquides à tester sont déposés à l'aide d'une micropipette directement sur des disques de papier filtre préalablement disposés sur la gélose.

Refermer les boîtes de pétri et les placer couvercle en bas 2h au réfrigérateur. Les incubent ensuite à l'étuve à 30°C pendant 3 jours.

Chaque boîte est répétée une ou deux fois pour apprécier la répétabilité de la méthode.

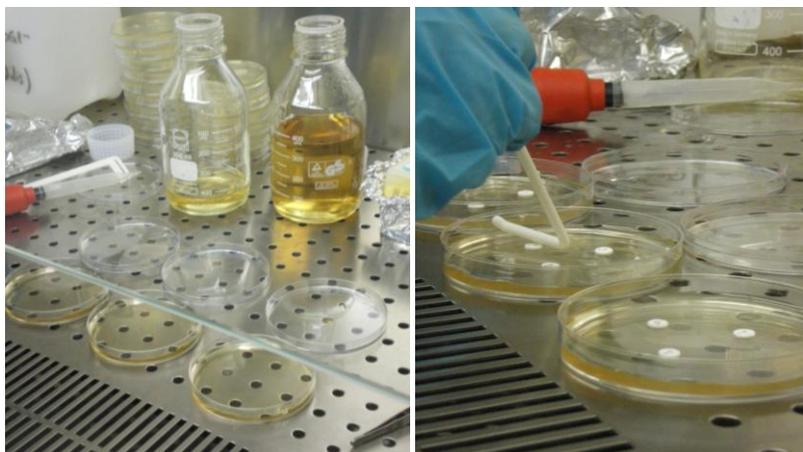


Figure 21 : Test antibactérien et dépôt des échantillons sur gélose

## 4.2 Test antibactérien en milieu liquide

Produits :

- Milieu de culture : bouillon standard nutritif de chez Roth
- Bactérie *Bacillus subtilis* à une concentration de  $10^7$  CFU/ml
- échantillons de PLA à tester

Stériliser tout le matériel nécessaire ainsi que le milieu de culture à  $121^\circ\text{C}$  pendant 15 min.

Sous hotte à flux laminaire, ajouter 100  $\mu\text{l}$  de la suspension de bactéries pour 1 L de milieu de culture. La concentration de la bactérie est donc de  $10^3$  CFU/ml. Bien mélanger.

Chaque échantillon de PLA à tester est placé dans un pilulier de 15mm de diamètre préalablement stérilisé, sur lequel est ajouté 1 ml de la suspension de bactérie dans le milieu de culture. Prévoir un flacon contenant la suspension de bactérie seule dans le milieu de culture qui sera la référence (ou témoin négatif) et un témoin contenant le milieu de culture non contaminé par la bactérie. Fermer les piluliers.

Incuber à  $30^\circ\text{C}$  avec une agitation de 90 rpm pendant 24H.

Prélever 300  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon, ajouter 2,7 ml d'eau distillée et analyser la densité optique (DO) à 540nm. La densité optique est mesurée par un spectrophotomètre, un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution homogène à une longueur d'onde donnée ou sur une région spectrale donnée. L'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution, à condition de se placer à la longueur d'onde à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux.

La croissance relative (CR) est ensuite calculée par l'équation  $CR = \frac{DO \text{ échantillon}}{DO \text{ référence}}$  (32).

Chaque flacon est répété une fois pour apprécier la répétabilité de la méthode.

## Partie 3 : Résultats

### 1. Caractérisation de l'oléorésine de copaïba

La composition de l'oléorésine de copaïba commerciale a été déterminée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats montrent que la molécule majoritaire est un  **$\beta$ -Caryophyllène** (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>), et que les 5 autres molécules identifiées sont également des sesquiterpènes : **Copaene**,  **$\beta$ -Gurjunene**,  **$\beta$ -Cubebene**,  **$\beta$ -Bisabolene**, et  **$\delta$ -Cadinene** (Figure 22).

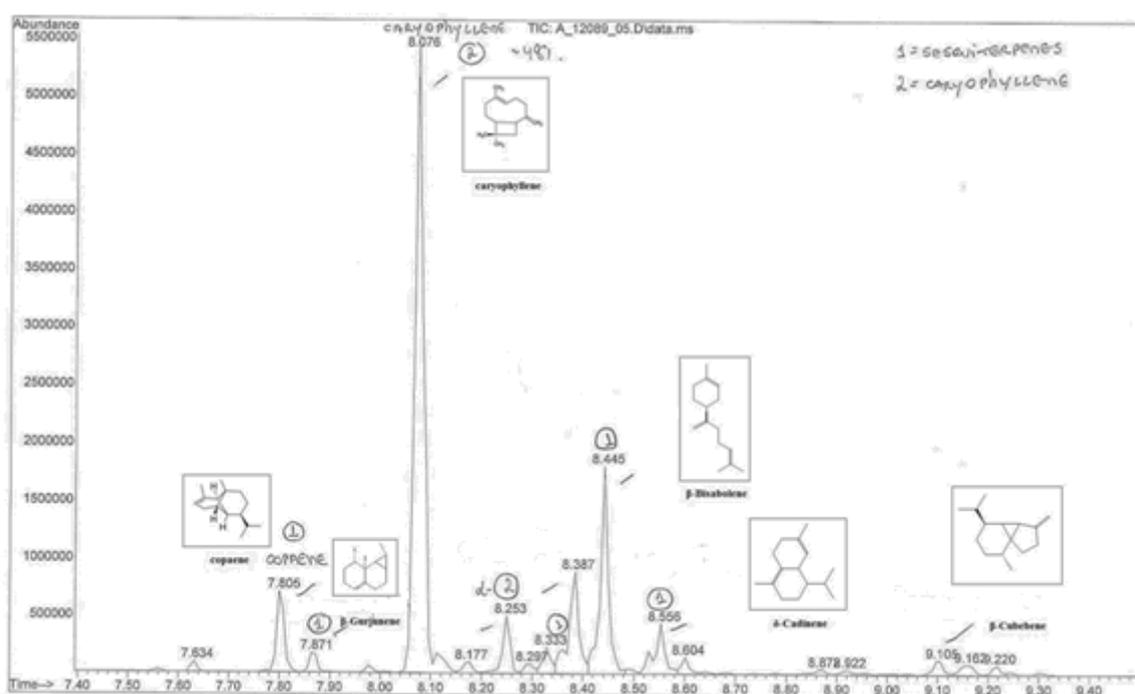


Figure 22 : Résultat de l'analyse de l'oléorésine de copaïba par GC-MS

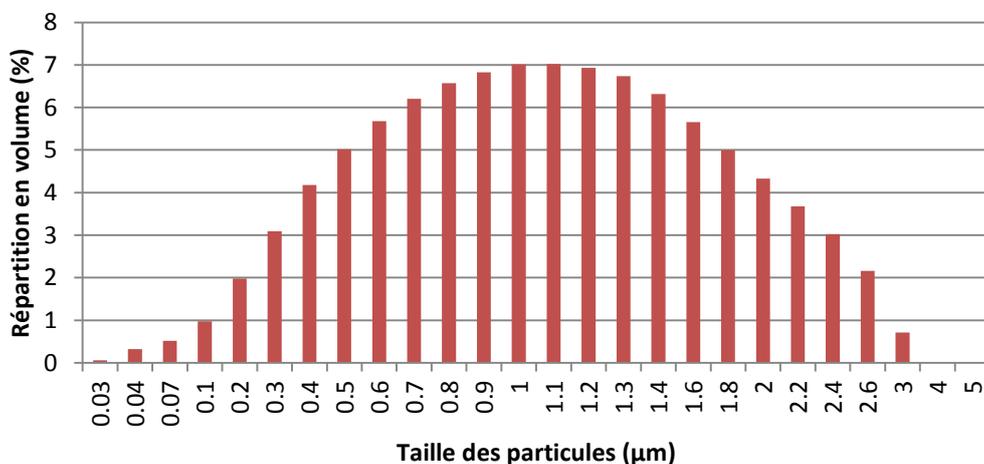
La masse volumique  $\rho^*$  de l'oléorésine a ensuite été déterminée expérimentalement et donne le résultat suivant :  $\rho^* = 0,941$  g/ml.

### 2. Micro encapsulation et imprégnation

#### 2.1 Caractérisation des micelles

Après avoir optimisé la méthode permettant d'obtenir une émulsion d'oléorésine de copaïba dans l'eau relativement stable, la taille des micelles a été déterminée par granulométrie. Cette étude permet d'obtenir la répartition des particules en volume (Figure

23). Les résultats de la répartition en taille des micelles montrent une distribution unimodale d'un diamètre allant de 0,04 à 3 $\mu\text{m}$  avec un pic de 7% à 1 $\mu\text{m}$ . De plus, l'appareil indique un diamètre médian de 0,87 $\mu\text{m}$ , un diamètre au dixième percentile de 0,23 $\mu\text{m}$  et un diamètre au quatre-vingt-dixième percentile de 2,06 $\mu\text{m}$ .



**Figure 23 :** Taille des particules de l'émulsion de copaïba

La connaissance de la répartition en taille de l'émulsion nous permettra d'en faire la comparaison avec la répartition en taille des microcapsules.

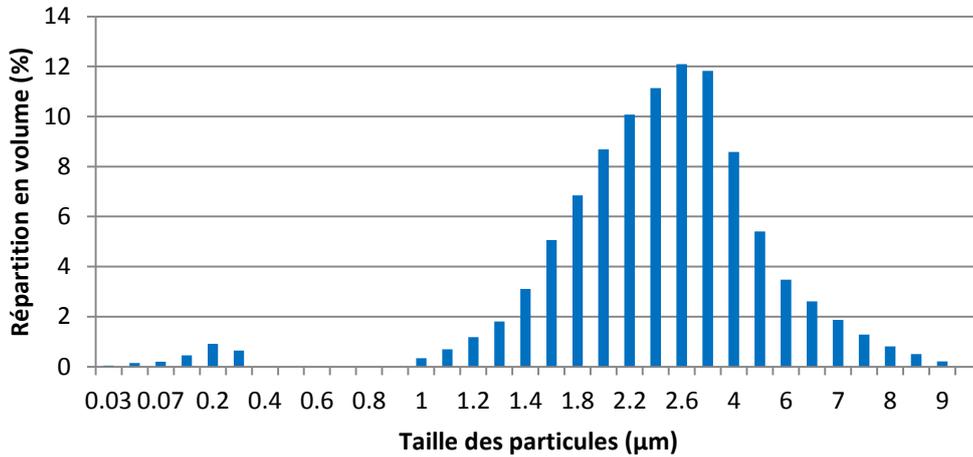
## 2.2 Caractérisation des microcapsules

Les microcapsules synthétisées par la méthode de coacervation complexe avec la gélatine sont observées avec un microscope optique (Figure 25) et par MEB (Figures 26). Cette observation montre qu'il y a bien des microcapsules sphériques. Au microscope optique, la taille des particules est à la limite de la résolution de l'appareil, mais elles sont tout de même visibles.

L'étude granulométrique de la répartition en volume de la taille des microcapsules (Figure 24) montre que les microcapsules ont un diamètre allant de 1 à 9 $\mu\text{m}$  avec un pic de 12% à 2,6 $\mu\text{m}$ . Le diamètre médian donné par l'appareil est de 2,96 $\mu\text{m}$ , le diamètre au dixième percentile est de 1,44 $\mu\text{m}$  et le diamètre au quatre-vingt-dixième percentile est de 5,30 $\mu\text{m}$ .

Le résultat montre également une petite quantité de particules ayant un diamètre aux alentours de 0,2 $\mu\text{m}$ . Ces particules peuvent être des micelles non encapsulées restées dans le milieu ou des débris formés par l'agglomération de gélatine et de CMCel.

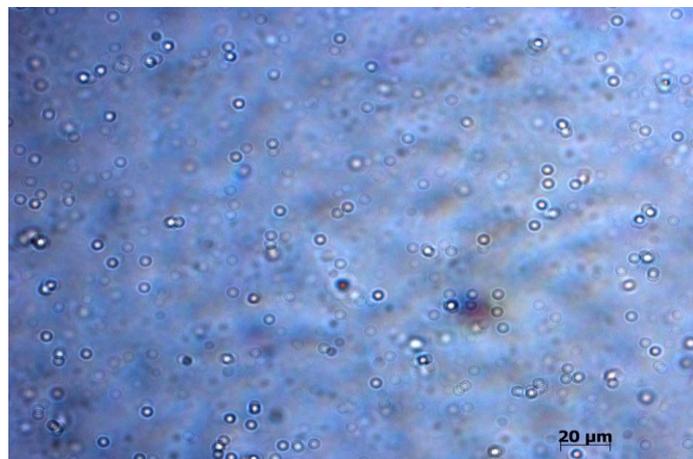
La taille moyenne des microcapsules est largement supérieure à la taille des micelles avant encapsulation, ce qui nous laisse penser que les microcapsules formées sont multi-nucléaires, ou bien il se serait produit une agglomération de microcapsules mononucléaires. Cependant rien ne nous empêche de penser que notre solution contient les 2 formes de microcapsules.



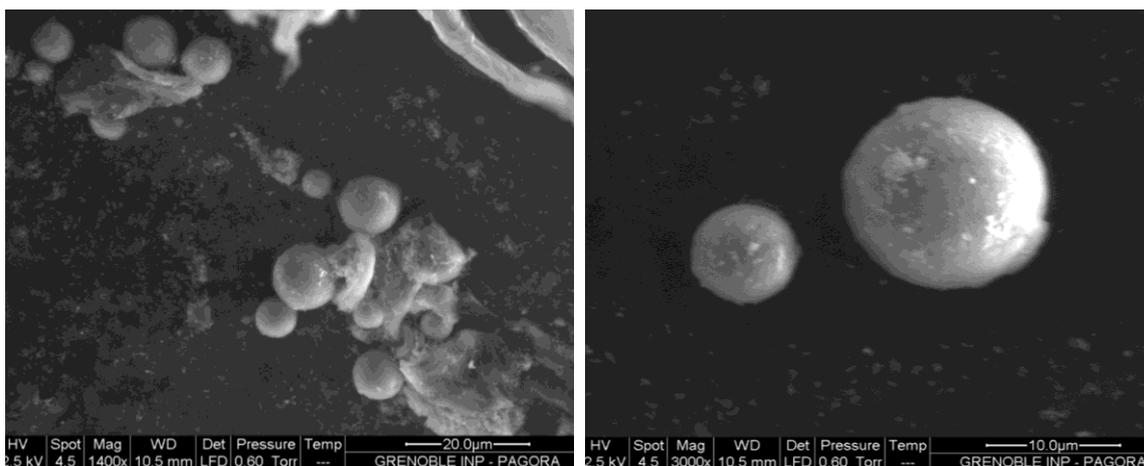
**Figure 24 :** Taille des particules des microcapsules de copaïba

La coacervation complexe a permis d'obtenir des microcapsules à partir d'une émulsion d'oléorésine de copaïba en utilisant des matériaux écologiques renouvelables. Cependant la quantité de microcapsules formée n'a pas pu être déterminée.

