



جمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجية الخلوية و الجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie/Nutrition Moléculaire et Santé

Intitulé :

**Corrélation entre le contenu polyphénolique et l'activité
antioxydante et antimicrobienne *in vitro* de *Curcuma longa* L**

Présenté et soutenu par :

Le : 21 / 05 / 2017

SEGGANI Soraya ET BOUKEHIL Houda

Jury d'évaluation:

Président du jury: Mme MECHAKRA Aicha

Rapporteur: Mme MOUAS Toma Nardjes

Examineur: Mer KITOUNI Rachid

Pr. UFM Constantine1

MCA. UFM Constantine1

MAA. UFM Constantine1

Année universitaire
2016-2017

REMERCIEMENTS

Cet humble travail de recherche n'aurait pu être accompli, sans l'aide d'ALLAH qui nous a donné la force de l'accomplir.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance à notre promoteur, le docteur MOUAS TOMA NARDJES Maitre de Conférences « A », à l'université Frère Mentouri Constantine1, qui nous a accompagnées tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions également vivement les membres de ce jury :

Madame Mechakra. A, professeur à l'université Frères Mentouri Constantine1.

Nous sommes très honorées que vous acceptiez la présidence de notre jury, trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements, et soyez assurée de notre profonde gratitude.

Monsieur Kitouni. R, maitre assistant « A » à l'université Frères Mentouri de Constantine1, merci pour avoir accepté d'examiner notre mémoire, pour l'intérêt que vous portez à notre travail, et pour le temps consacré à son évaluation.

A toute l'équipe du laboratoire GBBV, surtout le Pr. Khelifi. D pour nous avoir accueillies dans son laboratoire.

Toutes nos salutations à tous nos collègues de la promotion Master II option Biochimie \ Nutrition Moléculaire et Santé pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble, et que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail trouve ici l'expression de nos vifs remerciements.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail premièrement à mes

*Parents, Pour votre amour, votre affection Votre soutien constant,
Et sans qui je ne serais pas arrivée jusqu'ici. Reçez ici ma profonde
gratitude pour vos innombrables sacrifices.*

*A mes chers frères et sœurs, pour votre amour, votre joie de vivre,
Vos conseils si précieux, Votre soutien et votre confiance, Je vous
remercie de tout cœur.*

A mes nièces Rayene , Rokaya, Loudjayn et Rihem.

*A mes amies Aya, Manel, Meriem et Houda pour votre fidèle
amitié et les bons moments passés ensemble tout au long de mes études et
en dehors.*

SORAYA S

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail premièrement à mes chers parents pour leurs soutient, sacrifices et tout les efforts consentis à mon éducation.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à chaque étape de ma formation.

A toute ma famille.

A mes amies Aya, Manel, Meriem et Soraya pour votre fidèle amitié et les bons moments passés ensemble tout au long de mes études et en dehors.

Que dieu vous protège et vous bénisse

HOUDA.B

LISTE DES TABLEAUX

N° DE TABLEAU	TITRE	PAGE
01	Partie souterraine et aérienne de <i>Curcuma longa</i> L.	04
02	Valeur nutritionnelle et énergétique du <i>Curcuma Longa</i> L (pour 100 g).	07
03	Structures de quelques antioxydants synthétiques.	14
04	Quelques composés phénoliques à activité antioxydante dans les épices.	20
05	Méthodes les plus couramment utilisé pour estimer le pouvoir antioxydant.	21
06	Principaux mécanismes d'action des antibiotiques.	23
07	Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne.	25
08	Les deux systèmes solvants utilisés pour la CCM sur gel de silice.	41
09	Couleurs des spots après révélations physique et chimique pour les deux systèmes solvants.	53
10	Comparaison entre les Rf des deux systèmes.	54
11	Valeurs des concentrations efficaces, activité anti radicalaire et pourcentage d'inhibition.	57
12	Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de <i>Curcuma longa</i> L à différentes concentrations.	58
13	Antibiogramme.	59
14	Comparaison des couleurs et RF obtenus avec d'autres études.	61

LISTES DES FIGURES

N° DE FIGURE	TITRE	PAGE
01	Quelques espèces de <i>Curcuma</i> source de curcumine.	3
02	Rhizomes de <i>Curcuma longa</i> L.	4
03	Port de <i>Curcuma longa</i> . Souche connue sous le nom de <i>Curcuma long</i> (en haut) et de <i>Curcuma rond</i> (en bas)	4
04	Feuilletage de <i>Curcuma longa</i> L.	5
05	Inflorescence de <i>Curcuma longa</i> L.	5
06	<i>Curcuma longa</i> , Linné	5
07	Balance radicaux libres /antioxydants.	11
08	Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.	12
09	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	12
10	Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces.	15
11	Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.	17
12	Oxydation de l'acide ascorbique.	18
13	Structure de la vitamine E.	18
14	Schéma des réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C.	18
15	Rôles attribués au GSH suite à un stress oxydant.	19
16	Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.	20
17	Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires.	20
18	Cibles bactériennes des antibiotiques.	22
19	Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques.	25
20	Structures chimiques des curcuminoïdes.	26
21	Tautomérie céto-énolique de la curcumine ; formes dicétone (en haut) et énol.	28

22	Les cibles moléculaires de la curcumine	28
23	Différentes enzymes médiatrices de l'activité antioxydante de la curcumine.	29
24	Effet de la curcumine comme piègeurs de ROS et RNS.	30
25	Site de réaction de la curcumine avec les radicaux libres.	31
26	Inhibition de la réponse immune par la curcumine.	33
27	Cibles de la curcumine impliquées dans le cancer.	34
28	Circuit ARF-p53 dans le développement des tumeurs	35
29	Les différents niveaux des cibles de signalisation oncogénique contrôlés par la curcumine.	36
30	Broyage du rhizome de <i>Curcuma longa</i> L.	38
31	Pèse de la poudre de <i>Curcuma longa</i> .	38
32	Préparation de l'ensemble pour l'extraction	38
33	Extraction par Soxhlet	39
34	Evaporation de l'extrait brut.	39
35	Pesée et conservation de l'extrait brut.	40
36	Préparation de la plaque CCM.	42
37	Migration des constituants du <i>Curcuma longa</i> L.	42
38	Visualisation des constituants colorés à l'aide de la lampe UV	43
39	Révélation des plaques avec la vanilline sulfurique.	43
40	Principe de la réduction du radical DPPH.	47
41	Préparation des dilutions pour l'activité antioxydante.	48
42	Préparation des dilutions pour l'activité antimicrobienne.	50
43	Ensemencement des souches microbiennes et application des discs sur boîtes de pétries.	52
44	Chromatographie de <i>Curcuma longa</i> L sur CCM avant et après révélation physique.	54
45	Résultat après révélation chimique.	54

46	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.	55
47	Courbe d'étalonnage de quercitrine pour le dosage des flavonoïdes.	56
48	Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.	56
49	Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait de <i>Curcuma longa</i> L.	57
50	Photos représentatives des zones d'inhibition des composés phénoliques de <i>Curcuma long</i> L.	59
51	Rendement d'extraction de quelques épices et parmi lesquelles le <i>Curcuma longa</i> L.	60
52	Résultats de l'analyse chromatographiques (CCM) de l'extrait du rhizome de <i>Curcuma longa</i> L.	62
53	Comparaison des teneurs de <i>Curcuma longa</i> L en polyphénols.	63
54	Comparaison des teneurs de <i>Curcuma longa</i> L en flavonoïdes.	64
55	Activité antioxydant de l'acide ascorbique et l'extrait méthanolique de <i>Curcuma longa</i> L à différentes concentrations.	65
56	Diamètres des zones d'inhibition (mm) de <i>Curcuma longa</i> L sur les différentes souches.	66

LISTE DES ABREVIATIONS

•OH	: Radical libre hydroxyle
AAPH	: 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dichloride
BHA	: Butylhydroxyanisole
BHT	: Butylhydroxytoluène
CAT	: Catalase
CI50	: Concentration inhibant 50% de l'activité
DPPH•	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle
EAO	: Espèces réactives de l'oxygène
ERO	: Espèce réactive d'oxygène
FRAP	: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
GPx	: Glutathion peroxydases
GSH	: Glutathion réduit
GSHPX	: Glutathion peroxydase
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
L•	: Lipid alkyl radicals
LO•	: Lipid alkoxy radicals
LOO•	: Lipid peroxy radicalMDA
NO	: Oxyde d'azote
NO₂	: Dioxyde d'azote
R•	: Radical d'acide gras
RO•	: Radical alkoxy
ROO•	: Radical peroxy
ROOH	: Hydroperoxyde lipidique
SOD	: Superoxyde dismutase
AlCl₃	: Chlorure d'aluminium
ARP	: Puissance anti-oxydante
CCM	: Chromatographie sur couche mince
EAG	: Equivalant en acide gallique
Rf	: rapport frontal
UV	: ultra-violet

Table des matières

Titre	
Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux	
Listes des figures	
Liste des abréviations	
Table des matières	
Introduction générale	01

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: La plante *Curcuma longa* L

I.1. Origine historique du <i>Curcuma longa</i> L.....	02
I.2. Classification systématique	03
I.3. Descriptions de la plante	04
I.4. Production et commerce international de <i>Curcuma longa</i> L.....	06
I.5. Valeur nutritionnelle et énergétique du <i>Curcuma Longa</i> L.....	06
I.6. Utilisation du <i>Curcuma longa</i> L.....	07
I.6.1. Utilisation alimentaire	07
I.6.2. Utilisation médicinale	08
I.6.3. Utilisation cosmétique	08

Chapitre II: Notion de stress oxydatif et l'activité antioxydante et antimicrobienne

II.1. Stress oxydatif	11
II.1.1. Définition	11
II.1.2. Les antioxydants	13
II.1.2.1. Définition	13

II.1.2.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique	13
II.1.2.2.1. Les antioxydants synthétiques	14
II.1.2.2.2. Les antioxydants naturels	15
II.1.2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	21
II.2. Infections bactériennes et antibiothérapie	22
II.2.1. L'antibiotique	22
II.2.1.1. Définition	22
II.2.1.2. Modes d'action des antibiotiques.....	22
II.2.2. La résistance bactérienne aux antibiotiques	24
II.2.2.1. La résistance naturel.....	24
II.2.2.2. La résistance acquise.....	24
II.2.3. Activité antimicrobienne des poly- phénols.....	25

Chapitre III: Les curcuminoïdes, métabolites secondaires du *Curcuma longa* L

III.1. Les curcuminoïdes	26
III.2. Propriétés physico-chimiques de la curcumine	27
III. 3. Activités biologiques et mécanisme d'action de la curcumine.....	28
III.3.1. Propriétés antioxydantes	29
III.3.2. Propriétés anti-inflammatoires	32
III.3.3. Propriété anticancéreuses	33
III.3.4. Propriétés antimicrobiennes	35

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I: Matériel et méthodes

I.1. Matériel d'étude.....	37
I.1.2. Matériel et produits de laboratoire.....	37
I.2. Méthodes d'études.....	37
I.2.1. Extraction.....	37

I.2.2. Etude qualitative.....	40
I.2.2.1. Chromatographie liquide sur couche mince.....	40
I.2.3. Etude quantitative	44
I.2.3.1. Dosage des poly-phénols totaux.....	44
I.2.3.2. Dosage des flavonoïdes	45
I.2.4. Etude de l'activité antioxydante.....	47
I.2.4.1. Méthode DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	47
I.2.4.1.1. Principe.....	47
I.2.4.1.2. Protocole.....	48
I.2.4.1.3. Expression des résultats.....	49
I.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	50
I.2.5.1. Principe	50
I.2.5.2. Protocole.....	50

Chapitre II : Résultats et discussions

II.1. Rendement	53
II.2. Analyse qualitative	53
II.2.1. Chromatographie liquide sur couche mince	53
II.3. Analyse quantitative.....	55
II.3.1. Dosage des poly phénols	55
II.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	55
II.4. Etude de l'activité antioxydante.....	56
II.5. Etude de l'activité antimicrobienne	58
Conclusion générale.....	68
Références bibliographiques.....	70

Annexes

Résumés

Introduction générale

Les épices font partie des plantes médicinales, considérées comme des plantes aromatiques à la saveur forte, elles sont utilisées en petite quantité en cuisine comme conservateurs, assaisonnements ou colorants. Elles peuvent provenir de différentes parties de la plante : l'écorce, les grains, les feuilles, les fruits et le rhizome **(Manandhar ., 1995)**

Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant. **(Mata et al., 2007)**

De même il s'est avéré, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés à leurs métabolites secondaires, qui sont largement utilisés en thérapeutique comme agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, diurétiques et antioxydants qui défendent contre le stress oxydatif **(Ouelbani et al., 2016)**

En dehors des plantes médicinales classiques, souvent officinales, connues et utilisées depuis plus ou moins longtemps, il reste encore beaucoup à faire pour dresser l'inventaire complet des espèces susceptibles d'applications thérapeutiques, il faudra étudier toutes les plantes utilisées en médecine populaire indigène surtout en Algérie où les épices bien que très prisées dans le domaine culinaire restent peu connues et utilisées dans la thérapeutique **(Bourgaud et al., 2001)** . Pour cela, nous apportons notre contribution sur la plante <<*Curcuma longa L*>>, c'est un axe qui s'intéresse à la valorisation d'une plante à caractère médicinal.

Ainsi, nous nous sommes proposé de caractériser qualitativement et quantitativement les poly-phénols qui peuvent être contenus dans cette plante et l'évaluation de leurs activités antioxydante et anti microbienne *in vitro*. A cet effet, notre présent travail s'est scindé en trois parties :

- La première partie sous forme d'une synthèse bibliographique qui regroupe les principales informations sur le *Curcuma longa L* et ses métabolites secondaires.
- La seconde partie, porte sur le matériel biologique et la méthodologie de travail.
- Les principaux résultats obtenus et leurs discussions, sont présentés dans le troisième chapitre.
- Nous achevons notre écrit par une conclusion sur l'ensemble des informations et résultats obtenus dans les trois parties.

PARTIE I

Etude bibliographique

CHAPITRE I

la plante Curcuma longa L

I.1. ORIGINE HISTORIQUE DU *CURCUMA LONGA* L

Le *Curcuma longa* L, est une épice qui fait l'objet d'échanges commerciaux depuis tellement longtemps, qu'on ne peut déterminer avec certitude son origine. On pense cependant qu'il vient du Sud ou du Sud -Est de l'Asie, peut-être plus spécifiquement de l'Inde, d'où il se serait répandu dans toute l'Asie, de même qu'au Proche et au Moyen-Orient, il y a des milliers d'années. **(Penso et al., 1986)**

Il ne se trouve pas dans un état véritablement sauvage, mais il semble s'être naturalisé dans certaines régions. C'est un triploïde stérile et on pense qu'il est apparu par sélection continue et multiplication végétative d'un hybride entre le curcuma sauvage diploïde (*Curcuma aromatica* Salisb., originaire de l'Inde, du Sri Lanka et de l'est de l'Himalaya) et un autre *Curcuma* tétraploïde apparenté.

Depuis 4000 ans, le *Curcuma longa* L est important dans la culture védique, on retrouve sa trace dans des écrits sanskrits ; et dans la médecine ayurvédique (médecine holistique qui étudie empiriquement les effets de l'alimentation sur la santé). **(Perry et al., 2008)**

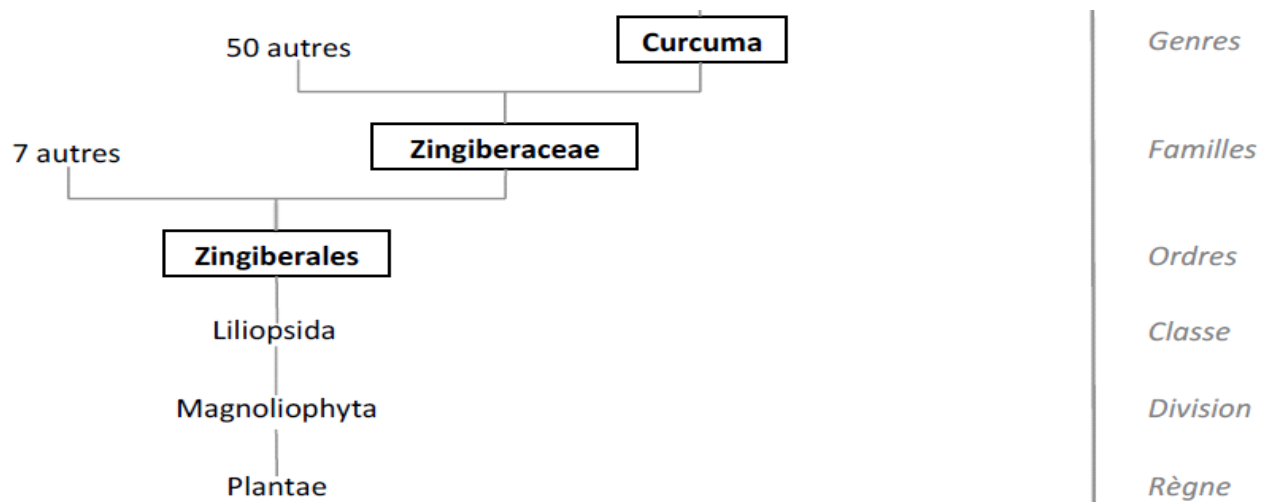
En Europe, les moines font mention de la plante, introduite par les navigateurs, dans leurs écrits dès le 6^{ème} siècle. **(Delaveau., 1987)**

- Connu en Chine depuis le 7^{ème} siècle.
- Connu en Afrique de l'Est depuis le 8^{ème} siècle.
- Connu en Afrique de l'Ouest depuis le 13^{ème} siècle.
- Ramené en Europe en 1298 par Marco Polo qui le découvre en Chine et par les arabes au 13^{ème} siècle.