Les microcapsules synthétisées par la méthode de coacervation complexe avec la gélatine ont été observées par un microscope optique (Figure 25) et par MEB (Figure 26).



**Figure 25 :** Observation des microcapsules par microscopie optique



**Figure 26** : Observation des microcapsules par MEB

### 2.3 Caractérisation des films plastiques

Les différents films PLA ainsi obtenus après fabrication ou couchage sont les suivants :

- Film de PLA contenant l'oléorésine de copaïba lors de sa fabrication à différent pourcentage théorique en masse d'oléorésine (1, 5, 10, 20, 30, 40 et 50%)
- Film de PLA couché d'oléorésine de copaïba
- Film de PLA couché de microcapsules

La quantité d'oléorésine de copaïba ou de microcapsules présente dans chaque film plastique a été déterminée avec le suivi du poids de chaque film, avant et après l'ajout de l'oléorésine ou des microcapsules (Tableau 4).

Méthode		Quantité d'oléorésine ou de microcapsule en% du poids de l'emballage
Film de PLA contenant l'oléorésine de copaïba lors de sa fabrication	Pourcentage en masse théorique : à 1%	Non significatif
	à 5%	Non significatif
	à 10%	9%
	à 20%	12%
	à 30%	18,8%
	à 40%	23,5%
	à 50%	29%
Film de PLA couché d'oléorésine de copaïba		13,6%
Film de PLA couché de microcapsules		4,2%

**Tableau 4** : Quantité théorique et réelle d'oléorésine ou de microcapsules dans les films PLA

Le plastique contenant l'oléorésine est plus intéressant à utiliser que le plastique couché d'oléorésine car la quantité d'oléorésine incorporée est plus facile à contrôler. De plus, le plastique couché d'oléorésine était collant au toucher et l'odeur de l'oléorésine était bien marquée, contrairement au plastique contenant l'oléorésine.

### 3. Propriétés antibactériennes

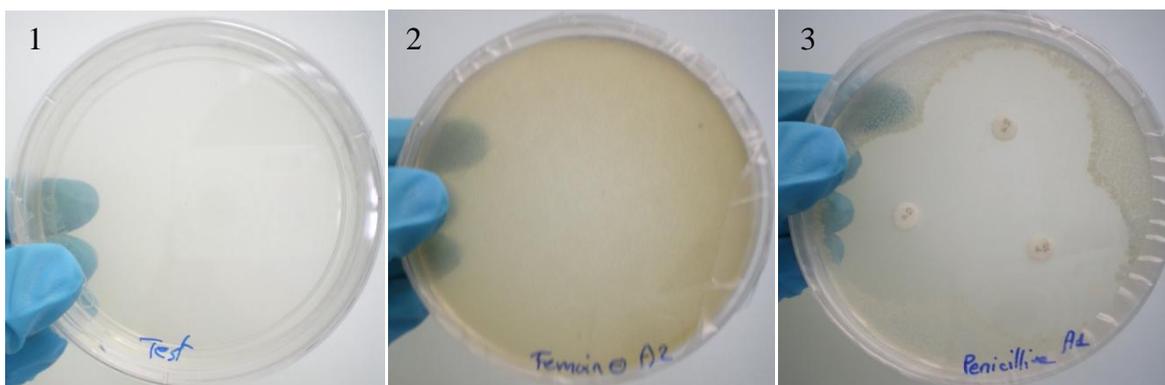
#### 3.1 Test antibactérien sur gélose

Les résultats des différents tests antibactériens sur gélose sont donnés dans le tableau suivant (Tableau 5). Un + signifie qu'une zone d'inhibition de la prolifération bactérienne significative est observable autour de l'échantillon, un - signifie qu'il n'y a pas de zone d'inhibition observable.

Oléorésine de copaïba et microcapsules	Goutte copaïba	Copaïba sur disque	Vapeur de copaïba	Microcapsule sur disque
	+	+	-	+
Film PLA contenant l'oléorésine	PLA	PLA 1% copaïba	PLA 5% copaïba	PLA 10% copaïba
	-	-	-	-
	PLA 20% copaïba	PLA 30% copaïba	PLA 40% copaïba	PLA 50% copaïba
	-	-	-	-
Film PLA couché d'oléorésine ou de microcapsules	PLA couché de copaïba	PLA couché de microcapsule		
	+	+		

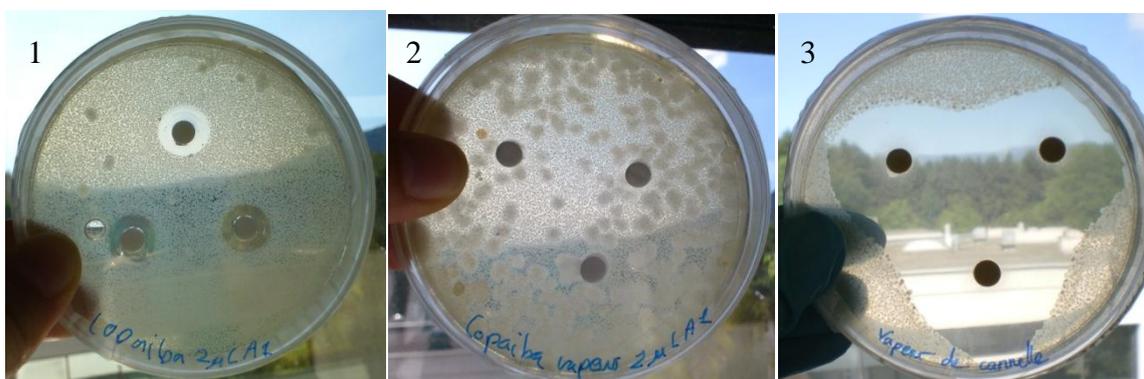
**Tableau 5** : Résultats des différents tests antibactériens sur gélose

Avant d'interpréter ces tests, il a été vérifié à chaque fois que les témoins sont conformes. La gélose non contaminée ne doit pas contenir de prolifération bactérienne, contrairement à la gélose contaminée où l'on observe une prolifération sur toute la boîte et les boîtes contenant les disques de pénicilline donnent des zones d'inhibition autour de chaque disque (Figure 27).



**Figure 27 :** Les témoins 1- Gélose non contaminée 2- Gélose contaminée 3- Disques de pénicilline

L'oléorésine de copaïba possède bien une activité antibactérienne sur *B. Subtilis* puisqu'une zone d'inhibition de la croissance de la bactérie apparaît autour de l'échantillon. Par contre l'oléorésine n'exerce pas d'inhibition bactérienne par ces vapeurs. Lorsque l'oléorésine est déposée sur le disque en coton sur le couvercle tenu en bas de la boîte de pétri et que le milieu de culture contenant la bactérie est tenu en haut, il n'y a pas d'inhibition de la prolifération bactérienne, contrairement à la vapeur de l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum* sp.) (Figure 28).



**Figure 28 :** Tests antibactériens 1- Oléorésine de copaïba 2- Vapeurs de copaïba 3- Vapeurs de cannelle

Pour quantifier l'effet antibactérien de l'oléorésine de copaïba, différentes quantités ont été testées, ce qui théoriquement permet de tracer la courbe du diamètre d'inhibition en fonction de la quantité. Pour 2, 4, 6, 8 et 10 $\mu$ L de copaïba, le diamètre d'inhibition a été le même soit  $1,06 \pm 0,04$  cm. Il faut donc prendre une gamme plus espacée pour apprécier une différence et pouvoir quantifier l'effet antibactérien et le comparer à d'autres molécules.

Les propriétés antibactériennes de l'oléorésine de copaïba sont conservées lorsque l'oléorésine est micro-encapsulée, puisqu'il y a bien une zone d'inhibition de la prolifération bactérienne autour des échantillons de microcapsules.

Les résultats montrent une activité antibactérienne des films plastiques couchés d'oléorésine ou de microcapsules (Figure 29). Cependant il n'y a pas de zone d'inhibition de la prolifération bactérienne autour de tous les échantillons de film de PLA contenant l'oléorésine de copaïba lors de leur fabrication. Cette absence d'inhibition peut être causée par une mauvaise diffusion de l'oléorésine de copaïba du film plastique vers la gélose. Il faut donc tester l'activité antibactérienne de ces films de PLA par une méthode plus adaptée. Une méthode permettant de suivre la prolifération bactérienne dans un milieu liquide a donc été mise en place.

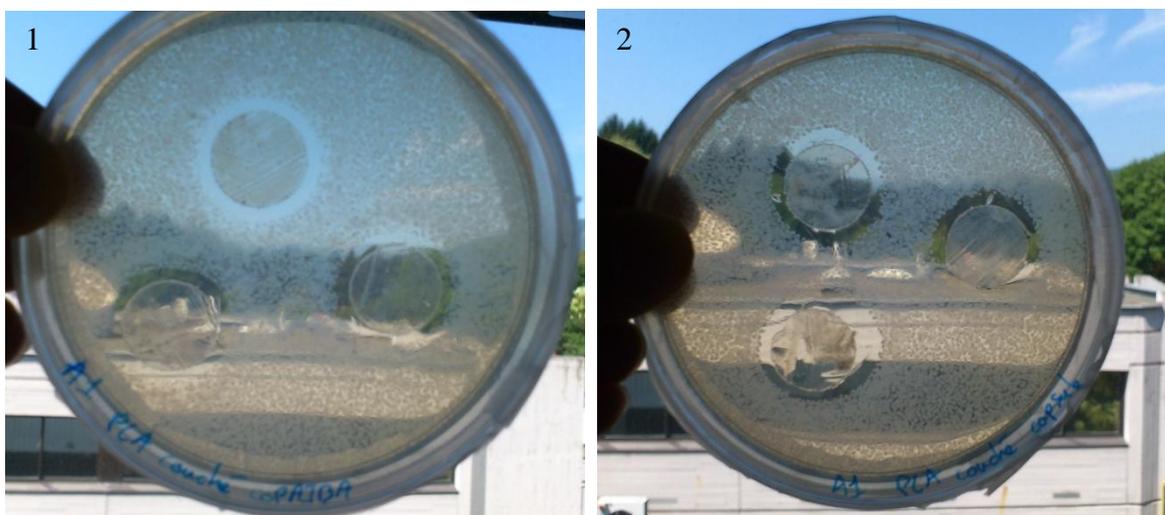
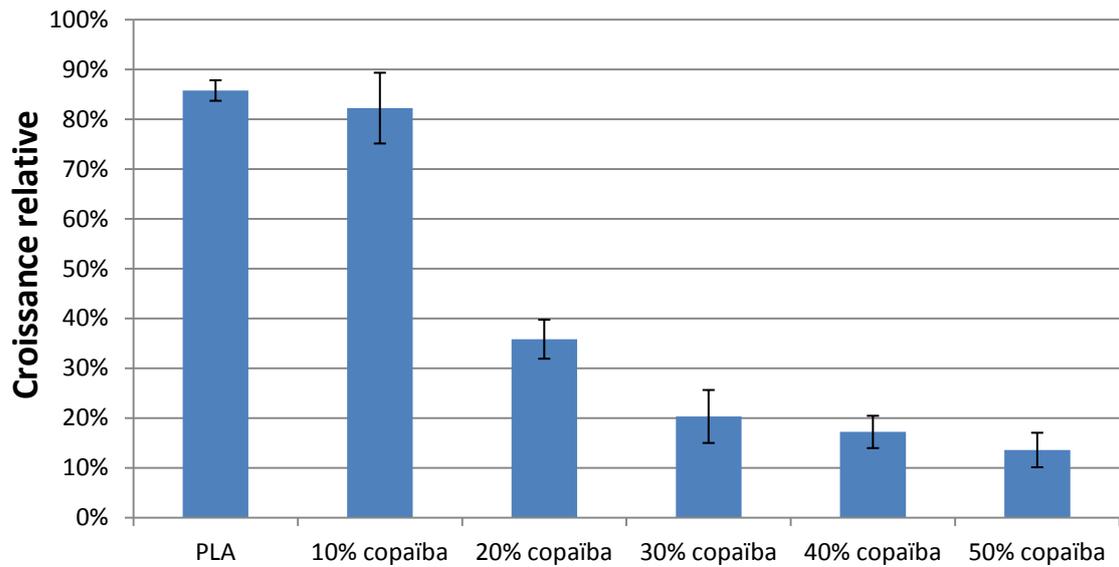


Figure 29 : Tests antibactériens 1- films plastiques couchés d'oléorésine ou 2- de microcapsules

### 3.2 Test antibactérien dans un milieu liquide

Les échantillons de plastique PLA ont été mis en contact avec un milieu liquide contenant les bactéries, puis la CR a été calculée pour chaque échantillon en fonction de leur DO. Les résultats obtenus sont représentés par le graphique suivant (Figure 30).



**Figure 30** : Propriété antibactérienne par contact

L'effet antibactérien commence à être observé à partir de l'échantillon de plastique contenant 20% de copaiba théorique. Plus le pourcentage théorique en oléorésine de copaiba est important dans le plastique PLA, plus la croissance relative de la bactérie est faible. Les films plastiques contenant la copaiba ont bien une activité antibactérienne sur la bactérie *Bacillus subtilis* en milieu liquide. Ils inhibent la croissance bactérienne de 80% ou plus à partir d'une teneur théorique en oléorésine de 30% (teneur réelle d'environ 19%).

## Partie 4 : Discussion et perspectives d'utilisation

### 1. Analyse avec les données de la littérature

#### 1.1 Composition chimique

L'analyse de la composition chimique de l'échantillon d'oléorésine de copaïba commercial par GC-MS, a permis d'identifier la molécule majoritaire, un  $\beta$ -caryophyllène, qui a les propriétés suivantes : anti-inflammatoire, insecticide, anesthésique local, et antimicrobien (15). Cette substance est présente à la plus forte proportion (48%) comme dans les résultats de nombreuses études sur la composition chimique de l'oléorésine de copaïba. Tous les composés identifiés dans l'oléorésine sont des sesquiterpènes, et les molécules trouvées sont en accord avec le résultat des études antérieures (12–14,33). Les sesquiterpènes sont les composés essentiels de l'oléorésine et sont en très grande proportion. Généralement les mêmes composés majoritaires sont retrouvés même s'ils proviennent de différentes espèces de *Copaifera*, avec des variations quantitativement.

Dans cette étude il n'a pas été identifié de diterpène, alors que dans certaines études ils sont présents à des taux allant de 14,5% à 23,5% (14,33). Cependant une étude antérieure n'a identifié que des sesquiterpènes et pas de diterpènes (13). Les résultats montrent également que les 5 autres molécules identifiées sont:  $\beta$ -Bisabolène, Copaéne,  $\delta$ -Cadinéne ainsi que dans des concentrations plus faibles  $\beta$ -Gurjunéne et  $\beta$ -Cubebéne. Les molécules  $\beta$ -Bisabolène, Copaéne et  $\delta$ -Cadinéne font partie des molécules présentes à des taux les plus élevés après le  $\beta$ -caryophyllène, dans les études antérieures, avec d'autres molécules comme  $\alpha$ -*trans*-bergamoténe et  $\alpha$ -humuléne qui ne sont pas retrouvées dans cette étude (12–14,33).  $\beta$ -Gurjunéne et  $\beta$ -Cubebéne sont également identifiés dans d'autres études mais à des concentrations plus faibles (12,13,33).

#### 1.2 Propriétés antibactériennes

D'autres études montrent bien que l'oléorésine de copaïba présente des propriétés antibactériennes sur la bactérie gram positif *B. subtilis* ainsi que sur d'autres bactéries gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* Methicillin-resistant, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* et *Paenibacillus larvae*. L'oléorésine est cependant inactive sur les bactéries gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (34–37).

La concentration minimale inhibitrice (CMI), qui est la plus petite concentration de produit suffisante pour inhiber, *in vitro*, la croissance d'une souche de bactéries, dépend de la composition de l'oléorésine de copaïba et donc de l'espèce de *Copaifera* dont elle est extraite. Cependant il existe également des hétérogénéités dans la composition chimique à l'intérieur d'une même espèce.

L'activité antimicrobienne de différents extraits d'oléorésine de copaïba, obtenue à partir de *Copaifera martii*, *Copaifera officinalis*, et *Copaifera reticulata*, a été testée sur des bactéries gram-positif, gram-négatif, des levures et des dermatophytes. Les oléorésines étaient actifs contre les bactéries gram-positif (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus* résistant à la méthicilline, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, et *Enterococcus faecalis*) avec des concentrations minimales inhibitrices allant de 31,3 à 62,5 µg/ml (avec un classement de l'activité suivant CMI ≤ 100 µg/ml, bonne; 100 ≤ CMI ≤ 500 µg/ml, modérée; 500 ≤ CMI ≤ 1,000 µg/ml, faible; CMI ≥ 1,000 µg/ml, inactif) (Tableau 6). Les oléorésines ont montré une activité bactéricide, c'est-à-dire une diminution de la viabilité des bactéries gram-positif dans les 3 heures. A l'aide d'un microscope électronique, le balayage de *S. aureus* traitée avec de l'oléorésine de *C. martii* a révélé une lyse des bactéries, ce qui provoque des agglomérats cellulaires. La microscopie électronique à transmission a révélé une perturbation et des dommages de la paroi cellulaire, ce qui entraîne la libération de composés cytoplasmiques, des altérations de la morphologie et une diminution du volume de la cellule. L'oléorésine de copaïba peut donc affecter la paroi cellulaire (36).

TABLE  
Antimicrobial activity (minimal inhibitory concentration/minimal bactericidal concentration in µg/ml) of copaiba oil obtained from several species of *Copaifera* genus

Oils/Ref antibiotic	<i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Copaifera reticulata</i> (Pará)	> 1,000/nt	1,000/1,000	250/250	1,000/> 1,000	250/1,000
<i>Copaifera reticulata</i> (Acre)	62.5/62.5	125/250	31.25/31.25	62.5/62.5	62.5/62.5
<i>Copaifera martii</i>	62.5/62.5	62.5/125	15.62/31.25	62.5/62.5	62.5/62.5
<i>Copaifera cearensis</i>	250/1,000	125/500	62.5/125	250/500	500/1,000
<i>Copaifera paupera</i>	250/1,000	250/500	62.5/62.5	1,000/1,000	62.5/500
<i>Copaifera langsdorfii</i>	> 1,000/nt	> 1,000/nt	62.5/62.5	> 1,000/nt	> 1,000/nd
<i>Copaifera officinalis</i>	62.5/62.5	125/250	31.25/31.25	31.25/31.25	31.25/62.5
<i>Copaifera multijuga</i>	500/1,000	125/250	125/125	1000/>1000	250/500
<i>Copaifera lucens</i>	125/500	> 1,000/nt	125/250	250/1000	1,000/1,000
Penicillin	0.075/nt	nt	nt	10.0/nt	0.15
Vancomycin	nt	nt	0.78/nt	nt	nt
Oxacyline	nt	> 500/nt	nt	nt	nt

nt: not tested.

**Tableau 6 :** L'activité antimicrobienne (concentration minimale inhibitrice / concentration minimale bactéricide en µg/ml) d'oléorésine de copaïba obtenue à partir de plusieurs espèces de *Copaifera* (36)

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des baumes de copaïba (*Copaifera spp*) a été réalisée par des tests antimicrobiens avec 11 oléorésines de différents arbres recueillies au Brésil dans les états d'Amazonas et Pará. L'activité a été testée contre les bactéries gram-positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et les bactéries gram-négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Les cultures bactériennes ont été cultivées dans de la gélose nutritive, et l'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode de microdilution. Le résultat des tests antimicrobiens (Tableau 7) des oléorésines de *Copaifera spp* donne lieu à différents niveaux d'inhibition contre les bactéries à gram positif. Les extraits 2, 5 et 10 ont montré une activité significative contre *B. subtilis* et *S. aureus*, avec des valeurs de CMI à 5 µg/ml, comparable au cloramphénicol (antibiotique) utilisé comme témoin positif. Les autres extraits présentent des variations de l'inhibition, avec des valeurs de CMI allant de 300 à 550 µg/ml (*B. subtilis*) et de 125 à 550 µg/ml (*S. aureus*). Cependant certains extraits (1 et 11 sur *B. subtilis* et 9 et 11 sur *S. aureus*), n'ont présenté aucune inhibition significative. Il existe différents niveaux d'activité antibactérienne, dans une même espèce, ce qui peut s'expliquer par les compositions chimiques différentes des oléorésines en fonction non seulement de l'espèce mais également de la période de la collecte de l'âge de l'arbre ainsi que d'autres facteurs qui influent sur la composition chimique.

Ces résultats confirment le potentiel antimicrobien réel des oléorésines de Copaïba utilisées comme remède traditionnel, et les différences entre les niveaux d'inhibition confirment l'importance de la normalisation (35).

Copaiba oils	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
1	-	550	-	-
2	5	5	-	-
3	350	150	-	-
4	300	150	-	-
5	5	5	-	-
6	450	125	-	-
7	550	225	-	-
8	550	250	-	-
9	550	-	-	-
10	5	5	-	-
11	-	-	-	-
Control <sup>a</sup>	15.6	7.8	1000	15.6

<sup>a</sup>Cloranphenicol

**Tableau 7 :** Concentration minimale inhibitrice (CMI, µg/ml) de 11 oléorésines de Copaïba (35).

## 2. Activités pharmacologiques des différents composés

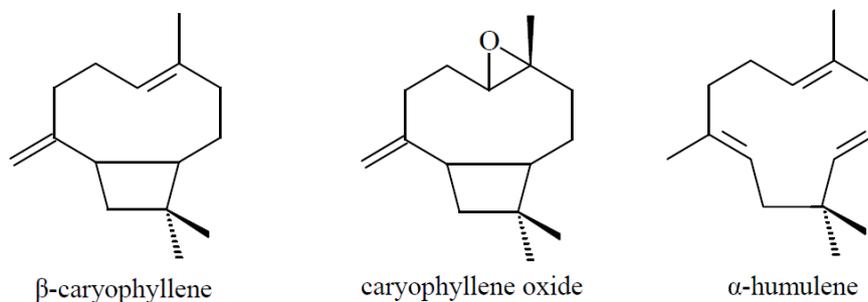
### 2.1 Activités pharmacologiques des principaux sesquiterpènes

De nombreuses études ont montré que les sesquiterpènes sont les principales substances présentes dans l'oléorésine de copaïba, comme vu précédemment (12–15).

Parfois, ces molécules représentent plus de 90% de leur composition. Puisqu'ils sont très largement majoritaires, de nombreuses activités pharmacologiques sont attribuées au principal sesquiterpène contenu dans l'oléorésine. Cependant, l'effet pharmacologique de l'oléorésine ne peut pas être attribué à une seule molécule, du fait que les constituants présents dans l'oléorésine peuvent interagir en synergie dans la promotion de l'activité observée.

Certains de ces sesquiterpènes sont des composants majeurs de l'oléorésine et d'autres, bien que présents dans des proportions plus faibles, sont souvent détectés. Des études sur les activités pharmacologiques de certains principaux sesquiterpènes présents dans l'oléorésine de copaïba sont décrites ci-dessous.

- **$\beta$ -caryophyllène, l'oxyde de  $\beta$ -caryophyllène, et  $\alpha$ -humulène (Figure 31)**



**Figure 31** : Structure moléculaire des  $\beta$ -caryophyllène, l'oxyde de  $\beta$ -caryophyllène, et  $\alpha$ -humulène (15)

Les sesquiterpènes  $\beta$ -caryophyllène et son oxyde sont tous deux très présents dans l'oléorésine de copaïba et dans beaucoup d'autres plantes. Il a été suggéré que l'oxyde de caryophyllène est éventuellement un artefact oxydatif produit au cours du stockage de l'oléorésine. Plusieurs activités biologiques sont attribuées aux  $\beta$ -caryophyllènes, comme l'activité insecticide, antimicrobienne, anesthésique locale, anti-carcinogène, et anti-inflammatoire. Une autre étude a démontré l'effet répulsif de l'oxyde de caryophyllène contre *Anophèles gambiae* (vecteur du paludisme). Les sesquiterpènes  $\beta$ -caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène, isolés à partir de l'huile de feuilles de *Calocedrus formosana*, ont présenté une activité anti-termite et une activité antifongique contre *Laetiporus sulphureus*.

Dans une étude,  $\beta$ -caryophyllène a présenté une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que *Candida albicans*, et l'oxyde de caryophyllène a montré une activité contre *C. albicans*.

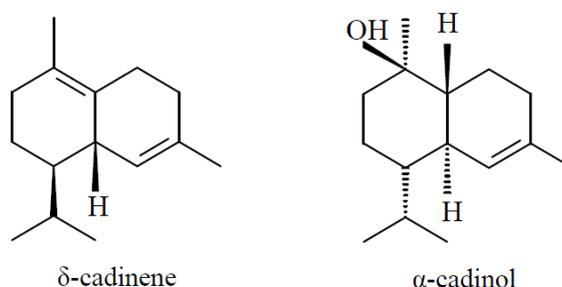
De nombreux auteurs ont démontré les propriétés anticancéreuses de  $\beta$ -caryophyllène. Ce sesquiterpène présente une activité cytotoxique contre plusieurs lignées cellulaires de tumeurs solides. Une étude précédente a montré que  $\beta$ -caryophyllène a présenté une activité antiproliférative sur un adénocarcinome rénal humain et des cellules de mélanome amélanotique. En outre, les  $\beta$ -caryophyllènes sont également à l'origine d'une augmentation de l'activité anticancéreuse d'autres molécules comme les  $\alpha$ -humulène, paclitaxel et isocaryophyllène, contre des lignées de cellules tumorales. Dans l'étude de Zheng, les composés:  $\beta$ -caryophyllène, l'oxyde de  $\beta$ -caryophyllène, et  $\alpha$ -humulène (tous présents dans les oléorésines de copaïba) ont montré une induction significative de l'activité de l'enzyme glutathion S-transférase, une enzyme de détoxication du foie et de l'intestin de la souris. Enfin, l'activité antimutagène des  $\beta$ -caryophyllène a également été observée.

De nombreuses études ont également confirmé l'activité anti-inflammatoire de  $\beta$ -caryophyllène et/ou de l'oxyde caryophyllène. L'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle issue de brindilles de *Cinnamomum osmophloeum* et de ses principaux constituants a été mise en évidence. Dans cette étude, les sesquiterpènes  $\beta$ -caryophyllène et ses oxydes nitriques exposent des excellentes activités anti-inflammatoires et suppriment la production d'oxyde par les macrophages stimulés par les lipopolysaccharides. Dans d'autres études, l'oxyde de caryophyllène a montré une activité analgésique centrale et périphérique importante, ainsi qu'anti-inflammatoire, et a présenté un effet inhibiteur sur la contraction induite par l'histamine sur l'iléon d'un porc. Une amélioration par l'administration orale de  $\beta$ -caryophyllène chez des souris ayant une colite expérimentale induite par le sulfate de dextrane sodique a également été démontrée.

Les sesquiterpènes  $\beta$ -caryophyllène et  $\alpha$ -humulène, isolés à partir d'huile essentielle de feuilles de *Cordia verbenacea*, ont montré une activité anti-inflammatoire systémique chez le rat ayant un œdème de la patte induit par le carraghénane, la bradykinine, la substance P, l'histamine et le facteur d'activation plaquettaire, ainsi que l'œdème induit par le venin d'abeille (*Apis mellifera*) ou l'ovalbumine issu du blanc d'œuf, chez des rats sensibilisés.

De même, une solution d' $\alpha$ -humulène et  $\beta$ -caryophyllène a montré une action contre les mécanismes inflammatoires de l'allergie dans un modèle expérimental dans lequel cette solution a été utilisée pour traiter des souris sensibilisées avec son administration par voie orale ou nasale. L' $\alpha$ -humulène a exposé une activité aussi bien dans les traitements thérapeutiques que préventifs, pour réduire les niveaux d'eotaxin (peptide de l'inflammation à éosinophiles) et d'interleukine-5 des ganglions lymphatiques médiastins (*in vitro*), un résultat non démontré pour  $\beta$ -caryophyllène. L' $\alpha$ -humulène réduit également le facteur de transcription nucléaire (NF-KB), l'expression des sélectines P dans les sécrétions du tissu pulmonaire et du mucus. Les résultats suggèrent la possibilité de son utilisation potentielle dans le traitement de l'asthme et des maladies inflammatoires allergiques. De plus, l' $\alpha$ -humulène a montré une activité cytotoxique contre plusieurs lignées cellulaires de tumeurs solides, y compris le cancer du sein, un adénocarcinome de la prostate, le cancer du poumon, des lignées d'adénocarcinome du côlon, et une lignée cellulaire de mélanome humain, en plus de la lignée cellulaire cancéreuse du côlon de souris. La cytotoxicité de l' $\alpha$ -humulène est probablement due à l'épuisement du glutathion cellulaire et la production d'espèces réactives de l'oxygène.

- **$\delta$ -cadinène et  $\alpha$ -cadinol (Figure 32)**

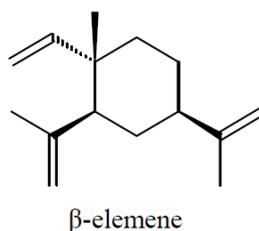


**Figure 32 :** Structure moléculaire des  $\delta$ -cadinène et  $\alpha$ -cadinol (15)

D'autres sesquiterpènes communs de l'oléorésine de copaïba sont  $\delta$ -cadinène et  $\alpha$ -cadinol. L' $\delta$ -cadinène inhibe la croissance de *Streptococcus mutans* (une bactérie cariogène) et *Propionibacterium acnes* (l'une des bactéries responsables de l'acné).

Des études antérieures ont rapporté que l' $\alpha$ -cadinol a montré une activité anti-termite, une activité insecticide contre les larves des moustiques de la fièvre jaune, et était sélectivement cytotoxique contre l'adéno-carcinome du côlon humain. De plus, cette molécule présente une activité antifongique contre *Coriolus versicolor* et *L. sulphureus*.