Quand à son utilisation médicinale ; Nicolas Lémery, médecin et chimiste français, estime cette *terra mérita* comme « apéritive, capable de lever les obstructions du foie, de la ratte, pour la jaunisse, pour la néphrétique » dans le dictionnaire ou traité universel des drogues simples de 1716. **(Delaveau., 1987)**

I.2. CLASSIFICATION SYSTEMATIQUE

Le genre *Curcuma*, selon la classification APG III (Angiospermes Phylogénie Group) appartient à :



Classification phylogénétique du végétal *Curcuma* (Jayaprakasha et al., 2005).

D'après la classification phylogénique il existe de nombreuses espèces de curcuma :



Figure 1 : Quelques espèces de *Curcuma* source de curcumine (Shishodia et al., 2005)

Sur le marché, le *Curcuma longa* L est distribué et commercialisé sous différentes appellations



- **Arabe:** الكركم (al-kourkoum).




-**Français** : rhizome de curcuma

I.3. DESCRIPTION

En apparence, le *Curcuma longa* L est une plante vivace, herbacée avec une envergure pouvant atteindre un mètre Tableau 1.

Tableau 1 : Partie souterraine et aérienne de *Curcuma longa* L

<p>A-Rhizome</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tubéreux et très ramifié, comestible semblable au gingembre • La chair est jaune à orange vif à l'intérieur attribuée à la présence de curcumine avec une odeur épicée rappelant celle de la mangue. • La peau est fine et brun clair. 	 <p>Figure 2: Rhizomes de <i>Curcuma longa</i> L. (Boullard., 2001)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Les rhizomes principaux de forme ovoïde fournissent le curcuma rond (2,5 à 7,5 cm de longueur et 1 à 2 cm de diamètre) ; et les secondaires le curcuma long (« les doigts » qui font à leur maturité 5 à 10 cm de longs et 1 à 1,5 cm de diamètre). (Delaveau., 1987) 	 <p>Figure 3:Port de <i>Curcuma longa</i>. Souche connue sous le nom de curcuma long (en haut) et de curcuma rond (en bas). (Boullard., 2001)</p>

<p>B- FEUILLES</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Très longues, oblongues à elliptiques, engainantes, possèdent une puissante nervure axiale et des nervures secondaires parallèles • Les gaines des feuilles forment une pseudo tige courte, les limbes sont vert foncé au-dessus, vert très clair en dessous, criblés de points translucides • Le limbe mesure de 7 à 70 cm de long et 3 à 18 cm de large. (Boullard., 2001) 	 <p>Figure 4 : Feuilletage de <i>Curcuma longa</i> L. (Grugeau., 1995)</p>
<p>C-FLEURS</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tige longue, inflorescence sortant du cœur des feuilles de 12 à 20cm contenant beaucoup de fleurs. • Couleurs de fleurs : blanche. • Période de floraison : de mai à septembre. • Floraison non parfumée. • Possèdent : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Un calice tubulaire court présent 3 dents inégales ✓ Une corolle tubulaire à sa base, puis divisée en 3 lobes jaunes inégaux ✓ Un ovaire infère, trilobulaire, surmonté d'un style terminé par un stigmate simple et en crochet. (Itokawa et al., 2008) 	 <p>Figure5 : Inflorescence de <i>curcuma longa</i> L.</p>  <p>Figure6 : <i>Curcuma longa</i>, Linné</p>

I.4. PRODUCTION ET COMMERCE INTERNATIONAL

Le *Curcuma longa* L, entre dans le commerce international essentiellement sous la forme de rhizomes entiers séchés. Le commerce de poudre de curcuma est moins important que jadis. (Jansen et al., 2005)

En 2003, l'Inde est le plus gros producteur, avec 400 000 t sur 130 000 ha, et domine le commerce international qui est estimé à 20 000 t par an.

On compte parmi les autres pays producteurs d'Asie le Bangladesh, le Pakistan, le Sri Lanka, Taïwan, la Chine, le Myanmar et l'Indonésie.

Il est aussi cultivé dans les Caraïbes, ainsi qu'en Amérique centrale et du Sud, la Jamaïque, Haïti et le Pérou étant les principaux pays producteurs. (Jansen et al., 2005)

Tous les producteurs asiatiques sont aussi de gros consommateurs et certains sont même des importateurs nets, alors que les pays non asiatiques exportent la plus grande partie de leur production. (Jansen et al., 2005)

Les principaux importateurs sont l'Iran, le Sri Lanka, la plupart des pays du Proche-Orient et l'Afrique du Nord.

I.5. VALEUR NUTRITIONNELLE ET ENERGETIQUE DU *CURCUMA LONGA* L

Le tableau suivant résume la valeur nutritionnelle et énergétique calculée pour 100 g de poudre de rhizome de *Curcuma longa* L et qui est de 354 kcal, ce qui représente en moyenne 11.42 % des besoins journaliers d'un adulte.

Tableau 2 : Valeur nutritionnelle et énergétique du *Curcuma Longa L*
(Pour 100 g) (Shahid., 2016)

Énergie	354 kca	Minéraux		Vitamines	
Eau	11,36 g	Calcium	183 mg	Vit B1	0,15 mg
Protéine	7,83 g	Cuivre	603 mg	Vit B2	0,23 mg
Sucre	3,21 g	Fer	41,42mg	Vit B3	5,14mg
Fibre	21,10 g	Magnésium	193 mg	Vit B6	1,80mg
Acides gras		Manganèse	7,8 mg	Vit B9	39 mg
Omega 9	3,12 g	Phosphore	268 mg	Vit C	26 mg
Omega 3	0,48 g	Potassium	2525 mg	Vit E	3,1 mg
Omega 6	1,69 g	Curcumine	3888 mg	Vit K	13,4mg

I.6. UTILISATION DU *CURCUMA LONGA L*

I.6.1. Utilisation alimentaire

Dans l'industrie agroalimentaire, l'intérêt du *Curcuma* porte sur ses propriétés aromatiques, colorant alimentaire jaune industrie E.100, et de conservation.

En 1980, la direction de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes en France a autorisé la coloration artificielle par la curcumine des articles suivants : « moutardes, beurre, Fromages, laits aromatisés, huiles, graisses (à l'exception des margarines), bouillons et potages, condiments, sauces, produits de charcuterie et salaisons, confitures, gelées, sucreries, pastillages, bonbons, glaces, pâtes de fruits, caviar, crevettes, sirops, croûtes de fromages... ». (Delaveau., 1987)

Le *Curcuma longa L* est une épice fréquemment consommée partout dans le monde. En Asie sa consommation moyenne avoisine les 1,5 g par jour et par personne ce qui représente une cuillerée à deux ajoutées dans la cuisson de plats et desserts traditionnels. Cet aliment connaît également une forte consommation en Amérique du Nord.

I.6.2. Utilisation médicinale

Le *Curcuma longa* L a fait l'objet de préparations thérapeutiques en vertu de ces propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires rapportées à travers les siècles dans différentes parties du monde.

On lui attribut même des effets thérapeutiques semblables aux classes de médicaments suivants: (Wun., 2003)

- Les médicaments anti-inflammatoires
- Antidépresseurs (Prozac)
- Chimiothérapie
- Anticoagulants (aspirine)
- Antidouleur
- Médicaments contre le diabète (Metformine)
- Médicaments contre l'arthrite
- Médicaments contre les maladies inflammatoires de l'intestin
- Médicaments contre le cholestérol (Lipitor)
- Les stéroïdes

I.6-3. Utilisation cosmétique

Le *Curcuma* a été utilisé comme un produit de beauté depuis des siècles. Il est un moyen peu coûteux et naturel de traiter plusieurs problèmes de peau, et de cheveux, il est aussi bien utilisé dans les recettes de grands-mères que dans le commerce sous forme de crèmes, masques, savons, huiles et shampooings.

❖ **L'action du *Curcuma longa* L sur la peau :**

a) Propriétés antioxydantes:

Le *Curcuma longa* L est formé d'un groupe de molécules bioactives essentielles pour garantir une bonne santé de la peau et peut aider à réduire l'apparition des taches de vieillesse et les zones sombres de l'hyperpigmentation par une inhibition du stress oxydant. **(Jenkins G., 2002.)**

- Modifiant les niveaux de glutathion. Glutathion est considéré comme un inhibiteur de la mélanine qui contrôle la production de pigments. Des niveaux plus élevés de glutathion résultent dans la peau juste, donc il a un lien direct à maîtriser l'hyperpigmentation et de réduire les taches sombres.
- 1000 milligrammes de curcuma deux fois par jour préviennent contre la formation de plaques de pigmentation sur la peau. Appliqué avec votre crème solaire ou dans votre nourriture, le curcuma protège contre l'agression des UV et le vieillissement de l'âge dû au soleil.

b) Propriétés antiseptiques, antibactériennes, antivirales :

Le *Curcuma longa* L est efficace dans le traitement de l'acné et combat les boutons et les éruptions (réduit la sécrétion d'huile par les glandes sébacées)

c) Propriétés anti-inflammatoires :

Les inflammations peuvent avoir plusieurs formes comme l'acné, l'eczéma et le psoriasis. Hautement anti-inflammatoire, le *Curcuma* est un allié idéal pour apaiser ces peaux sensibles. .

❖ **L'action du *Curcuma* sur les cheveux**

a) Traitement des pellicules

Les pellicules sont une manifestation d'un trouble de la formation de l'épiderme. Les cellules du cuir chevelu se renouvellent trop rapidement et l'huile présente sur le cuir chevelu forme un amas de cellules qui n'ont pas eu le temps de se

dessécher progressivement. Cette affection du cuir chevelu s'accompagne le plus souvent de démangeaisons désagréables.

Le *Curcuma longa* L purifie naturellement le cuir chevelu et limite les manifestations des pellicules en stimulant la circulation sanguine au niveau du cuir chevelu (**Turbide., 2013**).

b) Soins capillaires pour lutter contre la perte de cheveux

La chute des cheveux peut être causée par une mauvaise alimentation, un stress, un trouble hormonal, l'hérédité ou bien une maladie.

Selon une étude coréenne (Biospectrum Life Science Institute), la curcumine, un composant actif du *Curcuma*, serait capable d'inhiber l'activité du TGF Bêta 1 empêchant ainsi la chute des cheveux. Le TGF Bêta 1 ('transforming growth factor beta 1' en anglais), est un facteur de croissance qui semble jouer un rôle dans la mort des follicules pileux ainsi que de la chute des cheveux (**Turbide., 2013**).

c) Coloration naturelle des cheveux

La teinte jaune orangée du curcuma est utilisée pour teindre les textiles et vêtements. Mais on peut l'employer aussi comme colorant naturel pour les cheveux. La poudre de curcuma peut être combinée avec un infusé préparée avec d'autres épices et fleurs de couleur jaune comme le safran, le calendula ou la camomille ou même avec de l'henné. (**Gupta et al, 2013**).

CHAPITRE II

Notion de stress oxydatif

et l'activité anti-oxydante

et antimicrobienne

II.1. STRESS OXYDATIF

Le stress oxydant est de plus en plus reconnu par la société scientifique comme un facteur important intervenant dans la genèse de maladies chroniques et inflammatoires. (Young et al., 2001)

II.1.1. Définition

L'oxygène est un gaz fondamental à la vie, il est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et impliqué dans la majorité des réactions chimiques de l'organisme. Ce processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait car 2 à 5% de l'oxygène sont transformés en espèces réactives oxygénées (ERO). (Pincemmail et al., 2001)

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants ERO ou ROS et les systèmes de défense (antioxydants), en faveur des premiers avec comme conséquence l'apparition de dégâts irréversibles pour la cellule. (Favier., 1997)



Figure 7 : Balance radicaux libres /antioxydants (Shimizu., 2004)

A concentrations plus élevées, les ROS (dont font partie les radicaux libres) peuvent en effet engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire qui se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN et de protéines, la peroxydation des lipides. Cette situation de surproduction d'espèces radicalaires est également associée à de nombreuses pathologies comme le diabète, les cancers, les maladies cardiovasculaires, ou des troubles neurologiques comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. (Valko et al., 2007)

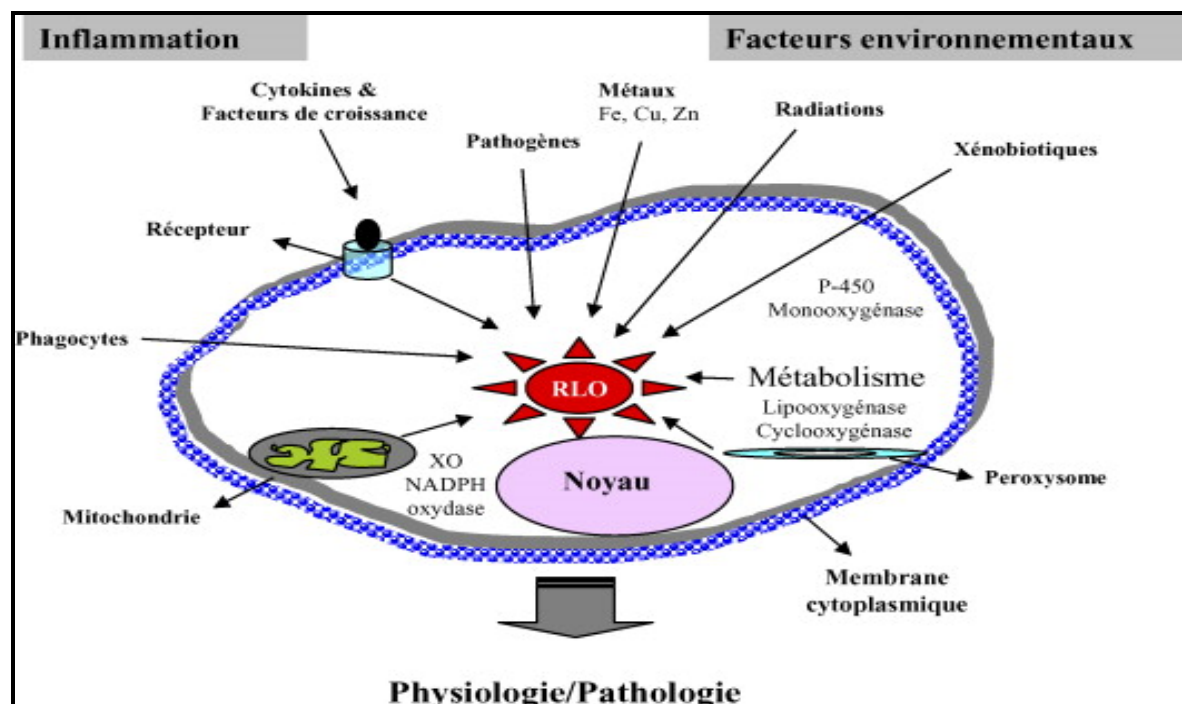


Figure 8 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène. (Afonso et al., 2007)

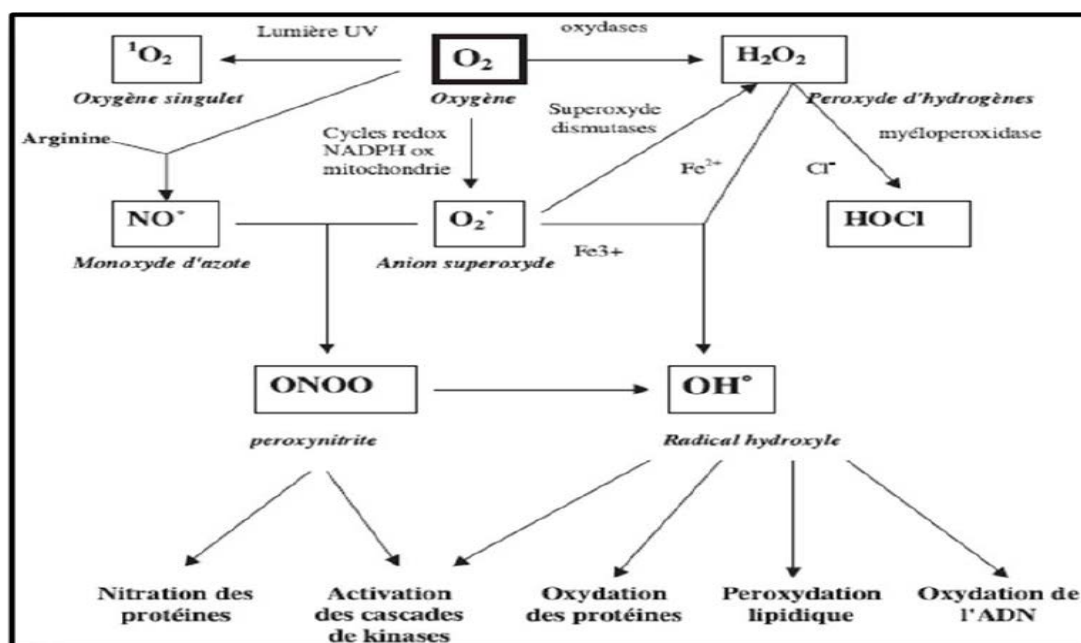


Figure 9 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie. (Favier., 2003)

II.1.2. Les antioxydants

II.1. 2.1. Définition

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit.

En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraînant ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, et stable dans le produit fini.

Les épices en générale, sont très riches en métabolites antioxydants, une revue scientifique reconnue a classé le *Curcuma* au quatrième rang parmi les 50 aliments renfermant le plus d'antioxydants. (Halvorsen et al., 2006)

II.1.2.2. Classification des antioxydants suivant la nature chimique :

Plusieurs antioxydants synthétiques et quelques composés naturels (Tocophérol, acide ascorbique, Béta-carotène) sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation.


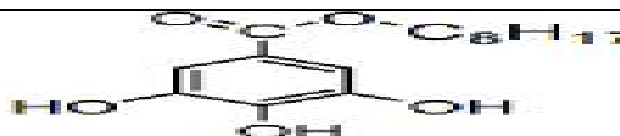
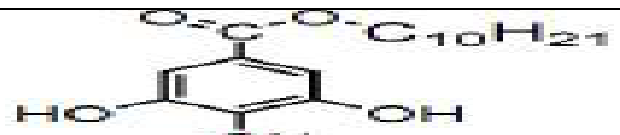
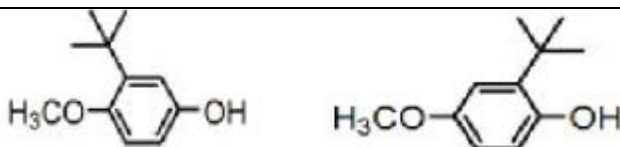

Leur présence s'avère également nécessaire au sein des produits pharmaceutiques et de cosmétiques afin d'éviter leur dégradation. Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger. La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques.

Dans la littérature, des milliers de publications ayant pour sujet les antioxydants naturels ainsi que leur effet sur l'organisme humain peuvent être consultées. (Kanoun., 2011)

II.1.2.2.1. Les antioxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels.

Tableau 3 : Structures de quelques antioxydants synthétiques. (Maamri., 2008)

Noms	Structures
Le gallate de propyle (E310) 2 isomères	
Le gallate d'octyle (E311)	
Le gallate de dodécyle (E312)	
Le butylhydroxyanisole ou BHA (E320)	
Le butylhydroxytoluène ou BHT (E321)	

En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques. Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat.

II.1.2.2. 2. Antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo*. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres. (Koechlin-ramonatxo., 2006)

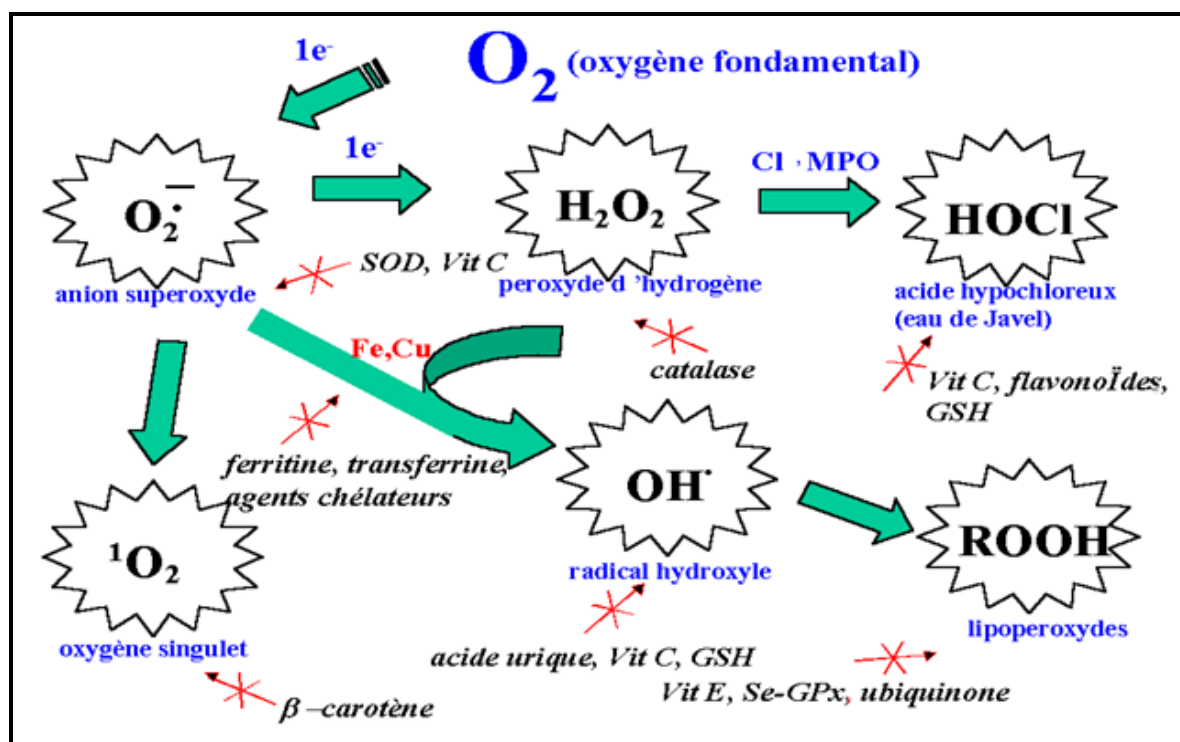


Figure 10: Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH: glutathion, Cl⁻: anion chlorure; MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathionperoxydase séléno-dépendante. (Pincemail., 1998)

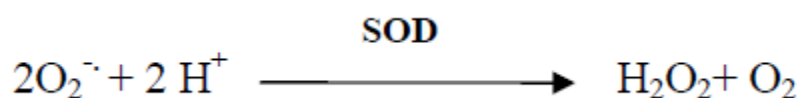
Suivant leurs modes d'actions :

a) Les antioxydants enzymatiques

- **Les superoxydes dismutases (SOD)**

La famille des superoxyde-dismutases comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxydes en espèces oxygénées moins réactives que sont H₂O₂ et O₂. (Antwerpen ., 2006)

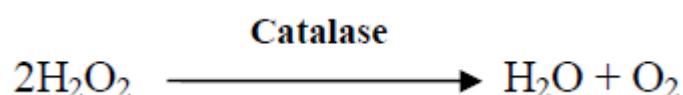
L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc. (Goudable et al., 1997)



- **Catalase**

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus mais sont particulièrement abondantes dans le foie et les globules rouges. Parmi les enzymes connues, c'est une des plus efficaces. (Delattre et al., 2005)

Les catalases permettent de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau. (Souchard et al., 2002)

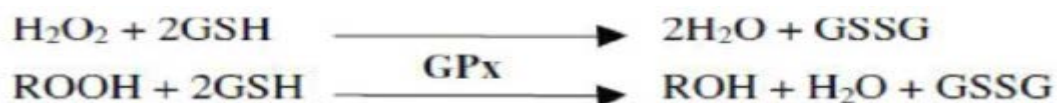


- **Glutathion peroxydase (GSHPX)**

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). (Nomura et al., 2000)

Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui

est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique. (Haleng et al., 2007)



Ces enzymes ont une vie très courte parce qu'elles s'épuisent facilement. Aussi, avec l'âge, les antioxydants ne compensent plus l'action des radicaux libres. Leur quantité diminue et l'organisme devient plus vulnérable au stress oxydatif.

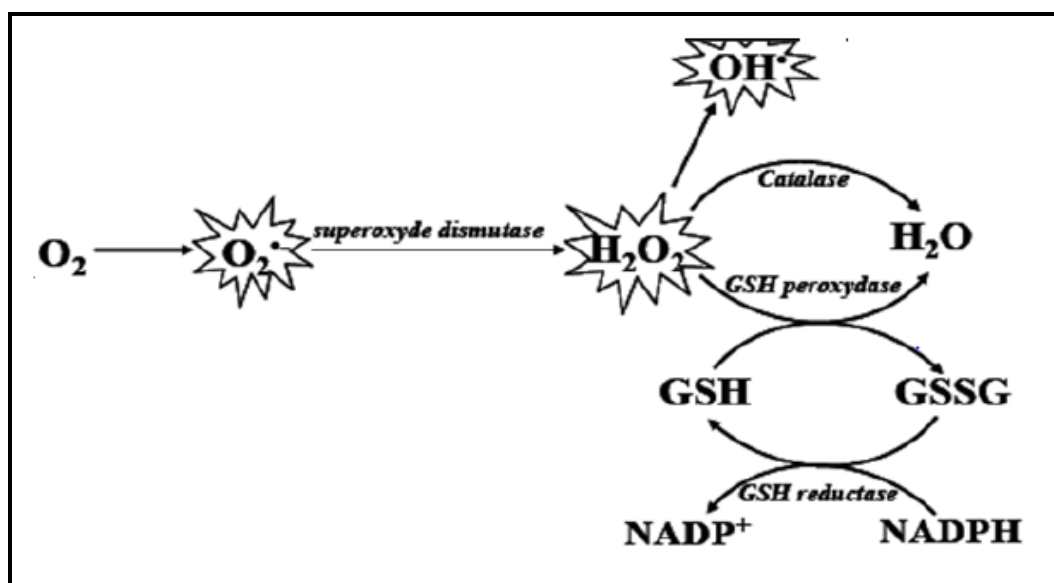


Figure 11: Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (Halliwell et al., 2007)

b) Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.

- **Vitamine C (acide ascorbique)**

Est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur la réaction avec les radicaux peroxydes aqueux, étant le radical ascorbyle.

En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et les lipoprotéines. (Matés et al., 1999)

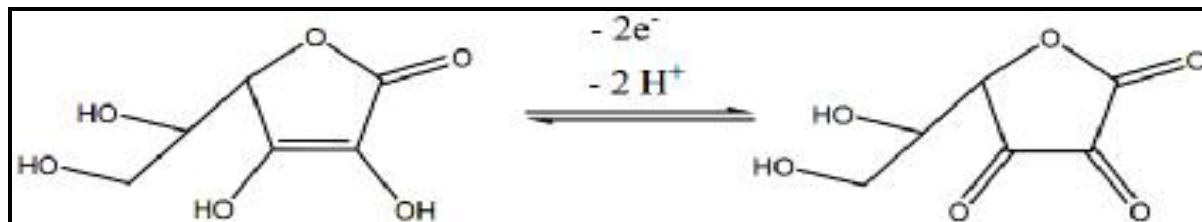


Figure12 : Oxydation de l'acide ascorbique.

- **La vitamine E :**

Elle s'insère au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines ou elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. (Marfak., 2011)

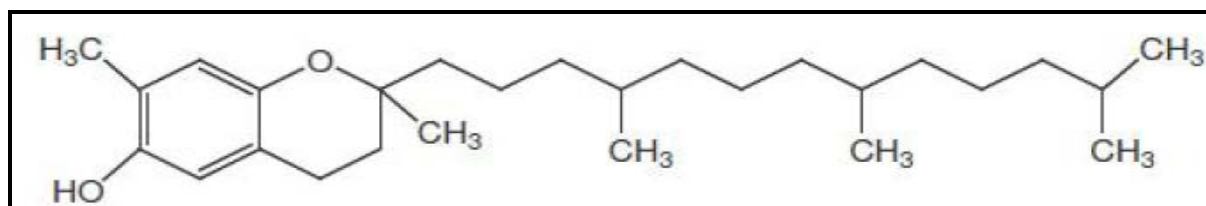


Figure 13 : Structure de la vitamine E.

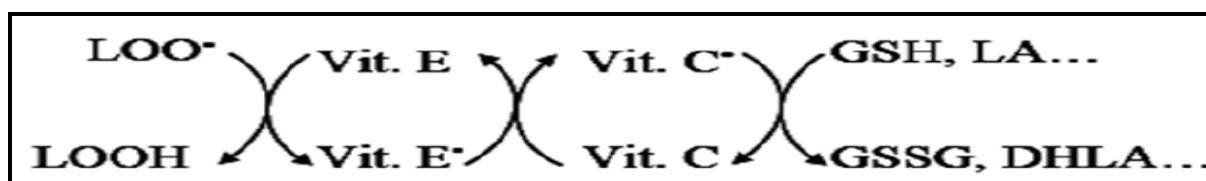


Figure 14 : Schéma des réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C (Packer et al., 2001).rh (LOO^\bullet) : radical peroxyde lipidique, ($LOOH$) : hydroperoxyde lipidique, (Vit. E) : vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé, (LA) : acide lipoïque, (DHLA) : acide dehydrolipoïque. (Matés et al., 1999)

- **Glutathion :**

Le glutathion est agent anti radicalaire composé de 3 acides aminés: cystéine, acide glutamique et glycine. Les deux derniers acides aminés sont produits rapidement par l'organisme mais la cystéine est un acide aminé semi-essentiel, qui doit donc être présent dans notre alimentation. Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. Le rôle protecteur et détoxifiant de glutathion résulte principalement de sa fonction comme coenzyme de glutathion peroxydase (GSHPX). (Roussel., 2009)

De plus il a des interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tels que la vitamine C ou la vitamine E. (Delattre., 2005)

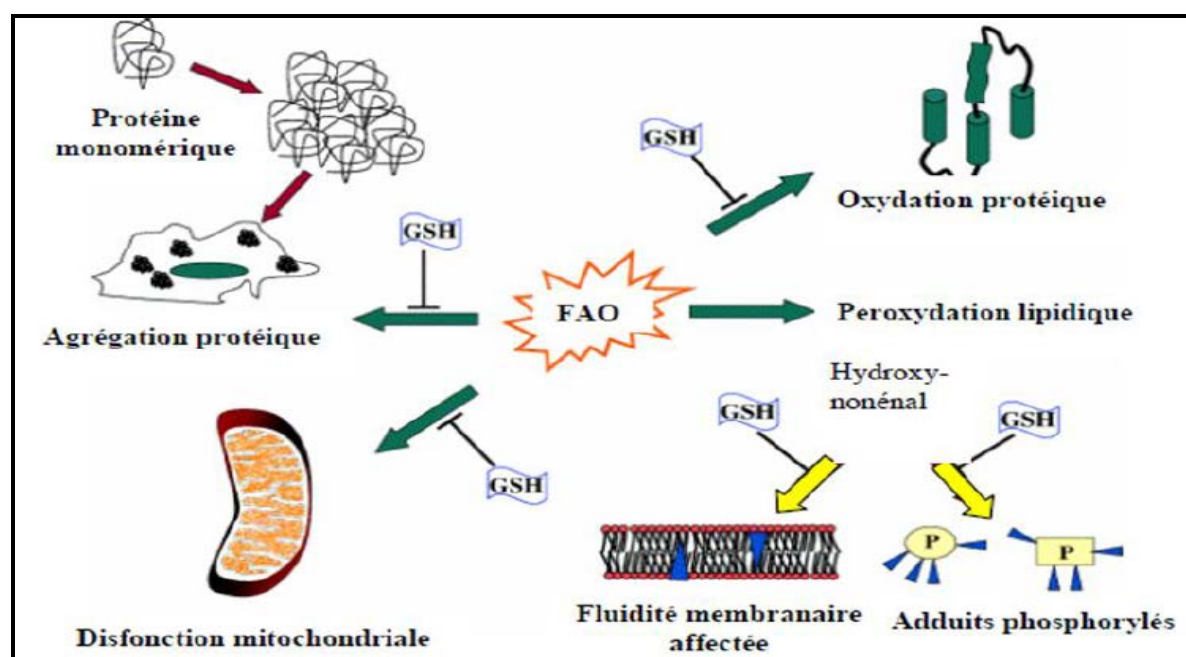


Figure 15 : Rôles attribués au GSH suite à un stress oxydant. (Bharath et al., 2002)

- **Polyphénols :**

Les propriétés antioxydantes des poly-phénols, varient en fonction de leurs structures chimiques. Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des poly-phénols. Les poly-phénols porteurs un groupement catéchol (un noyau aromatique porteur de deux fonctions hydroxyle adjacentes) ont un potentiel antioxydant plus élevé.