- **Élémène (Figure 33)**



**Figure 33** : Structure moléculaire du β-élémente (15)

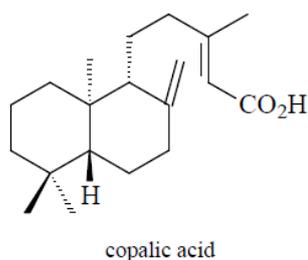
L'Élémène est principalement composée de β, δ et γ-élémente, dont le β-élémente représente 60% à 72% des trois isoformes. β-élémente est un agent anti-tumoral à large spectre. Il a été démontré que ce sesquiterpène est un traitement efficace de différents types de cancer, comme le cancer gastrique, du poumon, laryngé, de l'ovaire, du cerveau, de la prostate, et de la leucémie. Cependant il semble que les cellules de carcinome de poumon humain ont été plus sensibles à cette molécule que les autres.

Les effets inhibiteurs et le mécanisme moléculaire de l'élémente ont également été étudiés dans la croissance des cellules cancéreuses du larynx *in vitro* et *in vivo*. Une augmentation de l'apoptose a été observée dans les cellules où il a été administré de l'élémente. *In vivo*, la croissance des cellules tumorales transplantées chez des souris a été inhibée par l'injection intra-péritonéale d'élémente. Il a également été démontré, pour la première fois, que β-élémente renforçait l'activité du cisplatine (chimiothérapie anticancéreuse) sur l'inhibition de la croissance tumorale plus nettement chez les cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles (15).

## 2.2 Activités pharmacologiques des principaux diterpènes

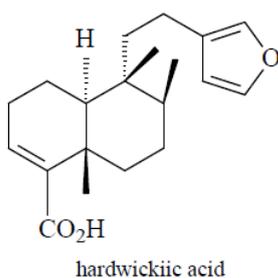
L'acide copalique (Figure 34) est considéré comme un bio-marqueur pour certaines espèces de *Copaifera* et des études ont été réalisées pour évaluer les activités antibactériennes de cette molécule. Il a été démontré qu'elle possède une activité antimicrobienne significative contre *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, et *Staphylococcus epidermidis*. Récemment, il a été étudié l'activité antimicrobienne contre un panel représentatif des micro-organismes responsables de la parodontite, de quatre diterpènes de type labdane : l'acide copalique, l'acide acetycopalique, l'acide hydroxycopalique et l'acide agathique, isolé de l'oléorésine de copaïba de *C. langsdorffii*. L'acide copalique était le diterpène le plus actif contre l'agent pathogène clé, *Porphyromonas gingivalis*

impliqué dans cette maladie infectieuse. En outre, il ne présentait pas de toxicité lorsqu'il a été testé chez l'homme. Dans un autre article, l'acide copalique montre une activité contre les principaux micro-organismes responsables de la carie dentaire: *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* et *Lactobacillus casei*.



**Figure 34 :** Structure moléculaire de l'acide copalique (15)

L'acide hardwickique (Figure 35) est un autre diterpène très communément retrouvé dans l'oléorésine de copaïba. Il est détecté dans environ 42% des oléorésines. Quelques études ont été réalisées avec cette molécule afin de déterminer son activité antimicrobienne. Celle-ci est qualitativement significative sur *B. subtilis*, *S. aureus* et *Mycobacterium smegmatis*. Cependant, dans une étude récente, le diterpène était inactif sur une collection de bactéries Gram-négatif multi-résistantes.



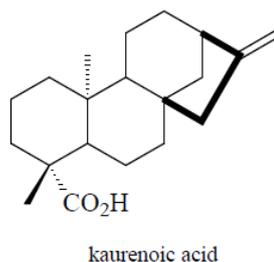
**Figure 35 :** Structure moléculaire de l'acide hardwickique (15)

L'acide kaurenoïque (Figure 36) a été isolé à partir d'oléorésine de *C. cearensis* en 1998 par Braga qui avait utilisé la chromatographie d'échange d'ions. Bien que ce diterpène soit présent dans environ 30% des oléorésines de copaïba, il peut parfois ne pas être détecté par chromatographie gazeuse parce qu'il présente un temps de rétention similaire à celui de l'acide copalique, ce qui entraîne la co-élution. Par conséquent, il n'a pas été possible de distinguer l'acide kaurenoïque du copalique. Plusieurs études pharmacologiques ont permis

de déterminer les propriétés de l'acide kaurenoïque dont l'effet relaxant musculaire utérin, anti-inflammatoire, bactéricide, cytotoxique, et l'effet vasodilatateur.

Les effets relaxants utérins de l'acide kaurenoïque sont principalement dus au blocage du calcium et à l'ouverture des canaux potassiques sensibles à l'ATP. L'acide kaurenoïque présente une toxicité cellulaire potentielle puisqu'il est à l'origine de la destruction d'embryons d'oursins, l'inhibition de la croissance des cellules tumorales et l'hémolyse des érythrocytes humains ainsi que ceux de souris.

Il a été rapporté également que l'acide kaurenoïque extrait de l'oléorésine de *C. paupera*, présente une activité antibactérienne contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *S. epidermidis*. Dans d'autres études, l'acide kaurenoïque, et certains de ses dérivés, ont montré une activité *in vitro* contre les formes trypanomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, sachant que les dérivés de l'acide kaurenoïque ont présenté moins d'effets secondaires que l'acide lui-même.



**Figure 36 :** Structure moléculaire de l'acide kaurenoïque (15)

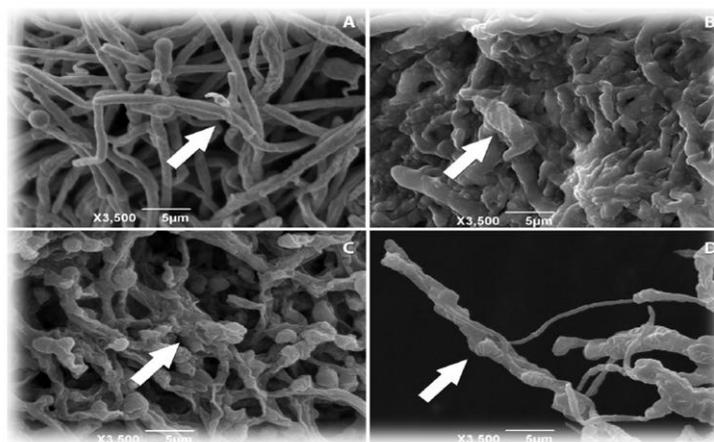
Un autre diterpène extrait de l'oléorésine, l'acide 3 $\alpha$ -hydroxy-kaurenoïque présente en plus une activité antifongique sur *Botrytis cinerea* (un champignon phytopathogène qui attaque les fleurs, les fruits, les feuilles et les tiges de plusieurs plantes). Il inhibe probablement la germination et la croissance du mycélium de ce champignon.

L'activité larvicide a également été rapportée sur les larves d'*Aedes aegypti*, de deux diterpènes labdanes isolés à partir de l'oléorésine de *C. reticulata* : 3 $\beta$ -hydroxilabd-8(17)-13-acide-diène-15-oïque et 3- $\beta$ -acetoxyabd-8(17)-13-diène-15-oïque. Dans une autre étude, ce dernier diterpène a démontré son activité larvicide en provoquant la mort des larves *A. aegypti* par la destruction de leurs cellules de l'intestin moyen. De plus, un autre diterpène, kovalenol, également présent dans l'oléorésine, a montré une activité anti-tumorale puissante sur des carcinomes murins (15).

### 3. Utilisation possible dans les domaines pharmaceutique et cosmétique

#### 3.1 Traitement des infections fongiques

Les dermatophytoses sont des infections dues à des champignons microscopiques filamenteux qui affectent les tissus kératinisés chez les humains et les animaux. Une étude (19) met en évidence l'activité antifongique de l'oléorésine extraite de *Copaifera langsdorffii* sur les souches *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum*. Le kétoconazole et la terbinafine ont été utilisés comme médicaments de référence. L'oléorésine de copaïba a montré une activité fongicide modérée sur *T. mentagrophytes* et une faible activité fongicide contre *T. rubrum*, bien inférieure aux deux antifongiques de référence. Il n'y avait aucune activité sur *M. canis* et *M. gypseum*. L'analyse par MEB a révélé des dommages physiques et des altérations morphologiques telles que la compression et le regroupement des hyphes dans la structure des champignons exposés à l'action de l'oléorésine (Figure 37). Les résultats stipulent que l'utilisation de l'oléorésine comme traitement antifongique des dermatophytoses n'est pas très intéressante.



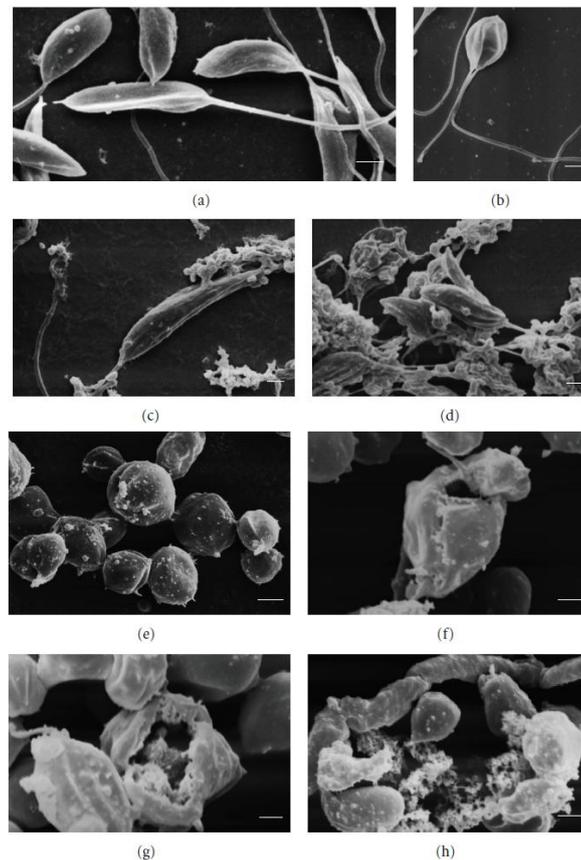
**Figure 37 :** Image MEB de *T. mentagrophytes* : (A) non traité (B) traité avec l'oléorésine de copaïba, (C) et traité avec kétoconazole et (D) traité avec terbinafine (19).

#### 3.2 Traitement de la leishmaniose

La leishmaniose est une maladie parasitaire tropicale négligée. Cette maladie chronique à manifestation cutanée et/ou viscérale est due à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania*, transmise par la piqûre de certaines espèces de phlébotomes. Selon l'Organisation mondiale de la Santé, il y a environ 1,5 à 2 millions de nouveaux cas de leishmaniose cutanée chaque année à travers le monde, avec des taux

élevés de morbidité et de mortalité. Les efforts pour trouver de nouvelles molécules efficaces et sûres pour le traitement oral de la leishmaniose sont en cours depuis plusieurs décennies, afin d'éviter les effets indésirables des antimoniaux pentavalents actuellement utilisés.

Plusieurs études se sont interrogées sur la possibilité d'utiliser l'oléorésine de copaïba pour traiter la leishmaniose. Une étude porte sur les changements morphologiques et ultra-structuraux de *Leishmania amazonensis* traité par l'oléorésine de copaïba, en utilisant la microscopie électronique et la cytométrie de flux. Sur les formes promastigotes et amastigotes axéniques, l'oléorésine a provoqué des dommages mitochondriaux importants et la dénaturation de la membrane plasmique qui induit la perte de viabilité cellulaire suite à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique (Figure 38) (38).



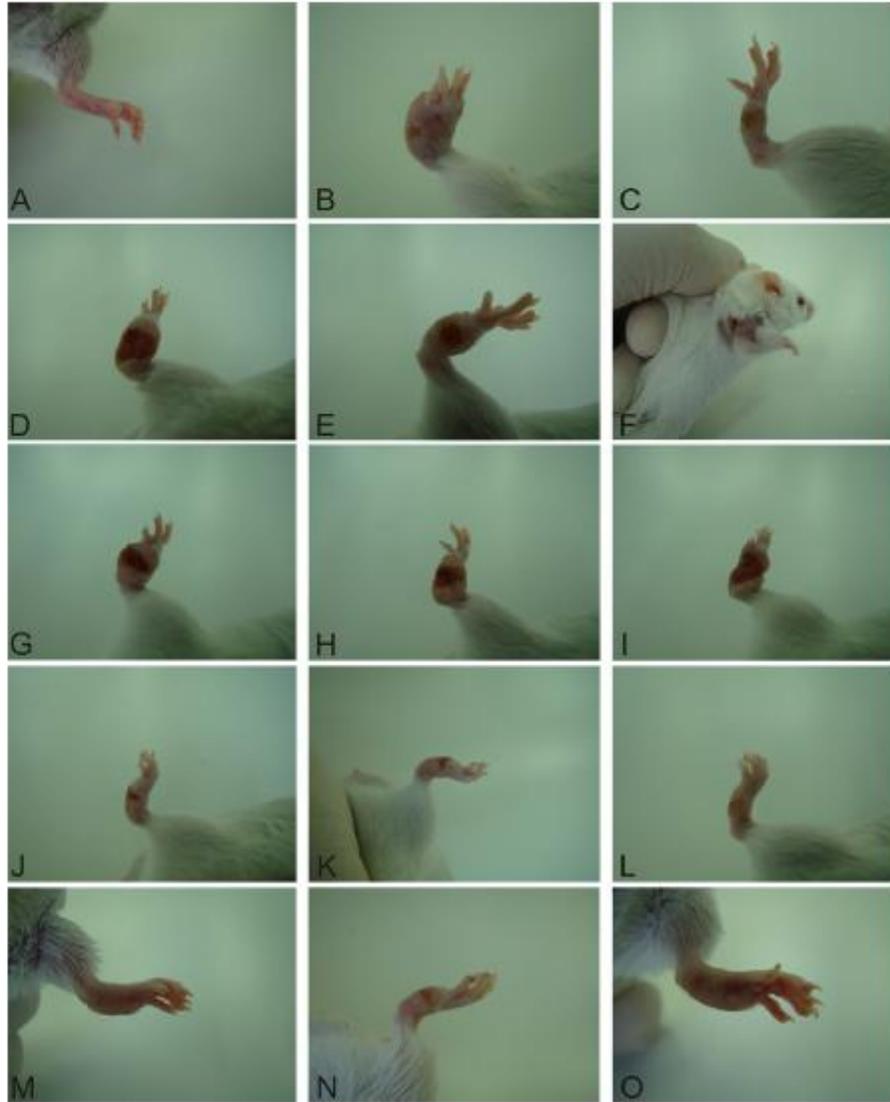
**Figure 38 :** MEB des formes promastigotes et amastigotes axéniques de *L. amazonensis* traités avec l'oléorésine de copaïba pendant 72 h. (a) promastigotes contrôles; (b) promastigotes après traitement avec IC<sub>50</sub> d'oléorésine de copaïba; (c et d) promastigotes après traitement avec CI<sub>90</sub> d'oléorésine de copaïba; (e) amastigotes contrôles; (f) amastigote après traitement avec IC<sub>50</sub> d'oléorésine de copaïba; (g et h) amastigote après un traitement avec CI<sub>90</sub> d'oléorésine de copaïba (38).