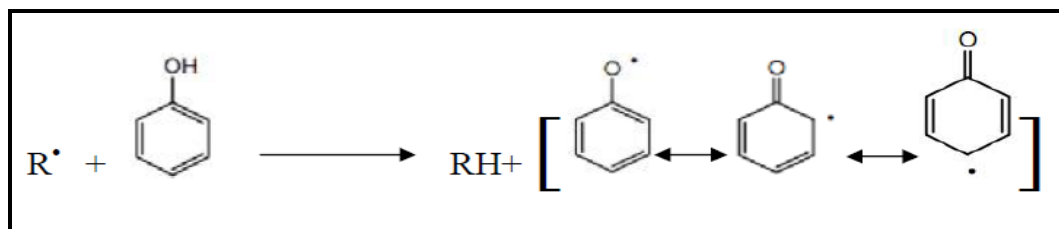


Figure 16 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques. (Nkhili., 2009)

Tableau 4: Quelques composés phénoliques à activité antioxydante dans les épices.

Végétaux	Composés Phénoliques présents	Structures
Gingembre	Gingérol Shogaol Zingérone	
Vanilla	Vanilline	
Curcuma	Curcumine	

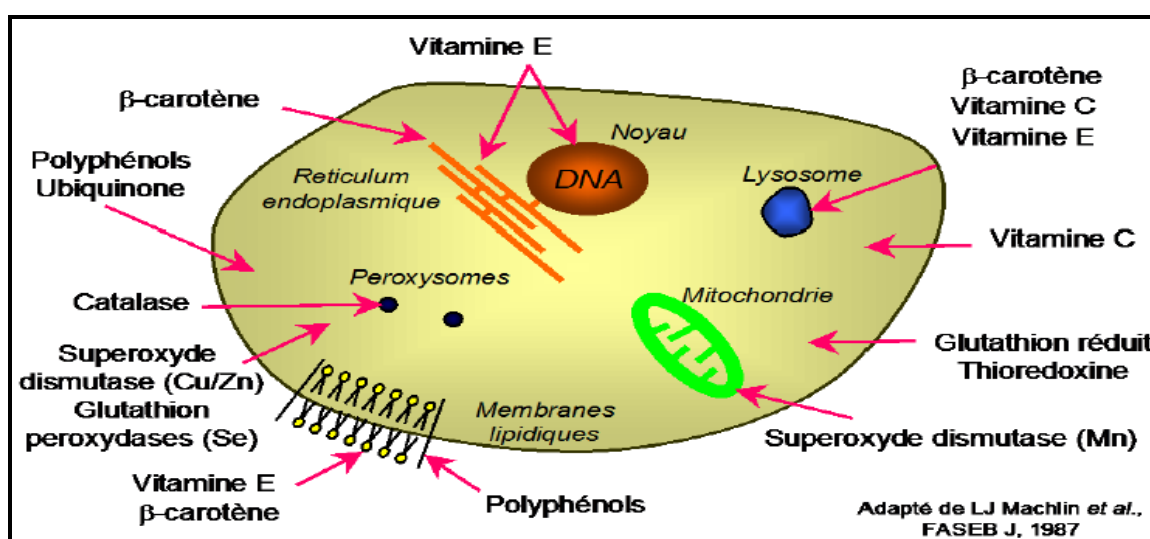


Figure17 : Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires.

(Atti., 2014)

II.1.2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante et anti radicalaire

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux libres différents.

Tableau 5 : Méthodes les plus couramment utilisées pour estimer le pouvoir antioxydant. (Portes., 2008)

Méthodes	Réactions	Structure
<p>Method FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)</p>	<p>Réduction le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺).évalue le pouvoir réducteur des composés. La lecture se fait à 700 nm.</p>	
<p>Méthode DPPH</p>	<p>Le composé chimique 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure activité antioxydant des composés phénoliques. La lecture se fait à 517 nm.</p>	
<p>Méthode ABTS</p>	<p>Le sel de ABTS (l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline- 6-sulfonique) Perd un électron pour former un radical cation ABTS^{•+}, de couleur sombre en solution en présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation ABTS^{•+}, Ce qui entraine la décoloration de la solution. La lecture se fait à 734 nm.</p>	

II.2. INFECTIONS BACTERIENNES ET ANTIBIOTHERAPIE

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multi résistance bactérienne.

II.2.1. L'antibiotique

II.2.1.1. Définition

Un antibiotique est une substance antibactérienne produite par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou de synthèse chimique capable d'inhiber la multiplication ou détruire les micros organismes. (Yala et al., 2001)

II.2.1.2. Modes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur différents critères tels que leurs origines, leurs structures et leurs mécanismes d'action. L'action antibactérienne s'effectue selon quatre principaux mécanismes. (Prescott et al., 2003)

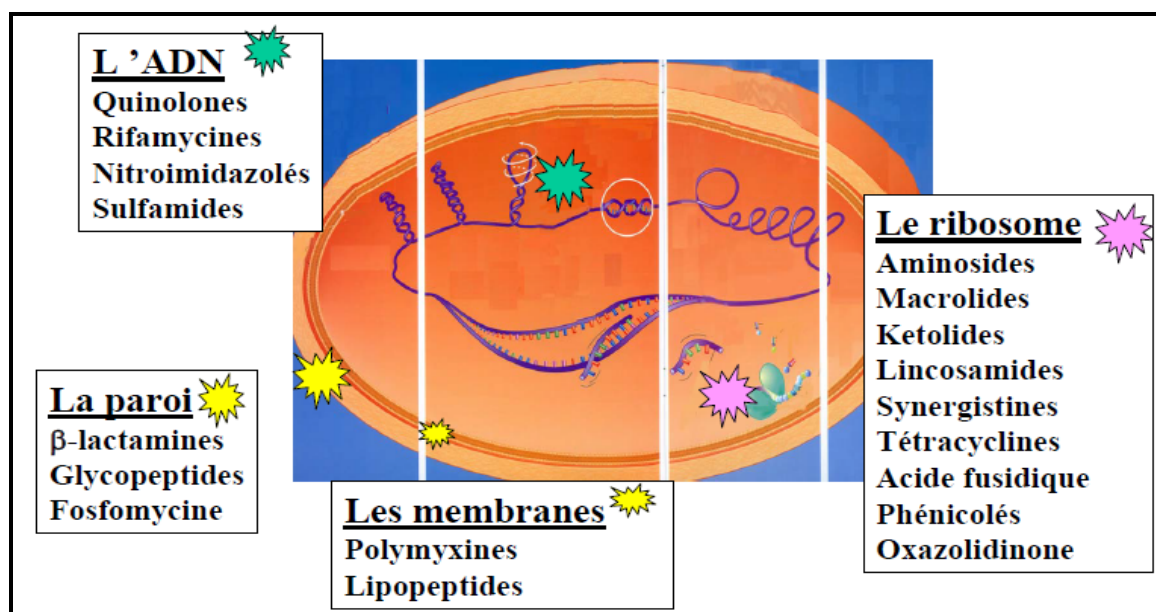


Figure 18 : Cibles bactériennes des antibiotiques.

Tableaux 6: Principaux mécanismes d'action des antibiotiques. (Prescott et al., 2003)

Antibiotiques	Mécanisme d'action
<p>Pénicilline</p> <p>Ampicilline</p> <p>Vancomycine</p> <p>Bacitracine</p>	<p>Inhibition de la synthèse de la paroi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Active les enzymes lytiques de la paroi. • Inhibe les enzymes de transpeptidation impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne. • Se fixe directement sur la terminaison D-Ala- D-Ala et inhibe la transpeptidation. • Inhibe la synthèse du peptidoglycane en interférant avec l'action des transporteurs lipidiques qui transfèrent les précurseurs de ce polymère à travers la membrane cellulaire.
<p>Streptomycine</p> <p>Chloramphénicol</p> <p>Erythromycine</p>	<p>Inhibition de la synthèse protéique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se fixe à la sous unité 30S du ribosome bactérien pour inhiber la synthèse protéique et provoquer des erreurs dans la lecture de l'ARNm. • Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et empêche la formation des liaisons peptidiques par l'inhibition de la peptidyl-transférase. • Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique.
<p>Ciprofloxacine et autres quinolones</p>	<p>Inhibition de la synthèse des acides nucléiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inhibe l'ADN gyrase bactérienne et donc interfère avec la réplication de l'ADN, la transcription et autres activités impliquant l'ADN.

II.2.2. La résistance bactérienne aux antibiotiques

Une souche est dite résistance lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration d'antibiotiques beaucoup plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité de l'autre souche des mêmes espèces

Il existe deux grande type de résistance aux antibiotique ; la résistance intrinsèque et la résistance acquise :

II.2.2.1. La résistance naturelle ou intrinsèque

Cette résistance, généralement chromosomique est présente chez toutes les souches d'une même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques et elle est due ; soit à une absence de cible pour l'antibiotique soit à une imperméabilité de la paroi à cet antibiotique. Cette résistance n'est pas transférable horizontalement et elle ne présente donc aucun risque chez les bactéries pathogène.

Exemple de résistances naturelles :

1/ *Klebsiella* spp. Produit naturellement des bêta-lactamases. Cette enzyme est alors présente dans l'espace périplasmatique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A, avant que ceux-ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne.

2/ Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies.

II.2.2.2. La résistance acquise :

Cette résistance ne concerne que quelques souches, d'une même espèce ou d'un même genre, normalement sensible à un antibiotique donné. Elle est due à des modifications génétique chromosomique ou extra chromosomiques : mutation sur des gènes existantes (gène codant pour des cibles des antibiotique ; gène régulateurs) ou incorporation de nouveaux gènes codant à des mécanismes de résistance.

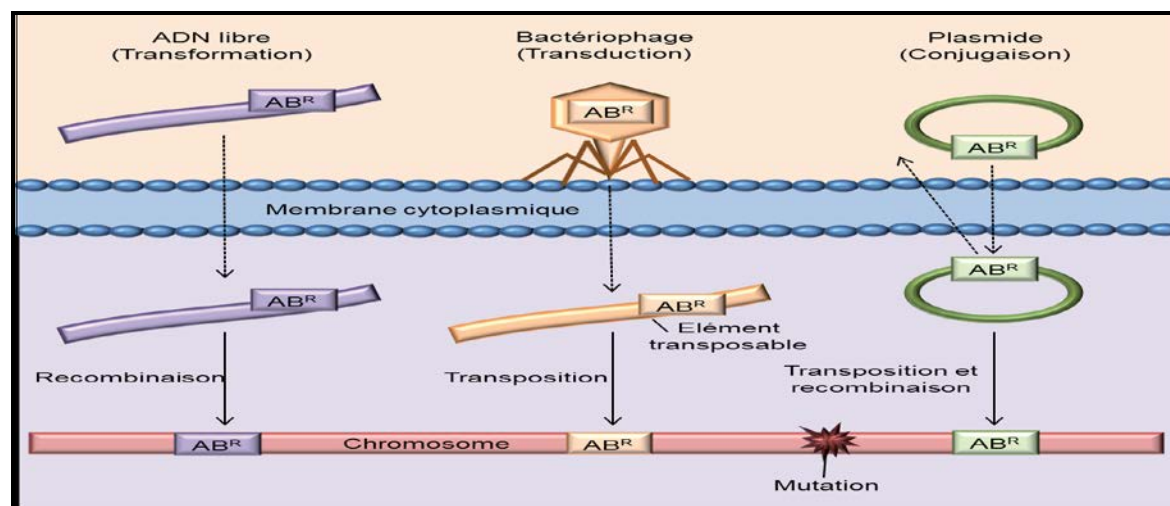
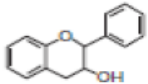
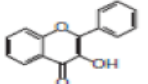


Figure 19: Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques. (Aleksun et al., 2007)

II.2.3. Activités antimicrobiennes des polyphénols

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité. Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes. (Sandhar et al., 2011)

Tableau 7. Principaux composés phénoliques ayant une activité antimicrobienne. (Daglia., 2011)

Composés phénoliques et leurs structures	Microorganismes sensibles	Exemples
 Flavane-3-ol	Bactéries	<i>V.cholerae</i> , <i>S.mutans</i> , <i>C.jejuni</i> , <i>C.perfringes</i> , <i>E.coli</i> , <i>B.Cereus</i> , <i>H.pylori</i> , <i>S.aureus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>A.naeshlundii</i> , <i>P.oralis</i> , <i>P.gingivalis</i> , <i>P.melaninogenica</i> , <i>F.nucleatum</i> , <i>C.pneumonia</i>
 Flavonole	Virus	Adénovirus, Entérovirus, Flu virus.
	Champignons	<i>Candida albicans</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> .

CHAPITRE III

Les curcuminoïdes, métabolites
secondaires du *Curcuma longa* L

III.1. LES CURCUMINOÏDES :

Les métabolites secondaires végétaux, peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

En ce qui concerne la plante étudiée le *Curcuma longa* L, il a été démontré que le rhizome réduit en poudre, était une riche source de composés phénoliques connus sous le nom collectif de « Curcuminoïdes ». Ces composés ont tous en commun la présence de plusieurs cycles benzéniques portant plusieurs fonctions hydroxyles.

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie) et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes.

Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel.

La famille des curcuminoïdes comprend trois composés phénoliques :

- La Curcumine
- La Déméthoxycurcumine
- La Bisdéméthoxycurcumine

Dont voici la structure et la nomenclature chimique :

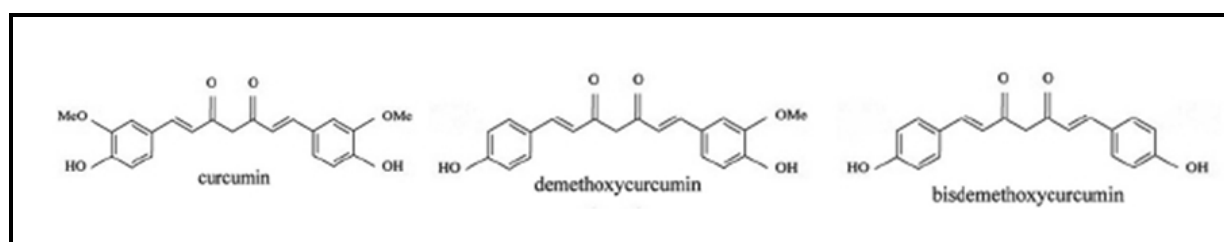


Figure 20 : Structures chimiques des curcuminoïdes. (Park et al., 2005)

A : Curcumine I

[1,7-bis (-hydroxy3-méthoxyphényl)-1,6 heptadiène -3,5 dione] (ou diféruoylméthane) est une molécule contenant deux noyaux phénoliques identiques séparés par une courte chaîne d'hydrates de carbone. Sa structure est symétrique et contient deux fonctions cétone, deux fonctions alcool et deux fonctions éther.

B : Curcumine II

Diméthoxycurcumine (une fonction éther de moins que la curcumine).

C : Curcumine III

Bisdiméthoxycurcumine (deux fonctions éther de moins que la curcumine).

La curcumine disponible dans le commerce n'est pas une curcumine pure, mais plutôt est un mélange de la curcumine (approximativement 77%), du deméthoxycurcumine (approximativement 18%) et du bisdeméthoxycurcumine (Approximativement 5%). (Anand et al., 2007)

Et comme la curcumine est le composé majoritaire du *Curcuma longa* L, nous nous proposons dans ce qui suit d'en étudier les propriétés physico-chimiques et thérapeutiques.

III.2. Propriétés physico-chimiques de la curcumine

- $C_{21} H_{20} O_6$ (isomères).
- Le poids moléculaire de curcumine est 368.37 Da.
- Le maximum d'absorption de la curcumine au spectrophotomètre à 430nm dans le méthanol et entre 415 et 420 nm dans l'acétone.
- Température de fusion: 183°C.
- Insoluble dans l'eau.
- Soluble dans l'alcool, éther, acide acétique.
- La curcumine est jaune-orange pour un pH compris entre 2,5 et 7 et rouge à pH supérieur à 7 (Goel et al., 2008). En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre une forme énolique et une forme di cétonique (Figure 21).

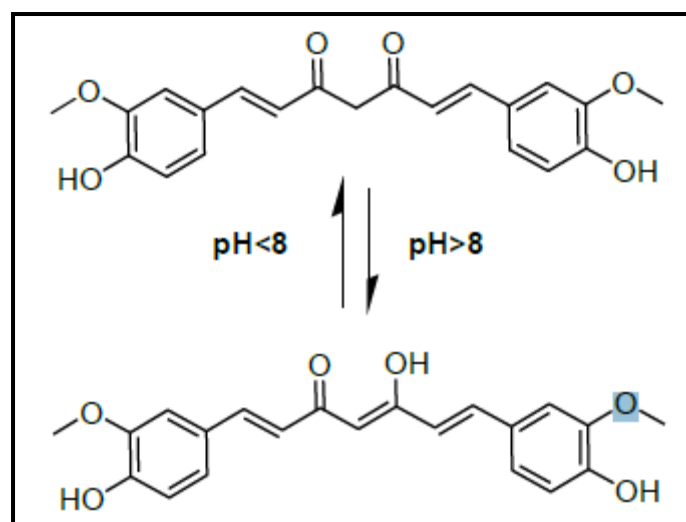


Figure 21: Tautomérie céto-énolique de la curcumine ; formes dicétone (en haut) et énol (en bas).

III.3. Activités biologiques et mécanisme d'action de la curcumine

La curcumine possède une large gamme d'activités pharmacologiques y compris des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses, antioxydantes, cicatrisantes, des effets antimicrobiens et antiparasitaires. Le mécanisme d'action est complexe et probablement multifactoriel.

Les cibles moléculaires de la curcumine sont présentées dans la **Figure 22**

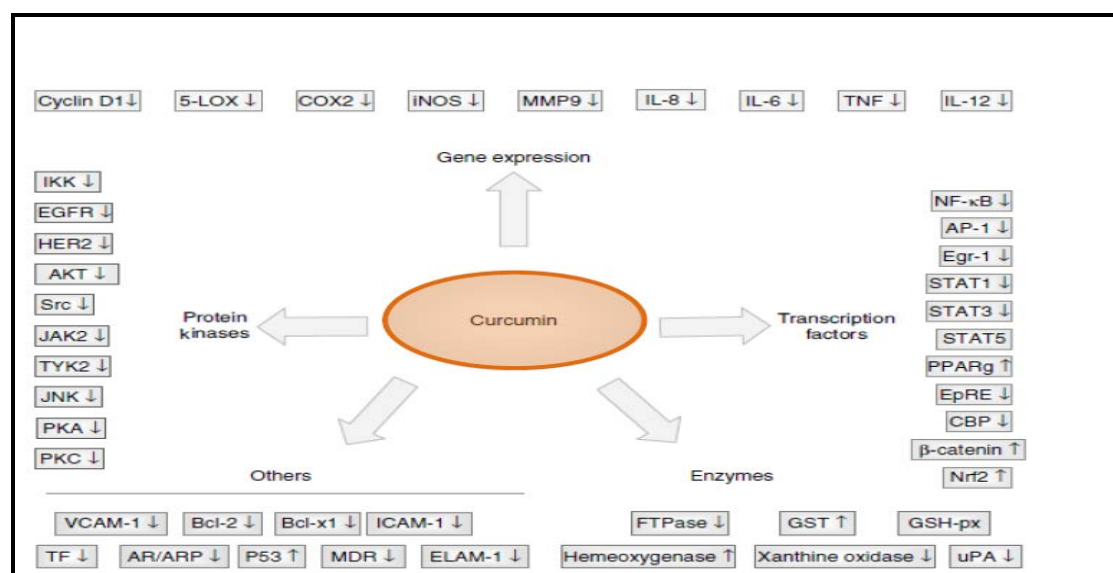


Figure 22: Cibles moléculaires de la curcumine. (Watson et al., 2010)

III.3. 1. Propriétés antioxydantes

La curcumine est considérée comme un antioxydant dix fois plus actif que la vitamine E, son action se fait par différents mécanismes:

a) Par transcription génétique:

Elle module l'expression des gènes pour que ces derniers piègent les radicaux libres. Dans un modèle de glomérulonéphrite, la curcumine exerce une activité anti-fibrotique en augmentant l'expression du gène de l'hème-oxygénase-1 (HO-1). (Jeong et al., 2006)

L'enzyme microsomale hème oxygénase (HO) catalyse l'oxydation de l'hème en biliverdine (convertie en bilirubine par la biliverdine réductase) et monoxyde de carbone (CO) ; elle est largement distribuée dans les tissus des mammifères. Deux principaux isoformes ont été identifiés : l'hème oxygénase-1 inductible et l'hème oxygénase-2 constitutive. L'expression de HO-1 est extrêmement sensible aux agents qui causent le stress oxydatif et manifeste, en retour, des propriétés antioxydantes. (Liu et al., 2015)

b) Par voie enzymatique :

L'activité antioxydante de la curcumine est médiée par des enzymes antioxydantes telles que le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase.

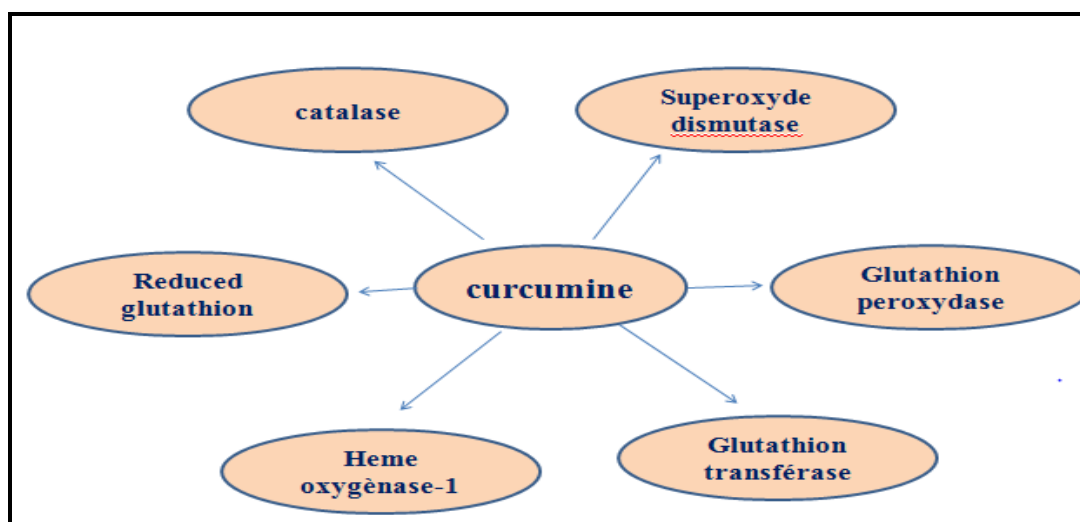


Figure 23: Différentes enzymes médiatrices de l'activité antioxydante de la curcumine.

La curcumine est un accepteur dans la réaction de Michael, ce qui lui permet de réagir avec le glutathion et la thioredoxine. La réaction de la curcumine avec ces composés réduit le glutathion intracellulaire dans les cellules. (Perrone., 2015)

La curcumine agit comme un piègeur de radicaux libres. Elle protège l'hémoglobine de l'oxydation.

c) Par voie non enzymatique :

In vitro, la curcumine peut inhiber significativement la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO), comme les anions superoxyde, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, ainsi que la génération de radicaux nitrite en activant les macrophages, ces derniers jouant un rôle important dans l'inflammation.

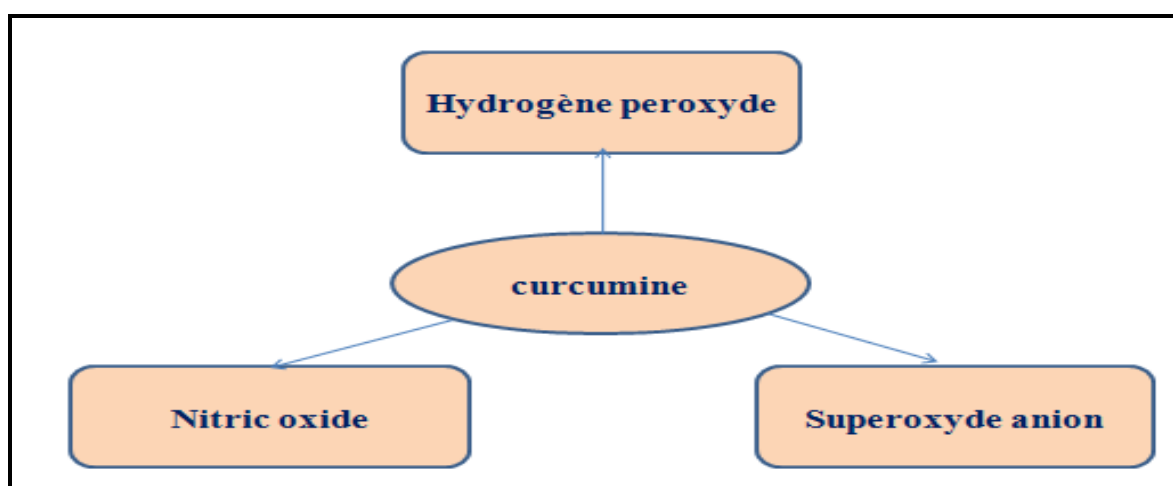
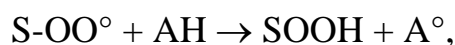


Figure 24 : Effet de la curcumine comme piègeurs de ROS et RNS.

Le processus antioxydant non enzymatique se fait en deux étapes :



Où S est la substance oxydée, AH l'antioxydant phénolique, A[•] le radical antioxydant et X[•] un autre radical. A[•] et X[•] se dimérisent pour former un produit non radical. (Muanda et al., 2010)

Les groupements phénoliques peuvent être à l'origine de l'activité antioxydante de la curcumine en libérant un proton comme cela est indiqué sur la **Figure 25**.

Les deux groupements phénoliques A et B sont aussi capables de libérer un proton selon les mécanismes I et II.

Les groupements méthylène de la curcumine peuvent également être à l'origine des propriétés antioxydantes de la curcumine comme cela est montré par le mécanisme III. Les radicaux de curcumine formés se stabilisent par résonance (ou mésomérie) qui correspond à la délocalisation de l'électron au sein de la molécule.

Ainsi la capacité de la curcumine à donner un proton permet de neutraliser les radicaux libres dans l'organisme et d'empêcher la survenue d'un stress oxydatif ou de le diminuer lorsque celui-ci est déjà installé. (**Barzegar et al., 2011**)

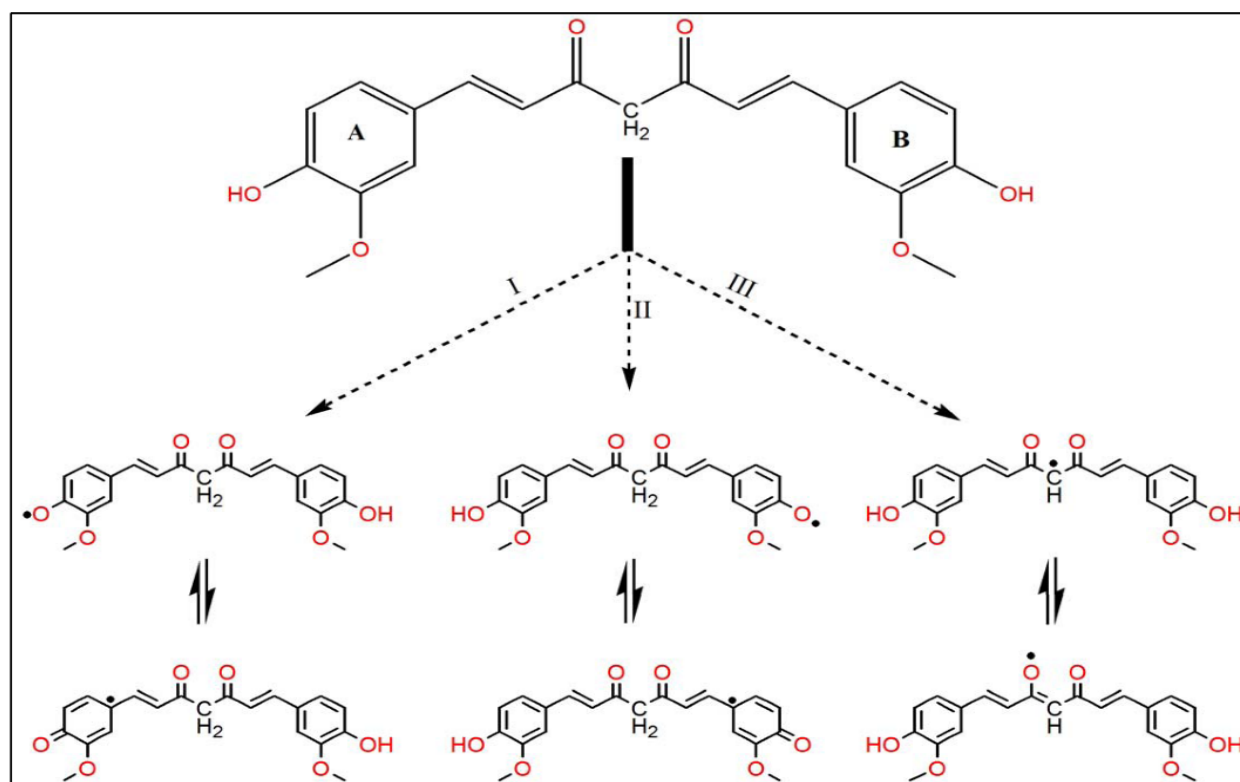


Figure 25: Site de réaction de la curcumine avec les radicaux libres. Les groupements phénols et méthylène permettent la neutralisation des radicaux libres. La curcumine ayant libéré un proton se stabilise par mésomérie

III.3.2. Propriétés anti-inflammatoires

Les curcuminoïdes et la curcumine sont capables d'interagir avec de très nombreuses cibles moléculaires impliquées dans l'inflammation, entre autres la cyclo-oxygénase, la lipoxygénase, les leucotriènes, les prostaglandines, la thromboxane, le TNF ou les interleukines.

La curcumine intervient dans la réponse inflammatoire en inhibant l'activité des enzymes cyclo-oxygénase-2 (COX-2), lipoxygénase (LOX) et NO-synthase inductible (iNOS). Ces 3 enzymes jouent un rôle important dans le processus inflammatoire, comme la formation de PGE2 par la COX-2 à partir d'acide arachidonique. **(Jurenka., 2009)**

La cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et la lipoxygénase seraient inhibées grâce à la faculté de la curcumine de supprimer l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), un facteur eucaryote ubiquitaire de transcription impliqué dans la régulation de l'inflammation, de la prolifération cellulaire, de la transformation cellulaire et de la cancérogénèse Figure 29 **(Menon et al., 2007)**.

La lipoxygénase est aussi nécessaire à la biosynthèse des leucotriènes. L'enzyme INOS est capable de programmer, via l'oxyde nitrique (NO), l'apoptose des cellules impliquées dans de nombreuses maladies neurodégénératives et dans la mort cellulaire lors des ischémies cérébrales. **(Morel., 2008)**

La curcumine serait aussi capable d'exercer des effets anti-inflammatoires et antiprolifératifs sur des cellules cancéreuses, en inhibant la production de l'interleukine 1 β (IL-1 β), de l'interleukine 6 (IL-6) et du facteur nécrosant les tumeurs α (TNF- α). Ces cytokines pro-inflammatoires sont également impliquées dans des maladies comme la polyarthrite rhumatoïde (PR) ou la maladie de Crohn. **(Hombourger., 2010)**

L'activité anti-inflammatoire du rhizome de *Curcuma Longa* L et plus précisément la curcumine a été démontrée dans les modèles animaux avec une efficacité identique à celle de l'acétate d'hydrocortisone ou de l'indométacine dans l'inflammation induite expérimentalement.