Dans une autre étude, des macrophages murins ont été infectés avec des promastigotes de *Leishmania amazonensis* et traités avec huit extraits d'oléorésine de copaïba de différentes espèces.

Les oléorésines ont montré des niveaux variables d'activité sur les formes promastigotes. L'oléorésine la plus active était extraite de *Copaifera reticulata* avec des valeurs de concentration inhibitrice à 50% (CI<sub>50</sub>) respectivement de 5, 15 et 20 g/ml pour les formes promastigotes, amastigotes axéniques et amastigotes intracellulaires, en comparaison à l'amphotéricine B qui a une CI<sub>50</sub> respectivement de 0,058 et 0,231 g/ml sur les formes promastigotes et amastigotes. Le test de cytotoxicité a montré une faible cytotoxicité de l'oléorésine sur les macrophages (39).

De plus, il a été démontré que les oléorésines riches en diterpènes ont présenté une activité préférentielle antipromastigote, alors que les oléorésines riches en sesquiterpènes présentent une activité préférentielle dose-dépendante sur les amastigotes intracellulaires. Un grand nombre de composés ont une activité plus ou moins importante sur *L. amazonensis*. Par exemple, le  $\beta$ -caryophyllène est un composé anti-leishmaniose efficace (40). Mais plus précisément, l'acide hydroxycopalique et le copalate de méthyle présentent la plus importante activité sur les promastigotes avec des CI<sub>50</sub> respectives de 2,5 et 6  $\mu$ g/ml. De plus, les acides pinifolique et kaurénoïque présentent une activité sur les amastigotes axéniques avec des valeurs de CI<sub>50</sub> respectives de 3,5 et 4  $\mu$ g/ml. Les acides agathique, kaurénoïque et pinifolique ont provoqué des augmentations significatives de la perméabilité de la membrane plasmique et la dépolarisation de la membrane mitochondriale du protozoaire (41).

Une étude sur des souris présentant des lésions dues à leur infestation par leishmania, montre qu'un traitement par voie orale d'oléorésine de copaïba permet de réduire significativement la taille de lésion moyenne ( $1,1 \pm 0,4$  mm) par rapport aux souris non traitées ( $4,4 \pm 1,3$  mm). Le résultat est optimal lorsque le traitement oral est associé à une application topique d'une crème à un 4% d'oléorésine (Figure 39). L'évaluation histopathologique ainsi que l'évaluation de la mutagénicité (test des micronoyaux), n'ont révélé aucune toxicité ni effet génotoxique. Bien que le mécanisme d'action de l'oléorésine n'est pas encore parfaitement élucidé, ces résultats indiquent que l'oléorésine de copaïba ou l'un de ses composés pourrait être une nouvelle alternative possible, qui permettra de fournir un traitement plus sûr, moins cher et plus facile à administrer pour traiter la leishmaniose (42).



**Figure 39 :** Évaluation du développement de la leishmaniose cutanée chez les souris traitées avec de l'oléorésine de copaïba. (A) témoin non infecté et non traité; (B) témoin infecté et non traité; (C) traité par Glucantime (médicament de référence) (100 mg/kg/jour) administré par injection intramusculaire; (D-F) traité par l'oléorésine de copaïba (100 mg/kg /jour) par voie sous-cutanée; (G-I) traité par voie topique avec une crème d'oléorésine de copaïba à 4% (quantité de 1 mg/mm<sup>2</sup>); (J-L) traité par l'oléorésine de copaïba à une dose de 100 mg/kg/jour par gavage oral. (M-O) traité par gavage (100 mg/kg/jour) et par voie topique avec de la crème l'oléorésine de copaïba à 4% (quantité de 1 mg/mm<sup>2</sup>) (42).

### 3.3 Prévention de la fièvre jaune

L'oléorésine de copaïba peut jouer un rôle dans la prévention de maladies transmises par des moustiques. En plus de ses propriétés acaricides et insecticides (21), elle possède également des propriétés larvicides sur les larves du moustique *Aedes aegypti*, le principal vecteur de la dengue et la fièvre jaune urbaine. Par conséquent, ce composé

semble être une source intéressante à exploiter pour la création de nouveaux produits qui permettraient la prévention de certaines maladies vectorielles (43,44).

### 3.4 Traitement anticancéreux

Plusieurs études expérimentales sur des souris ou des rats évaluent les propriétés anticancéreuses de l'oléorésine de copaïba. L'une d'entre elles, utilise l'oléorésine obtenue à partir de *Copaifera multijuga* Hayne sur des souris qui ont reçu des cellules de mélanome par voie sous-cutanée. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'action de l'oléorésine sur la croissance tumorale des cellules de mélanome et l'inhibition de métastases pulmonaires induite par cette tumeur chez la souris. Les souris qui ont reçu des cellules de mélanome ont développé une tumeur solide qui atteint un pic de croissance à 17 jours. En plus de l'augmentation de la taille de la tumeur, il a également été observé une augmentation du nombre de nodules pulmonaires.

L'administration orale de l'oléorésine à 2 g/kg (aux jours 3, 5, 7, 10, 12 et 14 après l'inoculation des cellules tumorales) a réduit la croissance tumorale de 58% et le poids de la tumeur de 76%. A la même dose l'oléorésine a réduit le nombre de nodules pulmonaires de 47,1%. Des expériences *in vitro* ont montré que l'incubation de la lignée cellulaire de mélanome avec l'oléorésine réduit la viabilité cellulaire avec un mécanisme concentration et temps dépendants (45).

Cependant il existe également une étude qui évalue le potentiel préventif non pas de l'oléorésine mais de l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de *C. langsdorffii* sur le cancer du colon chez des rats. L'extrait réduit considérablement l'étendue des dommages de l'ADN et les foyers de cryptes aberrantes (étape visible la plus précoce du processus de carcinogenèse colique) induite par 1,2-diméthylhydrazine, ce qui suggère que l'extrait a un effet protecteur contre la cancérogenèse colique (46).

### 3.5 Traitement neurologique

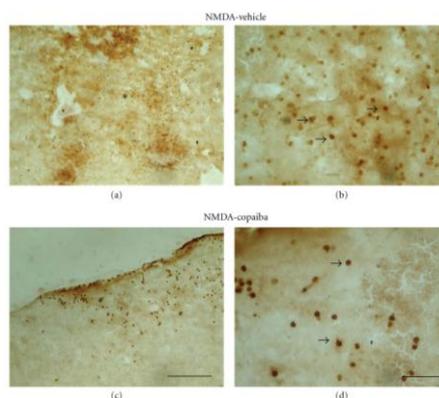
Une étude a évalué l'effet anxiolytique présumé de l'administration aiguë d'oléorésine de copaïba exsudée de *Copaifera reticulata* Ducke. L'oléorésine a été administrée à des taux différents pour chaque groupe (100, 400 et 800 mg/kg) de rats mâles qui ont été soumis à un mode d'anxiété du labyrinthe surélevé.

En comparaison avec les rats témoins, le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe surélevé a augmenté chez les rats traités par les trois posologies

d'oléorésine testées (témoin : 33,6% ± 4,5; oléorésine à 100 mg/kg : 44,67% ± 3,68; à 400 mg/kg : 47,2% ± 2,3 et à 800 mg/kg : 50,7% ± 2,2) et le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts à également augmenté surtout à la dose de 800 mg/kg (témoin : 26,4% ± 5,7; oléorésine à 800 mg/kg : 52,0% ± 2,7). Un anxiolytique standard, le diazépam a été utilisé comme témoin positif à une posologie de 3 mg/kg. De la même manière, le diazépam a augmenté le pourcentage d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts par rapport au témoin (% d'entrées : témoin : 45,4% ± 1,3; diazépam : 50,7% ± 1,9;% ; temps passé dans les bras ouverts: témoins : 28,2% ± 0,9; diazépam : 38,9% ± 1,2).

Ces données ont montré que le traitement aigu avec l'oléorésine de copaïba produit un effet de type anxiolytique dose-dépendant sur la gamme des doses testées, sans affecter le niveau d'activité général, en se basant sur des paramètres conventionnels et éthologiques chez le rat (16).

Une étude met en avant les propriétés neuro-protectrices, après un trouble du système nerveux, de l'oléorésine de *Copaifera reticulata* Ducke qui est traditionnellement utilisée en tant qu'agent anti-inflammatoire et cicatrisant. Les rats adultes ont subi des dégâts aigus du cortex moteur par injection de neurotoxine N-méthyl-D-aspartate puis ont été traités soit avec une dose unique de d'oléorésine de 400 mg/kg, peu après l'injection (groupe 1) soit avec deux doses journalières (200 mg/kg) pendant trois jours (Groupe 2) après l'injection. Les animaux témoins ont été traités avec l'excipient seul. Le traitement par l'oléorésine aussi bien en dose unique que sur trois jours, induit la préservation des tissus et diminue le recrutement des neutrophiles et l'activation microgliale dans le site de la lésion par rapport aux animaux témoins (Figure 40). Les résultats suggèrent que le traitement par l'oléorésine de copaïba induit une neuroprotection en modulant la réponse inflammatoire aiguë suite à un dommage du système nerveux central (47).



**Figure 40** : Le traitement par l'oléorésine réduit l'infiltration des polynucléaires neutrophiles comme révélé par immunohistochimie. Animaux non traités (ab) ou traités avec 400 mg/kg d'oléorésine (cd) (47).

Une autre étude s'interroge sur les effets immunomodulateurs de l'oléorésine de copaïba sur la maladie de la sclérose en plaques. La sclérose en plaques est une maladie neurologique auto-immune chronique du système nerveux central liée à une démyélinisation des fibres nerveuses. Des splénocytes, cellules immunitaires de souris avec une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (modèle pour étudier la sclérose en plaque) sont utilisées pour déterminer l'influence de l'oléorésine de copaïba (à une concentration de 25, 50 et 100 µg/ml) sur la production de monoxyde d'azote (NO), peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor alpha* : TNF-α), interféron-gamma (IFN-γ) et interleukine 17 (IL-17). Les cellules cultivées de souris avec l'encéphalomyélite ont produit des niveaux élevés de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF-α, IFN-γ et l'IL-17 en comparaison avec la production basale du groupe témoin négatif. L'oléorésine de copaïba a inhibé de manière significative à une concentration de 50 et 100 µg/ml la production de NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNF-α, IFN-γ, et l'IL-17 par rapport au témoin positif. Il est donc suggéré que l'oléorésine de copaïba agit sur le mécanisme de développement de l'encéphalomyélite par un effet anti-inflammatoire et par la modulation de la réponse immunitaire sur les cellules lymphocytaires en inhibant les facteurs TNF-α, IFN-γ et IL-17 (48).

### 3.6 Traitement anti-nociceptif

L'activité antinociceptive de deux oléorésines amazoniennes de copaïba (*Copaifera multijuga* Hayne et *Copaifera reticulata* Ducke) a été étudiée. L'administration par voie orale d'oléorésine a été évaluée en utilisant des modèles périphériques (contorsion abdominale induite par l'acide acétique et le formol), épinière (test de *Tail flick*) et supra-épinière (plaque chauffante). Les résultats ont démontré que des doses allant de 30 à 150 mg/kg étaient suffisantes pour développer de manière significative un effet antinociceptif périphérique. Les deux oléorésines de copaïba montrent une activité centrale, mais avec moins d'effet sur les régions supra-spinales du cerveau. L'administration de l'antagoniste des récepteurs opioïdes, la naloxone a complètement inhibé l'effet antinociceptif induit par les deux oléorésines. Les résultats indiquent que les oléorésines de copaïba possèdent un effet antinociceptif central et périphérique, qui pourrait être utilisé dans le traitement de troubles algiques (18).

### 3.7 Traitement anti-inflammatoire

L'oléorésine de copaïba a surtout été utilisée dans le passé par les praticiens de la médecine traditionnelle pour ses propriétés anti-inflammatoires. Dans une étude, l'activité anti-inflammatoire de trois oléorésines issues de *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke et *Copaifera reticulata* Ducke a été appréciée. Les effets pharmacologiques des trois oléorésines ont été évalués *in vitro* par la mesure de la production de NO par les macrophages murins et *in vivo* en utilisant le modèle de pleurésie induite par le zymosan (complexe de protéines et de glucides utilisé expérimentalement pour déclencher des réactions inflammatoires) chez la souris. L'injection de zymosan a induit une réaction inflammatoire aiguë dans la cavité pleurale des souris, caractérisé par une augmentation marquée du nombre de leucocytes totaux, en raison de l'accumulation des neutrophiles et l'extravasation des protéines. Cette réaction a été significativement inhibée par un prétraitement avec le diclofenac *per os* à 100 mg/kg.

Les trois oléorésines étaient capables d'inhiber la production de NO. L'administration orale des oléorésines a significativement inhibé l'accumulation des leucocytes et des neutrophiles totaux. Cependant, l'oléorésine issue de *Copaifera multijuga* bénéficie d'une meilleure efficacité pour l'inhibition de la production de NO et l'inhibition de l'accumulation de leucocytes (45%) et de neutrophiles (73%) à la dose de 100 mg/kg, alors qu'il faut une dose de 400 mg/kg pour avoir la même efficacité avec l'oléorésine issue de *Copaifera cearensis*. Cependant toutes les oléorésines étudiées, ont un effet similaire, aux doses efficaces, en comparaison au traitement avec le diclofénac à 100 mg/kg, néanmoins elles n'inhibent pas l'extravasation de protéines induite par le zymosan (14). L'oléorésine de copaïba possède bien des propriétés anti-inflammatoires non négligeables (13,47).

### 3.8 Traitement du psoriasis

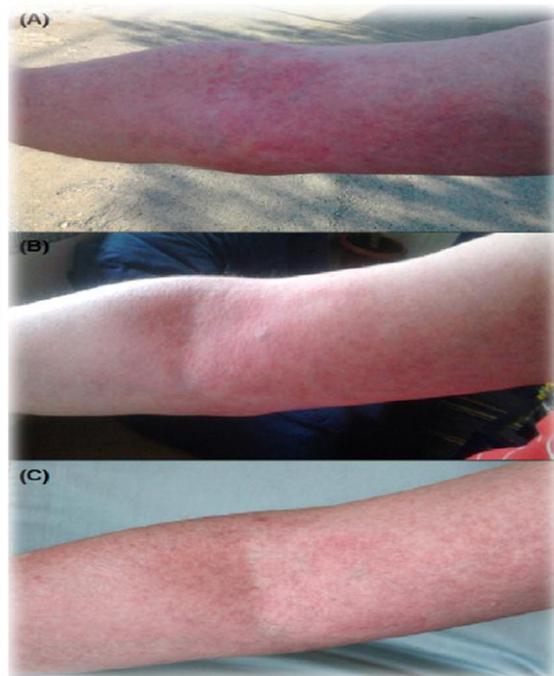
Les propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires de l'oléorésine de copaïba peuvent laisser penser qu'elle peut être utilisée dans le traitement du psoriasis. Une étude a été menée afin de comprendre le mécanisme responsable de l'activité anti-inflammatoire de l'oléorésine issue de *Copaifera langsdorffii*, et d'évaluer son effet antipsoriasique après un traitement par prise orale ou par application topique. L'oléorésine a réduit la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, et TNF) par des monocytes humains de façon dose-dépendante. Dans un essai clinique préliminaire, trois

patients atteints de psoriasis chronique, ont été traités avec la prise orale ou topique de l'oléorésine, et ont présenté une amélioration significative des signes typiques de la maladie, à savoir l'érythème, l'épaisseur de la peau, et la desquamation.