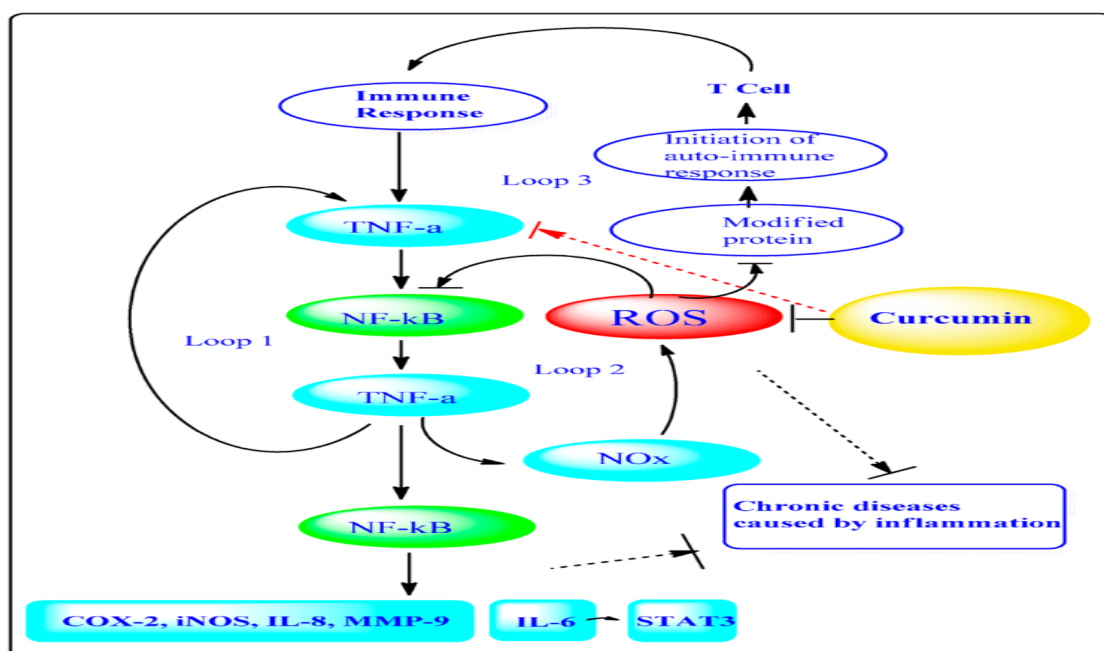


Figure 26: Inhibition de la réponse immune par la curcumine d'après (Y. He et al. 2015). La curcumine peut agir au niveau des ROS et inhiber ainsi la réponse immune et les voies NF- κ B et TNF- α inhibant ainsi la sécrétion de cytokine (IL-6, IL-8, MMP-9...). Elle peut également agir directement sur les facteurs de transcription NF- κ B et TNF- α . L'ensemble de ces mécanismes diminue les risques de développement des maladies chroniques causées par l'inflammation. (Youssef., 2016)

III.3.3. Propriété anticancéreuses

Plusieurs études indiquent que la curcumine est un puissant agent anti-cancer.

Les tumorigenèses de la peau, de la glande mammaire, de la cavité orale, des voies aérodigestives, de l'oesophage, de l'estomac, de l'intestin, du colon, du poumon, du foie ont été stoppées par la curcumine. (Aggarwal et al., 2006)

Pour expliquer les effets anti-carcinogéniques de la curcumine sur des tumeurs différentes, une large variété de mécanismes ont été impliqués :

- Incluant l'inhibition des intermédiaires réactifs de l'oxygène.
- La suppression de l'inflammation.
- L'inhibition de la prolifération cellulaire.
- L'inhibition des isoenzymes du cytochrome P450.
- L'induction du GSH.

- L'inhibition des facteurs de transcription 96 comme NF- κ B et AP-1, la suppression de la COX-2.
- L'inhibition de protéines du cycle cellulaire (cycline E).
- L'inhibition de l'oxydation des bases de l'ADN.
- L'inhibition de la formation d'adduits due au malondialdéhyde (MDA).
- L'inhibition de l'implantation des tumeurs.
- L'inhibition de protéines kinases.
- L'inhibition de la biotransformation des carcinogènes et l'induction de l'activité de la glutathion-S-transférase.

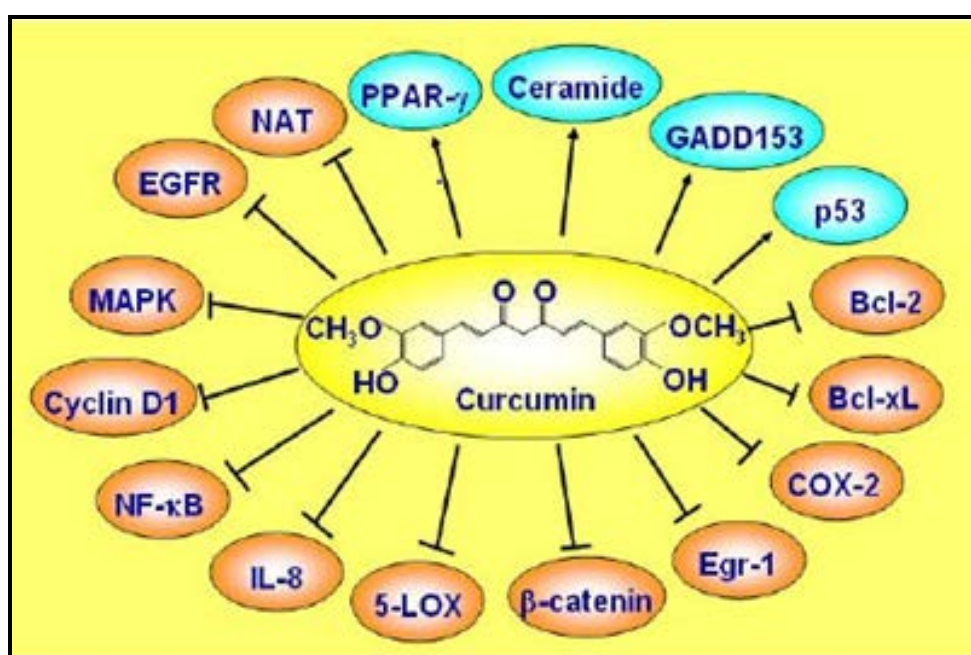


Figure 27: Cibles de la curcumine impliquées dans le cancer.

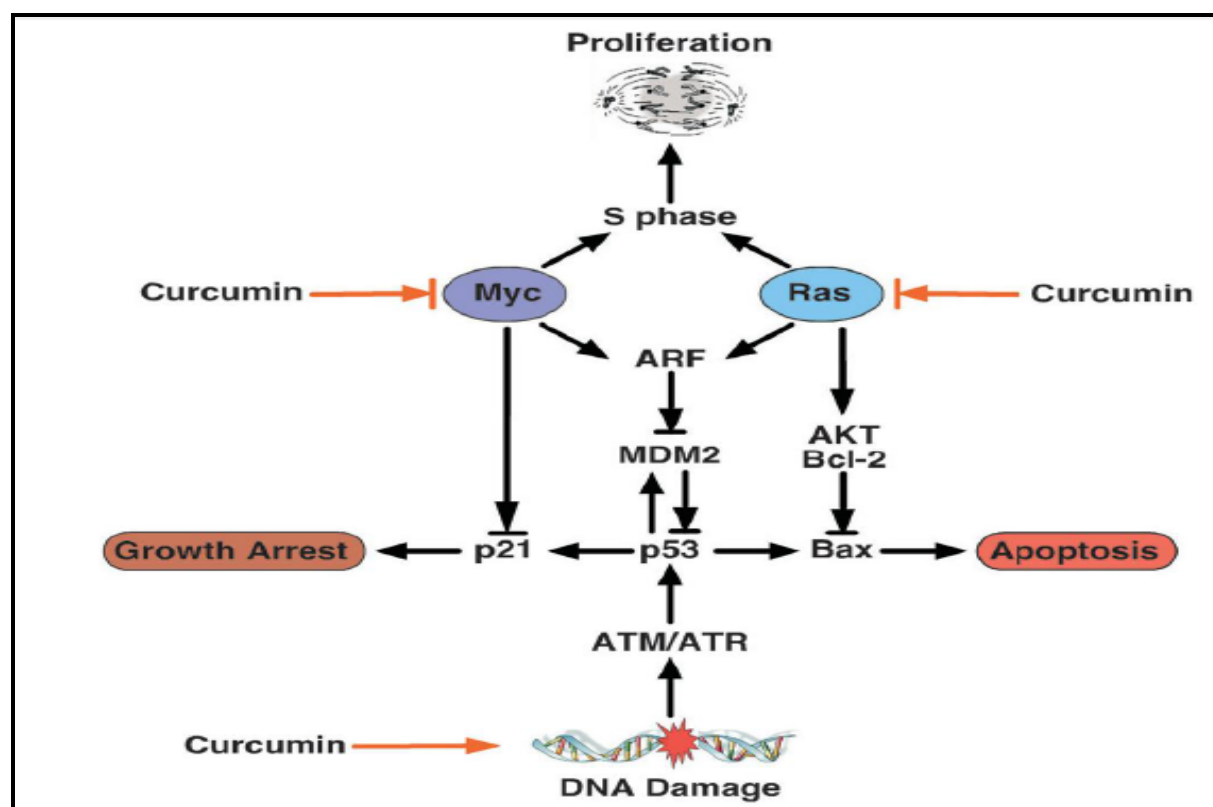


Figure 28: Circuit ARF-p53 dans le développement des tumeurs. (Gaurisankar., 2008)

III.2. 4. Propriétés antimicrobiennes

Les résultats prometteurs pour l'activité antimicrobienne de la curcumine en font un bon candidat pour améliorer l'effet inhibiteur des agents antimicrobiens existants par synergisme. (Tidjini A et al., 2014)

- Agent antibactérien: infection *Staph*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *H.pylori*
- Agent antiviral: VPH, le VIH, le virus de la grippe, l'herpès simplex virus
- Agent antifongique: les espèces de *Candida*, les espèces *Trichophyton*

Le curcuma protecteur contre le VIH (sida)

Le virus de l'immunodéficience humaine est un virus qui attaque le système immunitaire et engendre une défaillance progressive du système immunitaire appelé SIDA. Ainsi ce virus se propage par l'échange des fluides corporels infectés par voie

sexuelle ou par voie asexuée tels que la transfusion de sang contaminé. Si l'infection n'est pas traitée, elle peut mettre environ 10 à 15 ans pour se développer en sida.

La curcumine et ses composés connexes empêchent l'activité des gènes qui aident à la multiplication du VIH.

Aussi, la curcumine inhibe l'activité de l'enzyme protéase et l'intégrase qui est libérée par le virus, contribue à la multiplication et à la manifestation du SIDA.

Le prétraitement des cellules génitales, des muqueuses avec la curcumine sous forme de pommade ou onguent protège contre l'infection associée au VIH et de l'inflammation.

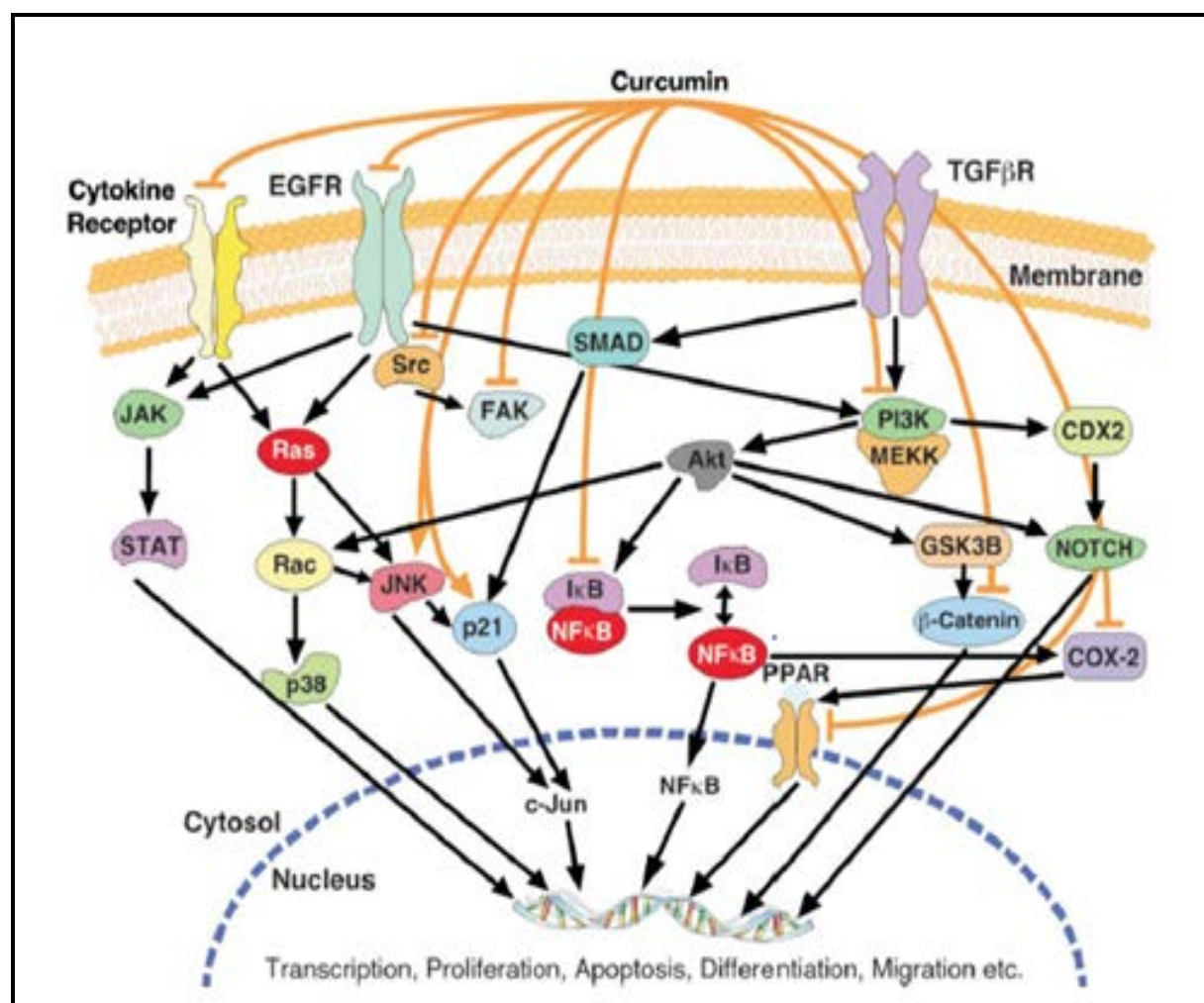


Figure 29: Les différents niveaux des cibles de signalisation oncogénique contrôlés par la curcumine. (Gaurisankar., 2008)

PARTIE II

Partie expérimentale

CHAPITRE I

Matériel et méthodes

Le but de notre travail pratique est d'extraire et identifier les métabolites secondaires de *Curcuma longa* L, évaluer leur potentiel antioxydant et antibactérien *in vitro* et trouver une corrélation entre le contenu métabolique et l'effet biologique.

I.1. Matériel d'étude

I.1.1. Matériel végétal

La plante *Curcuma longa* L qui fait l'objet de notre étude chimique et biologique, a été identifiée et achetée chez un herboriste de la wilaya de Constantine, sous forme de Rhizome secs.

I.1.2. Matériel et produits de laboratoire

- Appareil d'extraction Soxhlet.
- Evaporateur rotatif.
- Mortier et pilon, broyeur domestique.
- Spectrophotomètre
- Balance.
- Papier filtre.
- Ballons, spatules, flacons et tubes stériles.
- Tous les solvants et réactifs chimiques utilisés sont de qualité analytique.
- Les milieux de culture microbienne proviennent de l'institut Pasteur.
 - Les souches microbiennes ATCC testées, proviennent du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne, UFM Constantine1:
Staphylococcus aureus ATCC 25923
Bacillus subtilis ATCC 6633
Escherichia coli ATCC 2592
Rhizopus oryzae : M491890.1

I.2. Méthodes d'études

I.2.1. Extraction

Broyage

Dans un mortier et à l'aide d'un pilon, une quantité de 100g de Rhizome sec du *Curcuma longa* L a été broyée grossièrement, puis pulvérisée en poudre fine à l'aide d'une moulinette.

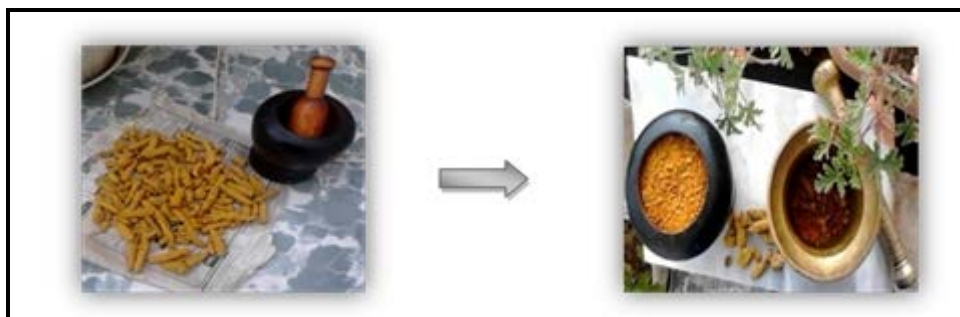


Figure 30: Broyage du rhizome de *Curcuma longa* L.