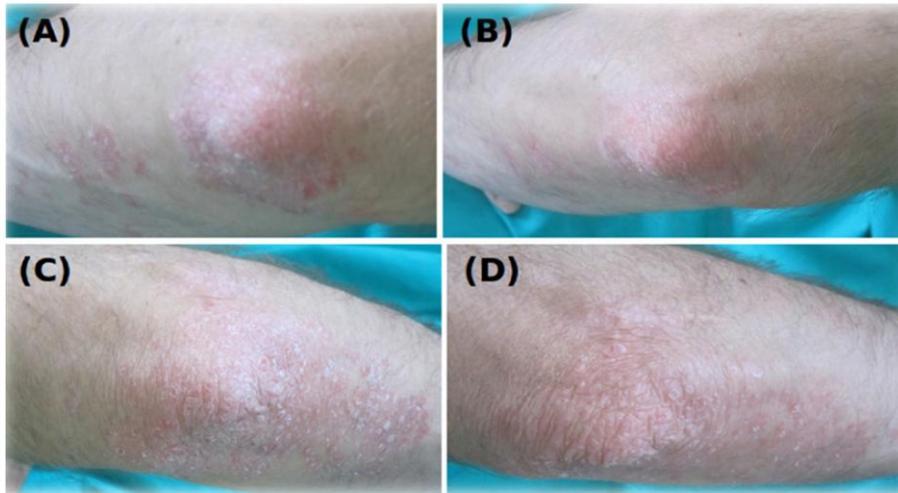
Le patient 1 est un homme de 45 ans avec un antécédent de 8 ans de psoriasis chronique récalcitrant (Figure 41). Le patient 2 est une femme de 36 ans avec également un antécédent de 8 ans de psoriasis chronique récalcitrant (Figure 42). Le patient 3 est un homme de 36 ans souffrant aussi de psoriasis chronique récalcitrant depuis 8 ans (Figure 43).



**Figure 41** : Patient 1. Les jambes (A) de base et (B) après six semaines de prise orale d'oléorésine de *C. langsdorffii* Desf (12).



**Figure 42** : Patient 2. Coude droit (A) de base, (B) après 4 semaines de prise orale d'oléorésine et (C) après six semaines de prise orale d'oléorésine de *C. langsdorffii* (12).



**Figure 43 :** Patient 3. (A) coude droit de base, (B) coude droit après 6 semaines de traitement topique avec calcipotriol (utilisé pour le traitement du psoriasis), (C) coude gauche de base, (D) coude gauche après 6 semaines de traitement topique avec l'oléorésine de *C. langsdorffii* Desf (12).

En conclusion, les résultats de ce travail, fournissent des preuves solides que l'activité anti-inflammatoire de l'oléorésine de copaïba est liée à l'inhibition de la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), une protéine de la super-famille des facteurs de transcription impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire, et par conséquent de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Pour pouvoir confirmer le bénéfice du traitement par l'oléorésine de copaïba sur le psoriasis, une étude à plus grande échelle contre placebo en double aveugle doit être réalisée (12).

### 3.9 Traitement cicatrisant

L'activité cicatrisante de l'oléorésine issue de *C. langsdorffii* a été évaluée chez le rat sur des plaies expérimentales. L'oléorésine a été testée en surveillant la contraction et en mesurant la force de traction dans la cicatrisation des plaies. L'application topique de l'oléorésine à une concentration de 4% a accéléré la cicatrisation des plaies ouvertes. La valeur moyenne de la contraction de la plaie chez les rats traités avec l'oléorésine sur 9 jours était de  $84,05 \pm 2,37\%$  contre  $51,29 \pm 9,54\%$  chez les rats témoins. Ces résultats indiquent l'effet bénéfique de l'oléorésine de *C. langsdorffii* sur la cicatrisation des plaies et justifient son utilisation traditionnelle pour le traitement des plaies (49).

Une autre étude similaire évalue les effets d'une pommade à l'oléorésine de copaïba à 10% sur des lambeaux de peau dorsale chez le rat. La pommade a favorisé l'angiogenèse et accéléré la viabilité des lambeaux de peau. La zone nécrotique était moins

étendue et le tissu de granulation avec des fibroblastes et des fibres de collagène était plus important (Figure 44) (50).



**Figure 44** : Photographies de rats de chaque groupe montrant les aspects macroscopiques de lambeau de peau (colonne de gauche) et microscopiques (colonne de droite). GCA - groupe contrôle absolu; GC - groupe témoin; GT = groupe traité avec la pommade d'oléorésine (50).

Il existe également des études qui évaluent le potentiel cicatrisant de l'oléorésine lorsqu'elle est administrée par voie orale. Les effets de l'oléorésine de copaïba sur la correction du défaut abdominale traités par l'utilisation de mailles constituées de polypropylène et de poliglécaprone ont été évalués chez le rat.

Une plaie a été créée dans la paroi abdominale et corrigée avec un maillage chez 36 rats. L'oléorésine de copaïba a été administrée par gavage dans un groupe et le maillage a été directement trempé dans l'oléorésine avant d'être posé sur les rats dans un autre groupe. Le processus de guérison a été analysé par l'aspect macroscopique et microscopique des mailles. L'oléorésine de copaïba administrée par gavage a diminué le nombre d'adhérences abdominales, de plus le processus de la formation de fibres de collagène a été accéléré, sans dommages, dans les premiers stades de la guérison. Toutefois, lorsque l'oléorésine est utilisée par trempage direct sur le maillage, des effets corrosifs sont apparus et ont compromis le processus de cicatrisation de la paroi abdominale (51).

### 3.10 Traitement de l'endométriose

L'endométriose est la présence de muqueuse utérine en dehors de la cavité utérine, principalement dans la cavité péritonéale et au niveau des ovaires ou exceptionnellement dans tout autre organe avoisinant. Une étude a pour objectif d'analyser les changements qui se produisent chez des rats souffrant d'endométriose expérimentale après un traitement avec l'oléorésine de copaïba issue de *Copaifera langsdorffii*. Le premier groupe animal a reçu de l'oléorésine par voie orale (0,63 mg/jour), alors que le groupe témoin n'a reçu qu'une solution de chlorure de sodium à 0,9% par voie orale en gavage pendant 14 jours. Après cette période, le volume de la transplantation autologue qui crée l'endométriose expérimentale a été calculé et sa structure analysée par microscopie optique.

Il a été observé une augmentation significative entre les volumes initiaux et finaux de l'implant dans le groupe témoin, tandis que le traitement avec l'oléorésine de copaïba a permis une réduction marquée de la croissance de l'endomètre au fil du temps. L'oléorésine de copaïba (*Copaifera langsdorffii*) semble donc être un traitement alternatif prometteur pour l'endométriose (52).

### 3.11 Traitement des sepsis

Un sepsis est défini comme l'ensemble des symptômes générés par l'organisme en réponse à une inflammation systémique grave, après une infection générale par des germes pathogènes, et la propagation de celle-ci par voie sanguine.

Pour évaluer les effets de l'oléorésine de copaïba (*Copaifera officinalis*) administrée par différentes voies (orale et sous-cutanée) sur la survie après un sepsis, des souris sont soumises à une ligature et à la perforation du cæcum dans une étude. Puis elles ont été réparties en quatre groupes : groupe d'animaux standards; un groupe de contrôle (soumis à une ligature et à la perforation du cæcum); un groupe gavage (soumis à une ligature et à la perforation du cæcum et traité avec de l'oléorésine de copaïba par gavage); et un groupe sous-cutané (soumis à une ligature et à la perforation du cæcum et traité avec de l'oléorésine de copaïba par injection sous-cutanée). Le temps de survie a été déterminé et une analyse histologique a été réalisée après la mort des animaux.

Tous les animaux ayant reçu l'oléorésine, quelle que soit la voie utilisée, ont survécu plus longtemps par rapport au groupe témoin. Le temps de survie a été de 20 heures pour le groupe témoin, 32 heures pour les animaux du groupe gavage et jusqu'à 52 heures pour le groupe sous-cutané. L'administration sous-cutanée prophylactique de

l'oléorésine de copaïba chez des souris soumises à un sepsis sévère par ligature et perforation du cæcum, a entraîné une durée de survie plus élevée que la non-utilisation ou que l'utilisation de cette oléorésine par gavage (53).

### 3.12 Traitement des ulcères gastriques

L'oléorésine a été utilisée pour traiter les ulcères gastriques rebelles en Amazonie dans la médecine traditionnelle (2). Les effets de l'oléorésine obtenue à partir de *Copaifera langsdorffii* sur des lésions gastriques induites par l'éthanol, l'indométacine et le stress par maintien de l'hypothermie ont été étudiés chez des rats. L'administration orale d'oléorésine à des doses de 200 et 400 mg/kg fournit une protection dose-dépendante significative contre les dommages gastriques causés par de l'éthanol et le stress, ainsi qu'une inhibition de la formation d'ulcération gastrique induite par l'indométacine à la dose de 400 mg/kg. De plus, lors de la ligature du pylore durant 4 heures chez le rat, l'accumulation excessive de sucs gastriques et la sécrétion de mucus ont été considérablement ralenties par l'oléorésine et l'acidité totale a également été inhibée. Ces résultats soulignent le potentiel gastroprotecteur de l'oléorésine de *C. langsdorffii* et la nécessité d'une étude plus poussée sur ce remède traditionnel (20).

### 3.13 Traitement de l'ischémie – reperfusion

Comme vu précédemment, l'oléorésine de copaïba peut prévenir les ulcères gastriques et favorise la cicatrisation des plaies. Une étude a examiné les effets de cette oléorésine sur les dommages intestinaux associés à une ischémie mésentérique suivie d'une reperfusion chez le rat. Les rats ont subi 45 min d'ischémie suivie de 60 min de reperfusion et ont été divisés en quatre groupes : Groupe 1: rats témoins, Groupe 2: témoins avec ischémie – reperfusion, Groupes 3 et 4: ischémie – reperfusion traités par 200 et 400 mg/kg respectivement d'oléorésine par voie orale. Le traitement a été administré 24, 12 et 2 heures avant l'événement d'ischémie – reperfusion. Les animaux ont été sacrifiés à la fin de la période de reperfusion et les échantillons de tissus iléaux ont fait l'objet d'une analyse biochimique. Les composés suivants : myéloperoxydase (indice de leucocytes polynucléaires), malondialdéhyde (produit final de la lipoperoxydation), catalase (enzyme antioxydant), glutathion réduit (antioxydant), et le nitrite (marqueur de l'oxyde nitrique) ont été déterminés dans des homogénats d'iléon. Les résultats montrent que l'ischémie – reperfusion produit une augmentation significative de la teneur en

malondialdéhyde et myéloperoxydase, ainsi qu'une augmentation de la production de nitrite et de l'activité de la catalase avec une diminution significative du glutathion par rapport au témoin du groupe 1. Le traitement par l'oléorésine a permis une atténuation importante des augmentations des myéloperoxydase et malondialdéhyde ainsi que l'activité de la catalase et le niveau de nitrite. De plus, l'oléorésine pourrait effectivement empêcher l'appauvrissement du glutathion associé à l'ischémie – reperfusion. Les données indiquent que l'oléorésine de copaïba possède une action protectrice contre les dommages du tissu intestinal induits par l'ischémie – reperfusion, ce qui semble être, en partie, dû à un mécanisme antioxydant et anti-péroxydation lipidique de l'oléorésine (54). Ces deux mécanismes d'action sont également retrouvés dans l'expérimentation animale du traitement de la colite aiguë et l'ischémie – reperfusion d'un lambeau de peau, où l'oléorésine de copaïba exerce un effet protecteur (55,56).

### **3.14 Traitement bucco-dentaire**

L'oléorésine de copaïba a également été nouvellement évaluée dans le domaine du soin dentaire. L'objectif d'une étude récente a été d'évaluer l'influence de l'administration systémique ou topique de l'oléorésine de copaïba sur la cicatrisation alvéolaire après une extraction dentaire. Vingt-huit rats mâles ont vu leur première molaire inférieure extraite et ont été par la suite, divisés en quatre groupes, en fonction du traitement reçu : (a) topique par irrigation alvéolaire d'oléorésine de copaïba, (b) irrigation de sérum physiologique, (c) systémique par gavage quotidien à l'oléorésine de copaïba ou (d) par gavage quotidien avec du sérum physiologique. Une semaine après, les mandibules ont été prélevées et traitées pour obtenir des coupes histologiques décalcifiées. Les résultats ont mis en évidence un niveau élevé de migration épithéliale, un petit nombre de cellules inflammatoires et l'amélioration vasculaire chez les animaux qui ont reçu un traitement systémique par l'oléorésine. Les rats traités avec une administration topique de copaïba ont présenté des ulcérations et un grand nombre de cellules inflammatoires. Une néoformation osseuse accrue a été observée dans les deux groupes traités avec de l'oléorésine en comparaison avec les groupes témoins. Il peut donc être conclu que l'administration topique ou systémique d'oléorésine de copaïba conduit à une meilleure guérison de l'os alvéolaire, mais l'application topique sur le tissu conjonctif doit être soigneusement considérée, pour éviter les risques d'ulcération (57).

Une autre étude a également démontré que l'acide copalique retrouvé dans les oléorésines de copaïba présente des propriétés bactériostatiques sur *Porphyromonas gingivalis*, un agent infectieux impliqué dans la parodontite. La parodontite est une maladie qui consiste en une inflammation du parodonte, c'est-à-dire des tissus de soutien de l'organe dentaire : la gencive, le cément, le ligament alvéolo-dentaire et l'os alvéolaire. L'utilisation de l'acide copalique a inhibé la croissance bactérienne dans les 12 premières heures (effet bactériostatique), puis son effet bactéricide a été clairement distingué par la suite (entre 12 et 24 heures). De plus son association avec la chlorhexidine (antiseptique bactéricide à large spectre) a nettement amélioré l'effet bactéricide de la chlorhexidine par synergie d'action et le temps pour obtenir un effet bactéricide n'est plus que de 6 heures au lieu de 12 heures pour la chlorhexidine seule. Donc l'utilisation d'extraits standardisés issus de l'oléorésine de copaïba à haute teneur en acide copalique peut être une stratégie importante dans le développement de nouveaux produits de soins bucco-dentaires (58).

### 3.15 Traitement de l'acné

Un essai clinique contre placebo contrôlé en double aveugle, a pour objectif de tester les effets sur l'acné de l'oléorésine de copaïba, après son incorporation dans un gel appliqué chez des volontaires avec de l'acné. Un gel actif et un gel placebo ont été appliqués chez dix volontaires acnéiques pendant 21 jours puis l'étendue des zones touchées par l'acné a été analysée. Il y a été observé une diminution très significative de la surface affectée par l'acné dans les zones traitées avec la préparation de 1,0% d'huile essentielle de copaïba. L'huile essentielle est extraite de l'oléorésine par distillation à la vapeur, puis purifiée et incorporée dans le gel actif. Ce dernier a permis l'arrêt de l'éruption de nouvelles pustules, la guérison des pustules préexistantes, et une diminution de la zone érythémateuse. Cependant la surface affectée par l'acné a également diminué avec le traitement par placebo. Après 21 jours de traitement, une diminution très significative de l'étendue de la zone affectée par l'acné, a été observé aussi bien dans la région traitée avec du gel de placebo que celle avec le gel actif. L'amélioration de l'acné chez les sujets traités avec le gel placebo est probablement due à l'hygiène de la peau avant l'application du gel comme demandé dans l'étude. Il faudrait donc faire une étude supplémentaire sur un plus grand nombre de personnes pour confirmer ou non si l'oléorésine de copaïba possède bien une activité supérieure au placebo dans le traitement de l'acné (59).

### 3.16 Autres perspectives d'utilisation possible

En outre des nombreuses propriétés thérapeutiques, l'oléorésine de copaïba possède des propriétés antibactériennes et antifongiques qu'il est possible d'exploiter. L'oléorésine peut donc servir comme conservateur dans certaines préparations cosmétiques, ou être ajoutée à des matériaux d'emballage pour créer des emballages actifs.

Un emballage actif est capable d'interagir avec le produit qu'il contient. Il change les conditions du produit emballé afin d'améliorer sa durée de vie et sa sûreté tout en maintenant la qualité. Il peut par exemple lutter contre l'oxydation, l'humidité ou la contamination bactérienne [définition issue de la réglementation européenne n°1935/2004/EC sur les matériaux à contact alimentaire].

Le rôle initial de l'emballage est de contenir, transporter, stocker et protéger le produit. Toutefois, aujourd'hui, les consommateurs demandent de plus en plus de fonctionnalités : durée de vie plus longue du produit emballé, traçabilité, caractère antimicrobien... C'est pourquoi les emballages actifs suscitent beaucoup d'attention ces dernières années. Certains emballages qui se trouvent en contact avec les aliments, sont maintenant capables d'avoir une activité antibactérienne. L'utilisation entre autres d'huiles essentielles antibactériennes dans les films d'emballage permet d'obtenir cette activité. En plus d'être un composé naturel, les huiles essentielles présentent un large spectre d'actions sur les bactéries. Cela permet donc une bonne protection des aliments emballés sans trop d'effets nocifs (60–62).

Il est également possible d'emballer des dispositifs médicaux difficilement stérilisables dans des emballages actifs afin qu'ils soient protégés contre la contamination bactérienne. L'oléorésine de copaïba, qui possède bien des propriétés antibactériennes, peut y être incorporée, sous forme libre ou micro-encapsulée, avec un contrôle précis de la cinétique de libération. Les microcapsules peuvent également libérer l'oléorésine à un moment souhaité, par rupture de la membrane des capsules comme par exemple lors de l'ouverture de l'emballage, dans le but d'avoir une activité antibactérienne supplémentaire.

**THESE SOUTENUE PAR : Maroi MAHROUS**

**TITRE : PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES DE L'OLÉORÉSINE NATURELLE DE COPAÏBA ET TESTS ANTIBACTÉRIENS**

## **CONCLUSION**

Populairement connu pour son oléorésine, l'arbre de copaïba, appartenant au genre *Copaifera*, pousse dans l'ensemble des zones tropicales d'Amérique Latine et d'Afrique de l'Ouest. Il est répandu de façon importante dans la région Amazonienne et le Centre ouest du Brésil et se divise en plusieurs dizaines d'espèces. Cet arbre, qui fait partie de la famille des Fabacées (Légumineuses), peut atteindre entre 25 et 40 mètres de hauteur et peut vivre plusieurs centaines d'années.

L'oléorésine de copaïba également appelée huile ou baume de copahu, est un fluide résineux directement extrait de l'arbre par forage du tronc. Cette oléorésine est composée chimiquement de sesquiterpènes en très grande majorité, et de quelques diterpènes, qui sont tous deux des hydrocarbures formés à partir d'unités isoprènes. Certains de ses composés sont volatils comme le  $\beta$ -caryophyllène qui est le composé présent à la plus haute concentration.

Utilisée dans la médecine traditionnelle principalement au Brésil, l'oléorésine de copaïba eut une importance considérable aux XVIII et XIXème siècles dans la pharmacopée européenne, pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques, notamment dans le traitement de la blennorragie. Ce travail a donc permis de présenter l'oléorésine de copaïba, d'étudier ses propriétés antibactériennes suite aux tests mis en place, et de s'interroger sur les domaines d'utilisation possibles. Les tests antibactériens sur gélose et en milieu liquide ont permis de confirmer les propriétés antibactériennes de l'oléorésine de copaïba sur une bactérie gram positif *Bacillus subtilis*. Ces propriétés sont conservées lorsque l'oléorésine est micro-encapsulée ou est incorporée voire enduite sur des films plastiques.

L'oléorésine peut donc servir comme conservateur dans certaines préparations cosmétiques, ou être ajoutée à des matériaux d'emballage comme le plastique pour créer des emballages actifs. Un emballage actif est capable d'interagir avec le produit qu'il contient afin d'améliorer sa durée de vie et sa sûreté, en luttant par exemple contre l'oxydation, l'humidité ou la contamination bactérienne. Il est donc possible d'emballer des aliments ou des dispositifs médicaux difficilement stérilisables dans des emballages

actifs afin qu'ils soient protégés contre la contamination bactérienne. Cependant une étude précise doit avoir lieu sur la cinétique de libération de l'oléorésine de copaïba, incorporée sous forme libre ou micro-encapsulée dans les films plastiques, afin de garantir une activité antibactérienne constante dans le temps.

De plus, l'oléorésine possède de nombreuses propriétés pharmacologiques décrites dans la littérature, comme des propriétés anti-inflammatoires, immunomodulatrices, cicatrisantes, anticancéreuses, gastroprotectrices... Des études précliniques présentent également des résultats très prometteurs pour le traitement par exemple du psoriasis ou de la leishmaniose. Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau qui se caractérise par l'apparition d'épaisses plaques sur certaines zones de peau qui desquament. Cette maladie auto-immune évolue généralement par cycles. L'oléorésine de copaïba réduit le recrutement des leucocytes et leur activation lors de l'inflammation. Cette activité anti-inflammatoire est liée à l'inhibition de la translocation nucléaire de NF-kB (*nuclear factor-kappa B*), une protéine de la super-famille des facteurs de transcription, impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire, et par conséquent l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

L'oléorésine de copaïba, une source renouvelable, durable et respectueuse de l'environnement, peut être à l'origine de la conception de nouveaux traitements en vue de ses nombreuses propriétés intéressantes. Cependant, la variabilité chimique de cette oléorésine entre les espèces ainsi qu'au sein d'une même espèce de *Copaifera*, et le manque de standardisation de ces oléorésines ont présenté des obstacles à leur plus large commercialisation. La mise en place d'extraits standardisés issus de l'oléorésine de copaïba semble être indispensable pour le développement de nouveaux produits thérapeutiques. L'utilisation de l'huile issue de la graine de copaïba ou des extraits hydro-alcooliques issus des feuilles de cet arbre présente une alternative possible à étudier.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 16/12/2014

LE DOYEN



Pr. Christophe RIBUOT

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Dr. Serge KRIVOBOK

## Bibliographie

1. Goetz P, Ghédira K. *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer Science & Business Media; 2012. 385 p.
2. Fleury M. À propos de l'intérêt médicinal du baume de Copahu. *Acta Bot Gallica*. 1997; **144** : 473–9.
3. Costa JA. A new combination in the genus *Copaifera* (Leguminosae). *Neodiversity*. 2009; **4** : 14–5.
4. Junior V, F V, Pinto AC. The *Copaifera* L. genus. *Quím Nova*. 2002; **25** : 273–86.
5. Brandt W, Gürke M, Köhler FE, Pabst G, Schellenberg G, Vogtherr M. *Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem*. Gera-Untermhaus; 1890. 738 p.
6. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens P. *Botanique systématique: Une perspective phylogénétique*. De Boeck Supérieur; 2002. 1428 p.
7. Moquin-Tandon A. *Elements de botanique médicale*. Librairie J. - B. Baillière et Fils; 1861. 572 p.
8. Newton P, Watkinson AR, Peres CA. Determinants of yield in a non-timber forest product: *Copaifera* oleoresin in Amazonian extractive reserves. *For Ecol Manag*. 2011; **261** : 255–64.
9. Projet de reforestation Munduruku. Disponible sur : [http://www.aquaverde.org/reforestation\\_munduruku/](http://www.aquaverde.org/reforestation_munduruku/) [consulté le 17 Oct 2014]
10. Da Silva Medeiros R, Vieira G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. *For Ecol Manag*. 2008; **256** : 282–8.
11. Martins K, Herrero-Jáuregui C, da Costa P, Tonini H, de M. Bentes-Gama M, Vieira AH, et al. Interspecific differences in the oleoresin production of *Copaifera* L. (Fabaceae) in the Amazon rainforest. *Ann For Sci*. 2013; **70** : 319–28.
12. Gelmini F, Beretta G, Anselmi C, Centini M, Magni P, Ruscica M, et al. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *Int J Pharm*. 2013; **440** : 170–8.
13. Kobayashi C, Fontanive TO, Enzweiler BG, de Bona LR, Massoni T, Apel MA, et al. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. *Pharm Biol*. 2011; **49** : 306–13.
14. Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne a comparative study. *J Ethnopharmacol*. 2007; **112** : 248–54.

15. Leandro LM, de Sousa Vargas F, Barbosa PCS, Neves JKO, da Silva JA, da Veiga-Junior VF. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. *Molecules*. 2012; **17** : 3866–89.
16. Curio M, Jacone H, Perrut J, Pinto ÂC, Filho VFV, Silva RCB. Acute effect of *Copaifera reticulata* Ducke copaiba oil in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *J Pharm Pharmacol*. 2009; **61** : 1105–10.
17. Izumi E, Ueda-Nakamura T, Veiga-Júnior VF, Nakamura CV. Toxicity of oleoresins from the genus *Copaifera* in *Trypanosoma cruzi*: a comparative study. *Planta Med*. 2013; **79** : 952–8.
18. Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J Ethnopharmacol*. 2007; **109** : 486–92.
19. Zimmermam-Franco DC, Bolutari EB, Polonini HC, do Carmo AMR, das Graças A. M. Chaves M, Raposo NRB. Antifungal Activity of *Copaifera langsdorffii* Desf Oleoresin against Dermatophytes. *Molecules*. 2013; **18** : 12561–70.
20. Paiva LA, Rao VS, Gramosa NV, Silveira ER. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J Ethnopharmacol*. 1998; **62** : 73–8.
21. De Freitas Fernandes F, de Paula Souza Freitas E. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol*. 2007; **147** : 150–4.
22. Almeida MR, Darin JDC, Hernandez LC, de Souza Ramos MF, Antunes LMG, de Freitas O. Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. *Genet Mol Biol*. 2012; **35** : 664–72.
23. Sachetti CG, de Carvalho RR, Paumgarten FJR, Lameira OA, Caldas ED. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. *Food Chem Toxicol : Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2011; **49** : 1080–5.
24. Lima CS, de Medeiros BJL, Favacho H a. S, dos Santos KC, de Oliveira BR, Taglialegna JC, et al. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). *Phytomedicine*. 2011; **18** : 1013–23.
25. Souza Barbosa PC, Moreira Wiedemann LS, da Silva Medeiros R, de Tarso Barbosa Sampaio P, Vieira G, Florêncio da Veiga-Junior V. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. *Chem Biodivers*. 2013; **10** : 1350–60.
26. Herrero-Jáuregui C, Casado MA, das Graças Bichara Zoghbi M, Célia Martins-da-Silva R. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. *Chem Biodivers*. 2011; **8** : 674–85.
27. Oksman K, Skrifvars M, Selin J-F. Natural fibres as reinforcement in polylactic acid (PLA) composites. *Compos Sci Technol*. 2003; **63** : 1317–24.

28. Eberhart RC, Su S-H, Nguyen KT, Zilberman M, Tang L, Nelson KD, et al. Bioresorbable polymeric stents: current status and future promise. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2003; **14** : 299–312.
29. Martín Á, Varona S, Navarrete A, Cocero MJ. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *Open Chem Eng J.* 2010; **4** : 31–41.
30. Packhauser C, Seidel N, Schnieders J, Kissel T, Maretschek S. Microencapsulation Techniques for Parenteral Depot Systems and Their Application in the Pharmaceutical Industry. In. *Microencapsulation Methods and Industrial Applications*. 2ème éd. Simon Benita Informa Healthcare; 2005. ch4 p. 99–122.
31. Hotte à flux unidirectionnel. Disponible sur : <http://www.qualiflux.fr/flux-laminaire-photometre-produit-3-6-equipement-hottes-hotte-a-flux-unidirectionnel.html> [consulté le 25 Nov 2014]
32. Illergård J, Wågberg L, Ek M. Bacterial-growth inhibiting properties of multilayers formed with modified polyvinylamine. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 201; **88** : 115–20.
33. Dias D de O, Colombo M, Kelmann RG, De Souza TP, Bassani VL, Teixeira HF, et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of  $\beta$ -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. *Anal Chim Acta.* 2012; **721** : 79–84.
34. Pieri FA, Mussi MCM, Fiorini JE, Moreira MAS, Schneedorf JM. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J.* 2012; **23** : 36–8.
35. Pacheco T, Barata L, Duarte M. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp) balsams. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai.* 1997; **8** : 123-124
36. Santos AOD, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; **103** : 277–81.
37. Santos RCV, dos Santos Alves CF, Schneider T, Lopes LQS, Aurich C, Giongo JL, et al. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. *J Invertebr Pathol.* 2012; **109** : 265–8.
38. Dos Santos AO, Ueda-Nakamura T, nia, Dias Filho BP, da Veiga Junior VF, ncio, et al. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012 : 898419.
39. Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol.* 2008; **120** : 204–8.
40. Soares DC, Portella NA, Ramos M, S nica F de, Siani AC, Saraiva EM. Trans -B-Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013 : 761323.

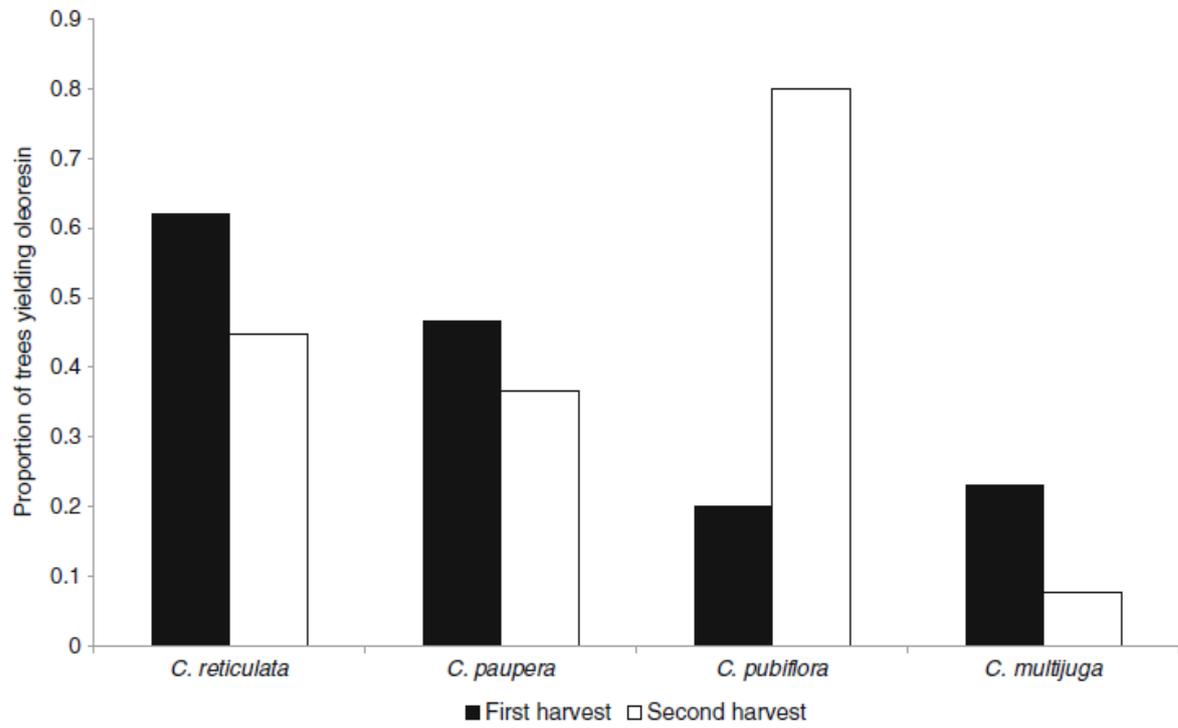
41. Dos Santos AO, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, da Veiga-Junior VF, Nakamura CV. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013; **108** : 59–64.
42. Dos Santos AO, Costa MA, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, da Veiga-Júnior VF, de Souza Lima MM, et al. *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Exp Parasitol*. 2011; **129** : 145–51.
43. Geris R, Silva IG da, Silva HHG da, Barison A, Rodrigues-Filho E, Ferreira AG. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2008; **50** : 25–8.
44. Silva HHG da, Geris R, Rodrigues Filho E, Rocha C, Silva IG da. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; **40** : 264–7.
45. Lima SRM, Junior VFV, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. In vivo and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. *Phytother Res PTR*. 2003; **17** : 1048–53.
46. Senedese JM, Alves JM, Lima IM de S, de Andrade EAP, Furtado RA, Bastos JK, et al. Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1,2-dimethylhydrazine-induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. *BMC Complement Altern Med*. 2013; **13** : 3.
47. Guimarães-Santos A, Santos DS, Santos IR, Lima RR, Pereira A, de Moura LS, et al. Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012 : 918174.
48. Dias DS, Fontes LBA, Crotti AEM, Aarestrup BJV, Aarestrup FM, da Silva Filho AA, et al. Copaiba Oil Suppresses Inflammatory Cytokines in Splenocytes of C57Bl/6 Mice Induced with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). *Molecules*. 2014; **19** : 12814–26.
49. Paiva L a. F, de Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VSN. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytother Res PTR*. 2002; **16** : 737–9.
50. Estevão LRM, Medeiros JP de, Baratella-Evêncio L, Simões RS, Mendonça F de S, Evêncio-Neto J. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. *Acta Cir Bras*. 2013; **28** : 863–9.
51. Yasojima EY, Teixeira RKC, Houat A de P, Costa FL da S, Silveira EL, Brito MVH, et al. Effect of copaiba oil on correction of abdominal wall defect treated with the use of polypropylene/polyglecaprone mesh. *Acta Cir Bras*. 2013; **28** : 131–5.
52. Nogueira Neto J, Lindoso MJ de S, Coelho LF, Carvalho RAF, Rodrigues TGP de M, Araújo AGP de, et al. Changes in the volume and histology of endometriosis foci in rats treated with copaiba oil (*Copaifera langsdorffii*). *Acta Cir Bras*. 2011; **26**: 20–4.

53. Botelho NM, Silveira EL, Lopes LN, Santos FAF, Teixeira RKC, Silva TT da, et al. Copaiba oil effect under different pathways in mice subjected to sepsis. *Acta Cir Bras.* 2014; **29** : 528–31.
54. Paiva L a. F, Gurgel LA, Campos AR, Silveira ER, Rao VSN. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Sci.* 2004; **75** : 1979–87.
55. Paiva L a. F, Gurgel LA, De Sousa ET, Silveira ER, Silva RM, Santos FA, et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2004; **93** : 51–6.
56. De Lima Silva JJ, Guimarães SB, da Silveira ER, de Vasconcelos PRL, Lima GG, Torres SM, et al. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg.* 2009; **33** : 104–9.
57. Dias-da-Silva MA, Pereira AC, Marin MC, Salgado MA. The influence of topic and systemic administration of copaiba oil on the alveolar wound healing after tooth extraction in rats. *J Clin Exp Dent.* 2013; **5** : 169–73.
58. Souza AB, Souza MGM de, Moreira MA, Moreira MR, Furtado NAJC, Martins CHG, et al. Antimicrobial Evaluation of Diterpenes from *Copaifera langsdorffii* Oleoresin Against Periodontal Anaerobic Bacteria. *Molecules.* 2011; **16** : 9611–9.
59. Da Silva AG, Puziol P de F, Leitao RN, Gomes TR, Scherer R, Martins MLL, et al. Application of the essential oil from copaiba (*Copaifera langsdori* Desf.) for acne vulgaris: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Altern Med Rev J Clin Ther.* 2012; **17** : 69–75.
60. Campos CA, Gerschenson LN, Flores SK. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol.* 2011; **4** : 849–75.
61. Kuorwel KK, Cran MJ, Sonneveld K, Miltz J, Bigger SW. Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films. *J Food Sci.* 2011; **76** : 164–77.
62. Laura Sánchez-González MV. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: *Food Engineering Reviews.* 2011; **3** : 1–16.

## Annexes

### Annexe 1 :

Proportion d'arbres productifs à la première et à la seconde récoltes (*C. reticulata* n = 29 ; *C. paupera* n = 30 ; *C. pubiflora* n = 10 ; et *C. multijuga* n = 13) (11).



## Annexe 2 :

### Identification et caractérisation par GC-MS de la fraction volatile de l'oléorésine issue de *Copaifera langsdorffii* Desf (12).

GC-MS analysis of *C. langsdorffii* Desf. essential oil: peak identification, and area percentage.

Compounds	R.T. (min)	%	Compounds	R.T. (min)	%
3-Octene, (Z)-	3.050	0.32	Isolongifolene, 4,5-dehydro	20.312	0.13
3-Octene, (E)-	3.168	1.05	β-Guaiene	20.397	0.24
Unidentified paraffin	3.259	0.15	Cuparene	20.667	0.48
4-Octene, (Z)-	3.296	0.68	Isocaryophyllene	20.842	1.63
(+)-Cyclosativene	16.365	5.02	β-Selinene	21.145	5.01
α-Copaene	16.560	0.57	α-Selinene	21.422	2.57
τ-Gurjunene	16.753	0.14	α-Himachalene	21.901	11.17
α-Farnesene	16.879	0.58	Isolongifolene, 4,5,9,10-dehydro-	22.532	0.21
β-Elemene	17.027	5.06	β-Chamigrene	22.987	0.14
Di- <i>epi</i> -α-cedrene	17.426	0.16	Caryophyllene oxide	23.264	0.52
δ-Selinene	17.664	1.42	Diepicedrene-1-oxide	24.915	0.17
α-Longipinene	17.906	1.22	Aromadendrene oxide-(2)	25.254	1.09
α-Santalene	18.151	0.27	α-Elemene	25.848	0.39
β-Caryophyllene	18.270	5.47	Longipinocarveol, <i>trans</i> -	26.555	0.14
α-Bergamotene	18.771	48.38	Ledene oxide-(II)	27.841	0.12
Cedrene	18.976	0.37	τ-Himachalene	28.267	0.13
Bergamotol, <i>Z</i> -α- <i>trans</i> -	19.111	0.60	Unidentified sesquiterpene	28.721	0.20
<i>epi</i> -β-Santalene	19.277	0.76	(-)-Spathulenol	29.449	0.11
β-Farnesene	19.386	1.01	Dehydroabietic acid methyl ester	59.429	0.13
α-Humulene	19.704	1.67	Abietic acid, methyl ester	61.398	0.34

### Identification et caractérisation par GC-MS de la fraction non volatile de l'oléorésine issue de *Copaifera langsdorffii* Desf (12).

GC-MS analysis of *C. langsdorffii* Desf. OR-PF: peak identification, and area percentage.

Compounds	R.T. (min)	%	Compounds	R.T. (min)	%
1-Hexene, 4-methyl-	3.196	0.29	β-Humulene	29.572	0.79
Heptane, 2,4-dimethyl-	3.602	5.03	Scleral	30.729	4.58
β-Clavene	16.662	0.39	Androst-5-en-4-one,	40.977	0.67
δ-Selinene	17.427	0.30	Androstan-17-one, 3-ethyl-3-hydroxy-(5a)-	41.177	0.15
Longifolene-(V4)	17.649	0.44	Gibberellic acid	41.468	0.40
Alloaromadendrene	17.834	0.26	Isopimaric acid	41.734	1.48
Caryophyllene-(I3)	18.096	1.08	Pentadecanoic acid, 13-methyl-	41.777	1.51
<i>n.i.</i> sesquiterpene	19.349	0.79	Pimarinal	43.313	0.20
Cyperene	19.616	0.93	Abietic acid	43.744	0.58
β-Guajene	20.110	1.07	13-Isopimaradiene	44.562	0.21
τ-Selinene	20.365	2.14	Kaur-16-ene	44.677	1.57
τ-Muurulene	20.478	1.97	Sclarene	45.880	0.54
Cuparene	20.622	1.04	Biformene	46.566	0.39
Cadinene	20.947	2.65	Ent kaur-16-ene	46.833	0.46
β-Selinene	21.350	1.72	Cembrene	47.370	0.16
Elixene	21.454	1.24	8,11-Octadecadienoic acid	49.382	1.54
Germacrene B	21.901	3.38	Elaidic acid	49.727	0.55
α-Himachalene	22.631	0.88	Sclareol	50.685	0.46
α-Gurjunene	22.943	0.67	labd-7-en-15-Oic acid	54.757	7.15
β-Chamigrene	23.232	2.31	<i>n.i.</i> labdane	55.328	0.25
Cubenol	24.148	0.46	labd-7-en-15-Oic acid	55.995	0.47
<i>n.i.</i> sesquiterpenol	25.723	2.32	Copalic acid isomer A	58.249	0.81
(-)-Caryophyllene-(I1)	26.152	0.71	Copalic acid	59.441	22.15
Isoaromadendrene epoxide	26.297	0.31	Valencene	60.111	3.36
β-Eudesmene	27.026	0.65	Pimaric acid	60.531	1.80
Eudesma-4(14),11-diene	27.975	1.53	Daniellic acid	61.313	5.38
τ-Eudesmol	28.645	0.21	Lambertinic acid	62.496	2.15
Calarene epoxide	28.952	0.57	Kauran-19-oic acid	63.348	1.08
<i>n.i.</i> sesquiterpene	29.346	2.14	labd-8(20)-ene-15,18-Dioic acid, dimethyl ester	65.802	1.67

*Faculté de Pharmacie,  
Université Joseph Fourier Grenoble I.*



# **Serment de Galien**



**« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».**

Maroi MAHROUS

## PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES DE L'OLÉORÉSINE NATURELLE DE COPAÏBA ET TESTS ANTIBACTÉRIENS

**RÉSUMÉ :** Utilisée dans la médecine traditionnelle depuis plusieurs siècles, l'oléorésine de copaïba, est un fluide résineux directement extrait par forage du tronc de l'arbre *Copaifera* qui pousse dans l'ensemble des zones tropicales d'Amérique Latine et d'Afrique de l'Ouest. Elle présente de nombreuses propriétés pharmacologiques comme anti-inflammatoires, immunomodulatrices, cicatrisantes, anticancéreuses, gastroprotectrices. Cette oléorésine est chimiquement composée en majorité de sesquiterpènes comme le  $\beta$ -caryophyllène qui est le composé dominant, et de quelques diterpènes.

Après la caractérisation par GC-MS d'une oléorésine de copaïba commerciale venant du Brésil, l'oléorésine a été étudiée sous forme libre ou micro-encapsulée sur des films plastiques. Des tests antibactériens sur gélose et en milieu liquide ont mis en évidence des propriétés antibactériennes de l'oléorésine de copaïba sur une bactérie gram positif *Bacillus subtilis*. Ses propriétés sont bien conservées lorsqu'elle est micro-encapsulée, incorporée ou enduite sur des films plastiques.

L'oléorésine de copaïba pourrait donc être utilisée dans des nombreux domaines, aussi bien thérapeutiques (pour traiter par exemple la leishmaniose et le psoriasis), qu'en tant que conservateur dans les cosmétiques ou les emballages actifs.

**Abstract:** Used in traditional medicine for centuries, copaiba oleoresin, is a resinous fluid directly extracted by drilling the *Copaifera* tree trunk, which grows in all tropical areas of Latin America and West Africa. It has many pharmacological properties such as being anti-inflammatory, immunomodulating, wound healing, cancer, gastroprotective. This oleoresin is chemically composed mainly of sesquiterpenes such as  $\beta$ -caryophyllene which is the dominant compound, and some diterpenes.

After GC-MS characterization of commercial copaiba oleoresin from Brazil, the oleoresin was tested free, micro-encapsulated or incorporated in plastic films. Antibacterial tests on solid and liquid media showed antibacterial properties of copaiba oleoresin on gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis*. These properties were retained when the oleoresin is microencapsulated, incorporated or coated on plastic films.

Because of its pharmacological properties, Copaiba oleoresin could be used in different areas as therapeutic (e.g. to treat leishmaniasis, psoriasis) or as preservative in cosmetics or active packaging.

**LES MOTS CLÉS :** Oléorésine, Copaïba, *Copaifera*, Antibactérien, Propriétés, Pharmacologie

**ADRESSE :** 6 allée des Lys, 38420 Domène. mahrous6@gmail.com

**FILIÈRE :** Officine