- **Les étapes à suivre pour l'extraction**
- 76.231 g de poudre de *Curcuma longa* L sont pesés, puis mis dans un papier filtre fin.
- Le papier filtre est placé dans une cartouche qui va dans le Soxhlet, du méthanol est ensuite déversé directement dessus jusqu'à siphonnassions.
- Le tout est porté à ébullition.

L'ensemble est donc prêt pour l'extraction.

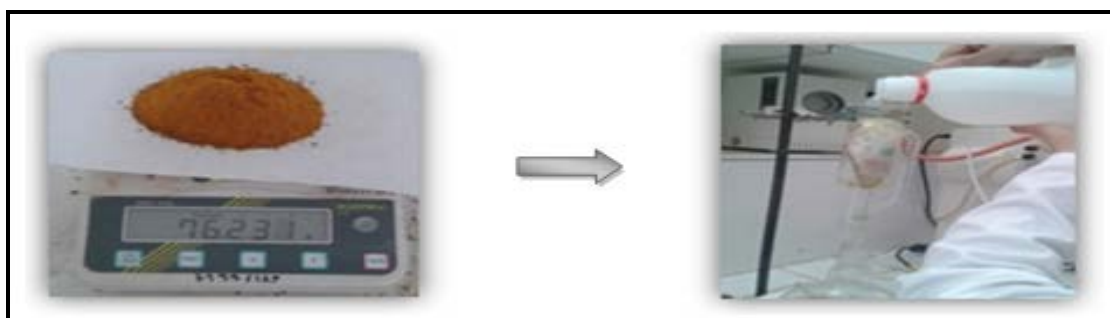


Figure 31: Pesée de la poudre de *Curcuma longa* L **Figure 32:** Préparation de l'extraction.

❖ Extraction par Soxhlet

L'extraction au Soxhlet est une méthode d'extraction Solide-liquide fréquemment utilisée.

Le méthanol contenant la matière solide retourne dans le ballon par déversement successif causé par un effet de siphon dans le coude latéral.

La matière solide s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète et nous obtenons ainsi l'extrait brut.

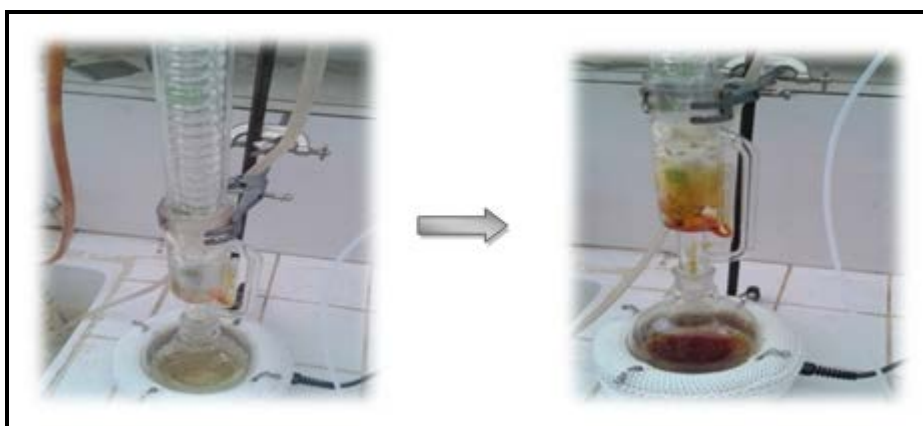


Figure 33 : Extraction par Soxhlet.

❖ Evaporation

Le méthanol est évaporé généralement sur un évaporateur rotatif, que nous avons programmé à 40°C sous pression réduite maintenu à l'aide d'une pompe afin d'assurer le vide.

- Le ballon qui contient l'extrait brut obtenu, est placé sur le rota vapeur pendant un certain temps jusqu'à ce que l'évaporation du méthanol s'arrête et nous obtenons l'extrait brut sec qui est sous forme d'une gomme marron orange accumulée sur les bords du ballon.



Figure 34: Evaporation de l'extrait brut.

Pour peser le poids de l'extrait brut, il faut d'abord :

- Peser le ballon vide, puis ce dernier avec l'extrait et on calcule le poids de l'extrait brut, ça nous permet de calculer le rendement selon la loi suivante :

$$\text{Rendement \%} = (\text{la masse d'extrait} / \text{la masse de poudre}) * 100$$

- L'extrait est récupéré avec un mélange "méthanol+eau" 1 :1V/V, à l'aide d'une spatule on gratte tous ce qui s'accumule sur les bordures.
- Le tout est conservé dans un flacon ombré et stérile et mis au congélateur jusqu'à son utilisation.

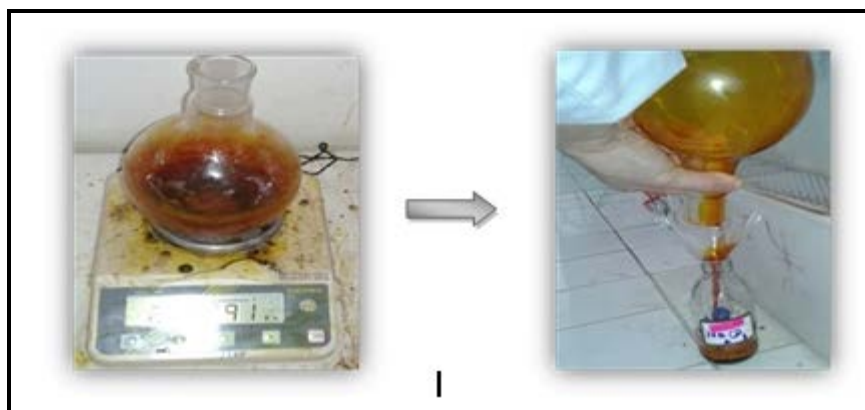


Figure 35 : Pesée et conservation de l'extrait brut.

I.2.2. Etude qualitative

I.2.2.1. Chromatographie liquide sur couche mince

Principe

Le principe de la chromatographie sur couche mince repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire.

Cette technique a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice.

❖ **Mode opératoire****Préparation de l'échantillon**

Notre échantillon est l'extrait brut sec des rhizomes de *Curcuma longa* L obtenu précédemment par extraction au Soxhlet.

Préparation de la plaque (phase stationnaire)

Nous traçons délicatement sur nos plaques de gel de silice une ligne de dépôt à environs un 0.5cm du bord inferieur de la plaque et une ligne de front à environ 0.5cm du bord supérieur.

Système solvant (phase mobile)

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques généralement de faible, moyenne et forte polarité dans des proportions adéquates que nous déterminons empiriquement. Pour cela, On utilise deux systèmes solvants pour définir celui qui donne la meilleure séparation de notre extrait.

Tableau 08: Les deux systèmes solvants utilisés pour la CCM sur gel de silice.

CCM sur gel de silice		
	Systèmes solvants	Proportions
Systèmes Choisis	Hexane /acétate d'éthyle	(7/3) (v/v)
	Hexane/acétate/méthanol	(7/3/0.5) (v/v/v)

Préparation de la cuve

L'éluant est introduit dans la cuve de manière à ce que son niveau atteigne une certaine hauteur (d'une façon que le solvant ne touche pas les spots), puis on la couvre avec un couvercle hermétique afin qu'elle se sature des vapeurs de l'éluant.

Dépôt :

A l'aide d'une micropipette, on dépose sur la ligne de dépôt deux gouttes séparées de nos extraits à analyser.

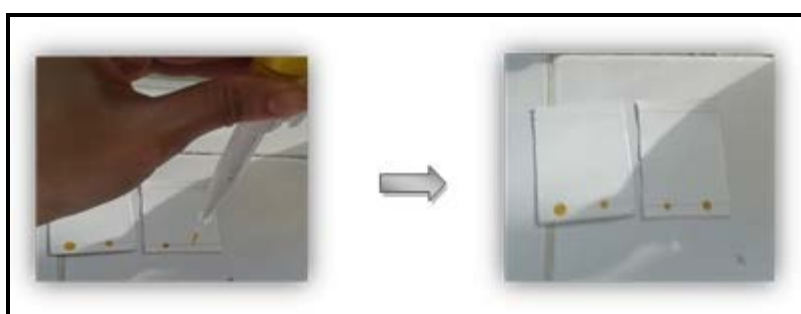


Figure 36 : Préparation de la plaque CCM

La plaque est placée dans la cuve, l'éluant remonte par capillarite le long de la plaque entraînant avec lui l'extrait, lorsqu'il arrive au front du solvant, on fait sortir la plaque de la cuve et on la laisse sécher sur palliasse.



Figure 37 : Migration des constituants du *Curcuma longa* L.

Révélation physique:

Elle est réalisée à l'aide d'une lampe UV à 365 nm, ou nous procédons à la visualisation de spots potentiellement invisibles.



Figure 38: Visualisation des constituants à l'aide de la lampe UV

Révélation chimique :

Elle est utilisée pour identifier certaines classes de métabolites secondaires qui donnent des colorations spécifiques avec le révélateur selon les fonctions chimiques qu'elles contiennent et leurs positions. Nous utiliserons comme révélateur la vanilline sulfurique à 1% spécifique aux poly-phénols.

- Le révélateur est pulvérisé sur la plaque CCM puis chauffer 2min à l'étuve à 110°C: couleur violet.



Figure 39: Révélation des plaques avec la vanilline sulfurique

❖ Calcul du Rapport frontal (R_f)

Pour chaque spot nous avons calculé le facteur de rétention, qui est égal à la distance parcouru par le constituant divisé par la distance parcourue par le solvant.

$$R_f = d/D$$

Où :

d : Distance parcourue par le constituant

D : Distance parcourue par le front de l'éluant

Ce facteur est caractéristique d'une substance tenant compte du solvant utilisé.

I.2.3. Etude quantitative

I.2.3.1. Dosage des poly phénol-totaux

❖ Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

A partir d'une solution mère d'acide gallique de concentration massique 600mg/10ml dans du méthanol, une série de dilutions de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, a été préparée pour obtenir des solutions filles à: (600, 300, 150, 75, 37.5) mg/10ml.

Par la suite :

- La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm contre un blanc de méthanol ce qui nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage.

❖ Principe du dosage

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV -Vis en utilisant le réactif de Folin- Ciocalteu.

Les propriétés colorimétriques du réactif de Folin- Ciocalteu sont modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules comme la fonction OH des phénols. Ce réactif est formé d'acide phosphomolybdique $H_3PMO_{12}O_4$ et d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ qui sont réduits par l'oxydation des phénols en oxydes

bleus de tungstène $W_8 O_{23}$ et de molybdène $MO_8 O_3$, cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleue foncée. (Wong et al., 2006)

❖ **Protocole :**

- 0.4mg/ml d'extrait sont ajoutés à 5ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué dans l'eau distillée.
- La solution a été mélangée et incubée pendant 10min
- Après incubation, 4ml de solution de Carbonate de sodium Na_2CO_3 (7.5g/100ml dans l'eau distillée) ont été ajoutés.
- Le mélange final a été bien mélangé, puis incubé pendant 2h dans l'obscurité à T° ambiante.

L'absorbance de l'extrait a été mesurée par un spectrophotomètre à 765nm.

- **La Teneur en Poly-phénols Totaux (TPT)** est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et les résultats sont exprimés en milligramme-équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de *Curcuma longa* L.

$$TPT = C * V / M$$

Avec :

C : [a.g] μ g/ml

V : volume d'extrait (ml)

M : poids de l'extrait (mg)

I.2.3.2. Dosage des flavonoïdes

❖ **Courbe d'étalonnage de la quercétine**

A partir d'une solution mère de quercétine de concentration massique 200 μ g/10ml dans le méthanol, une gamme de dilution ($1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$) est préparée pour obtenir des solutions filles de concentration (200, 100, 50, 25, 12.5) μ g /10ml.

Par la suite :

La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 430nm contre un blanc de méthanol ce qui nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage

❖ **Principe :**

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans notre extrait. (Djeridane et al., 2006)

Le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 430 nm. (Boudiaf., 2006)

❖ **Protocol :**

- Une quantité de 0.4mg d'extrait a été dissoute dans un 1ml d'éthanol, puis un 1ml d' AlCl_3 (2% dans du méthanol) ont été ajoutés.
 - Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance lue après 10min d'incubation à 430nm.
- **La Teneur en Flavonoïdes Totaux** est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine, les résultats sont exprimés en milligramme-équivalent de quercétine par gramme d'extrait de *Curcuma longa* L.

$$\text{TFT} = \frac{C \cdot V}{M}$$

Où :

C : [Q] $\mu\text{g/ml}$

V : volume d'extrait (ml)

M : poids d'extrait (mg)

❖ **Analyses statistiques**

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD, calculée sur un ensemble de trois essais comme suit :

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Où :

- S : l'écart type
- X : l'absorbance
- \bar{X} : la moyenne des 03 absorbances
- N : nombre d'essais

I.2.4. Etude de l'activité antioxydante

Pour évaluer l'effet antioxydante de l'extrait méthanolique de *Curcuma longa* L, nous avons procédé au test de piégeage par le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl).

I.2.4.1. Méthode DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl)

I.2.4.1.1. Principe

Le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picryl-hydrazyl) est stable à température ordinaire et présente une couleur rose-violacée bien caractéristique. Les antioxydants présents dans l'extrait préparé le réduisent, ce qui entraîne une décoloration jaune, facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm, et par conséquent une diminution de l'absorbance. La méthode est généralement standardisée par rapport à un contrôle positif réalisé avec un antioxydant standard, dans notre cas c'est l'acide ascorbique (Vit C). (Brand-Williams et al., 1995)

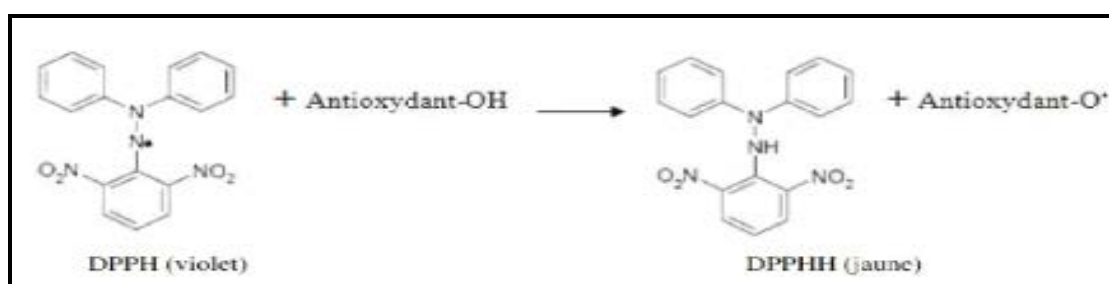


Figure 40 : Principe de la réduction du radical DPPH.

I.2.4.1.2. Protocole

La solution de DPPH à 0.004% (0.004g dans 100 ml d'éthanol), est préparée au préalable dans une fiole, bien couvrir avec du papier aluminium et laisser sous agitation jusqu'à son utilisation, cette solution reste stable 4 jours à 4°C.

❖ Préparation des dilutions

Nous avons préparé une gamme de dilution à (5, 2.5, 1.25) mg/ml partant d'une solution mère à 10mg/ml dissoute dans un mélange éthanol/eau (1 ; 1).

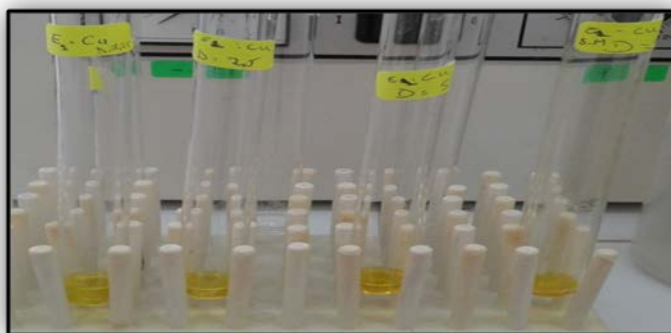


Figure 41 : Préparation des dilutions pour l'activité antioxydante.

Dosage

L'activité du piégeage du radical DPPH a été évaluée selon le protocole suivant :

- 50µl de chaque dilutions (10, 5 2.5, 1.25) mg/ml sont ajoutés à 5 ml de la solution du DPPH (0,004% dans l'éthanol).
- Parallèlement, un témoin négatif est préparé en mélangeant 50µl (éthanol/eau) avec 5ml de la solution de DPPH à 100%. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc (éthanol+eau 1/1) à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.
- Le contrôle positif est réalisé avec une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que notre extrait et pour des concentrations de : 2.5, 5 et 10mg/ml

I.2.4.1.3. Expression des résultats

❖ Calcul des pourcentages d'inhibitions

Les pourcentages d'inhibition sont calculés à l'aide de la formule suivante :

$$I \% = ((A_c - A_t) / A_c) \times 100$$

Avec :

A_c : Absorbance du contrôle négatif

A_t : Absorbance du test effectué

❖ Calcul des concentrations efficaces IC50

Le IC50 ou concentration inhibitrice de 50 %, est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH.

- Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées
- **EC50** est l'IC50 par équivalent gramme de DPPH.
- **Calcul de l'activité anti radicalaire**

APR ou activité anti radicalaire qui est inversement proportionnel à l'EC50 (concentration d'inhibition). (Parekh et al., 2007)

$$APR = 1/EC50$$

I.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les tests de sensibilité et résistance antimicrobienne sont été effectuées selon la méthode de diffusion des disques. (Parekh et al., 2007; Dulger et al., 2004; Rota et al., 2008)

I.2.5.1. Principe

Le principe de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes consiste à réaliser une culture microbienne sur milieu Muhler Hinton (MH), en présence de disques imbibés d'extrait de plante. Si ces derniers ont une activité antimicrobienne, on observera une zone d'inhibition autour du disque due à la diffusion des échantillons.

Le support microbien est composé de souches ATTC : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 2592 et *Rhizopus oryzae* M491890.1

I.2.5.2. Protocole

- Préparation des dilutions

Nous avons établi pour cette étude une gamme de dilution en partant d'une concentration de solution mère de 1g/10ml d'eau distillée stérile.

Nous obtenons ainsi la gamme de dilution suivante : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, à des concentrations de :

[500,250,125,62.5,31.25,15.625,7.8125]mg/10ml respectivement et nous avons utilisé à chaque fois uniquement l'eau distillée comme solvant de dilution.



Figure 42: Préparation des dilutions pour l'activité antimicrobienne.

- **Repiquage des espèces bactériennes**

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

- **Préparation de l'inoculum**

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 ml de bouillon nutritif puis portées à l'incubation pendant (18-24) heures à 37°C.

- **Préparation des milieux de culture**

La gélose de Muller -Hinton (milieu spécifique pour les bactéries) prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles alors que d'autres ont été coulées par la gélose Sabouraud (milieu spécifique pour les champignons).

-Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante avant leur emploi.

- **Ensemencement**

Les boîtes de pétrie préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

- **Préparation des disques**

Des disques stériles de 6mm de diamètre sont imprégnés de chaque dilution de l'extrait de *Curcuma longa* L, et sont ensuite déposés stérilement à la surface de la gélose Muller –Hinton pour les bactéries, et sur la gélose Sabouraud pour les champignons préalablement ensemencés par les souches microbiennes.

- L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37° mesurée à l'aide d'une règle.



Figure 43 : Ensemencement des souches microbiennes et application des discs sur boites de pétries.

CHAPITRE II

Résultats et discussions

II.1. RENDEMENT

Le rendement de l'extrait brut de *Curcuma longa* L par l'extraction au Soxhlet, a été déterminé par rapport à la poudre sèche initiale.

- Le poids de l'extrait brut sec = 9.39g

Donc :

$$\text{Rendement \%} = (\text{la masse d'extrait/la masse de poudre}) * 100$$

$$\mathbf{R=12.31\%}$$

II.2. Analyse qualitative

II.2.1. Chromatographie liquide sur couche mince

Pour avoir les empreintes phénoliques de nos extraits, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant deux systèmes solvants moyennement polaires. Sous lumière UV à 365 nm, les différentes taches d'extrait qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées.

Les couleurs des spots et leurs Rf observés sous UV et après révélation chimique, sont consignés dans les tableaux 09 et 10.

Tableau 09: Couleurs des spots après révélations physique et chimique pour les deux systèmes solvants.

	systeme 1	systeme 2
	couleur de spot	
spot 1	Violet foncé	Violet foncé
spot 2	Violet	Violet
spot 3	Violet claire	Violet claire
spot 4	Jaune pale	Jaune pale

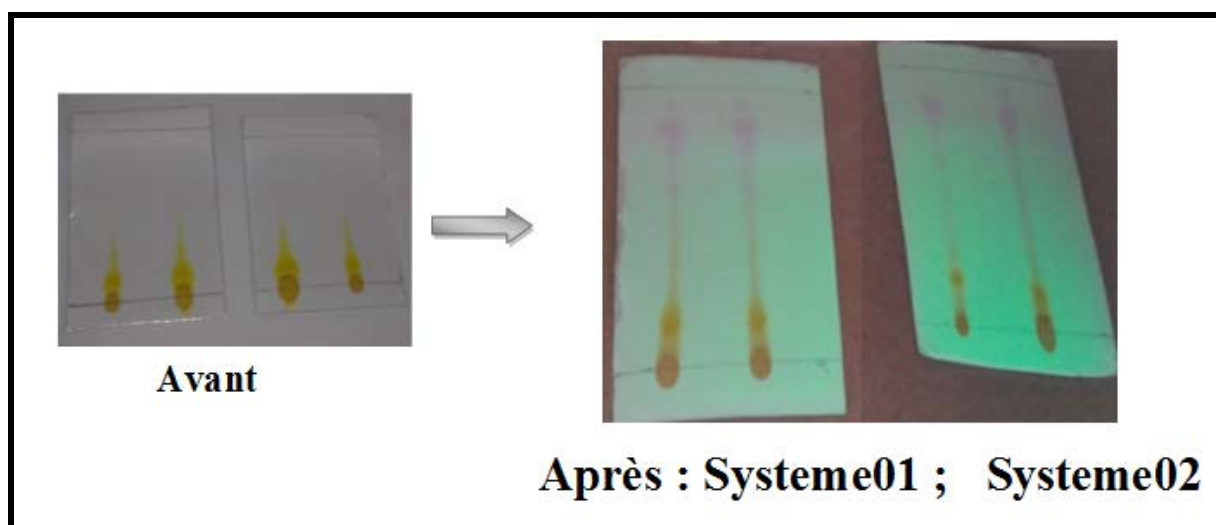


Figure 44: Chromatographie de *Curcuma longa* L sur CCM avant et après révélation physique.

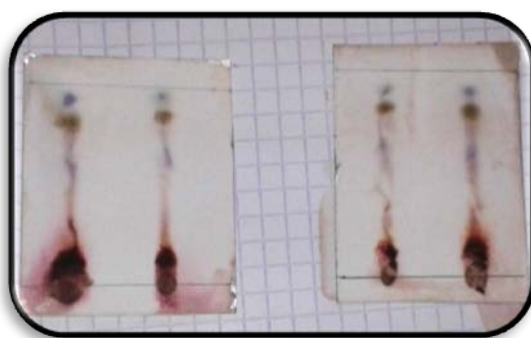


Figure 45: Résultats après révélation chimique

Tableau 10 : Comparaison entre les Rf des deux systèmes.

	systeme 1	systeme 2
	Rf	
spot 1	0,95	0,95
spot 2	0,78	0,84
spot 3	0,52	0,57
spot 4	0,15	0,18

II.3. Analyse quantitative

II.3.1. Dosage des poly-phénols

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de plante (mg EAG/gES), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**Figure 46**).

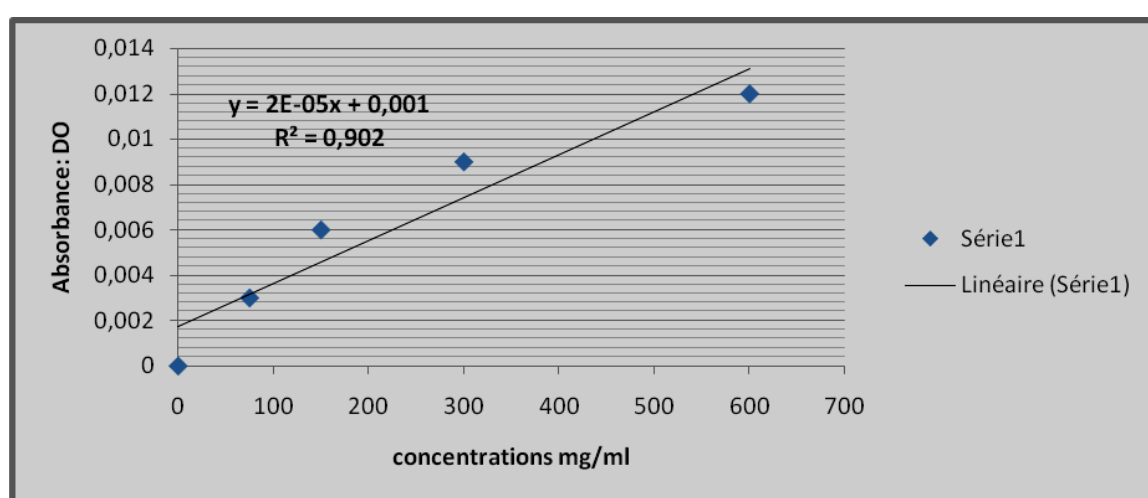


Figure 46: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

II.3.2. Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique (**Djeridane et al., 2006; Boudiaf., 2006**), la quercétine, considérée comme contrôle positif, a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, à partir de laquelle nous avons calculé la teneur en flavonoïdes, exprimée en mg équivalent de quercétine (EQ) par gramme de matière d'extrait de plante (**Figure 47**).

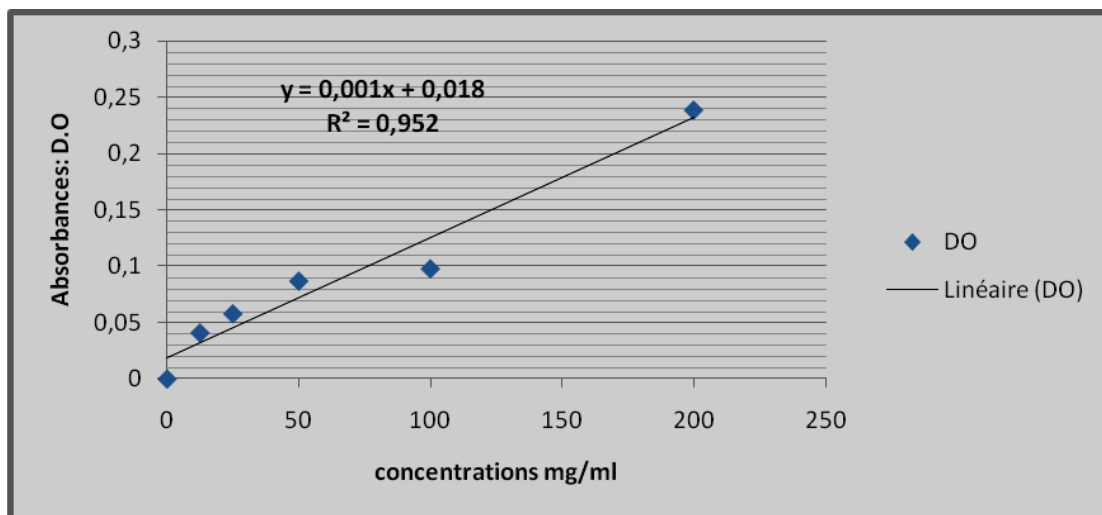


Figure 47: Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

II.4. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

❖ Le pouvoir réducteur de l'extrait de *Curcuma longa* L sur le DPPH :

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle pour le contrôle positif à la vitamine C et l'extrait de plante.

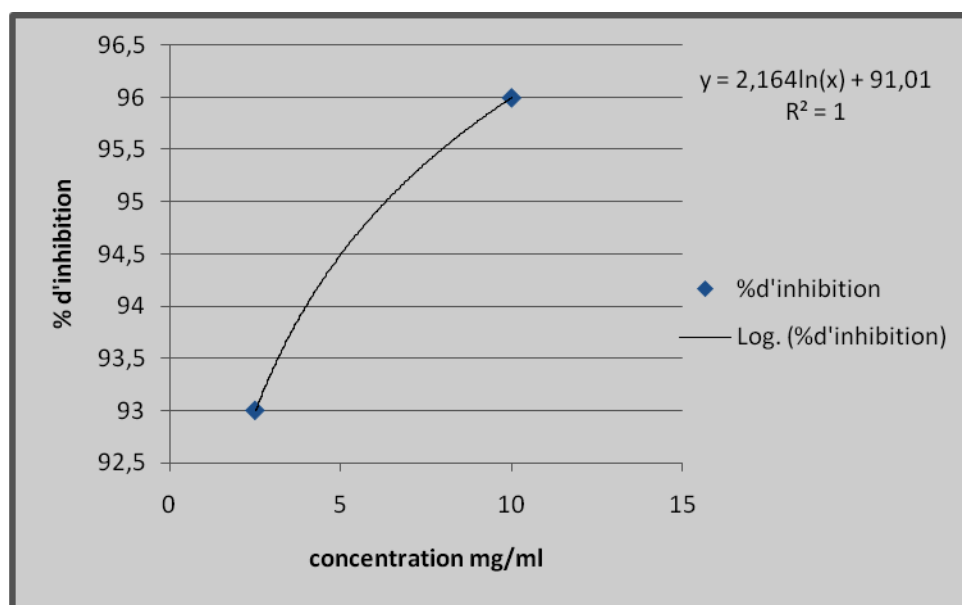


Figure 48: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

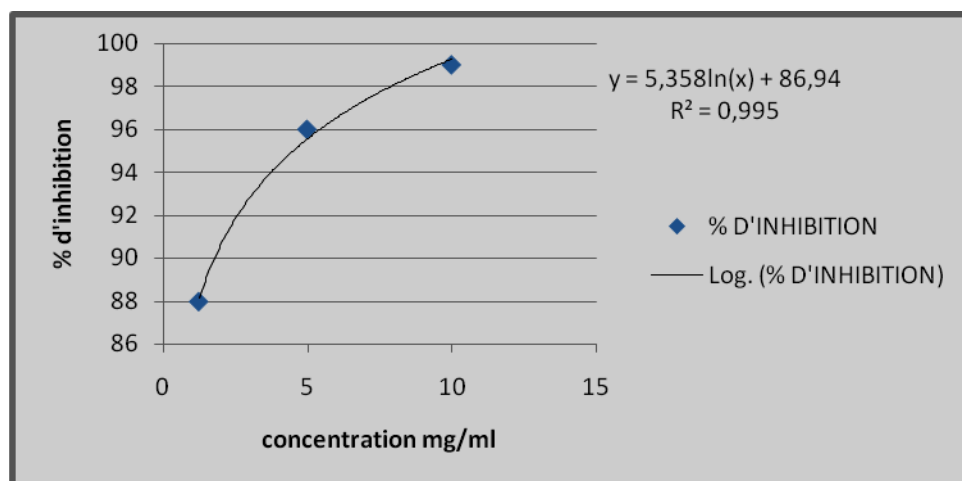


Figure 49 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait de *Curcuma longa* L.

A partir de ces courbes nous pouvons déterminer :

- Les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées.
- Les valeurs des concentrations efficaces de l'IC50, EC50, l'activité anti radicalaire et le pourcentage d'inhibition de notre extrait sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Les valeurs des concentrations efficaces, activité anti radicalaire et pourcentage d'inhibition.

	IC50 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	EC50 ($\mu\text{g} / \mu\text{g}$) DPPH)	APR	Pourcentage d'inhibition
Met	86,4 \pm 0.01	0.017 \pm 0.01	58,82	88%, 96% et 99% \pm 0.03
Acide ascorbique	110 \pm 0.003	0,022 \pm 0.003	45,45	93% et 96% \pm 0.007

II.5. Etude de l'activité antimicrobienne

Nous avons observées une activité antimicrobienne variable vis-à-vis de toutes les souches testées. Les résultats obtenus sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 12: L'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de *Curcuma longa* L à différentes concentrations.

Dilutions avec concentrations (mg/ml)	Diamètre des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm							
	SM [1000]	½ [500]	¼ [250]	1/8 [125]	1/16 [62.5]	1/32 [31.25]	1/64 [15.625]	1/128 [7.8125]
Les souches testées								
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2592	18	16	14	12	12	10	08	08
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20	18	16	16	14	13	13	10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16	16	14	10	10	8	/	/
<i>Risopus oryzae</i> M491890.1	/	/	/	/	/	/	/	/

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent que :

- Les intervalles d'inhibition varient entre : (08-18) ± 0.4 pour *Escherichia coli* ATCC 2592, (10-20) ± 0.3 pour *Bacillus subtilis* ATCC 6633, (0-16) ± 0.9 pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et nulle pour *Rhizopus oryzae* M491890.1



Figure 50: Photos représentatives des zones d'inhibition des composés phénoliques de *Curcuma longa* L.

❖ **Antibiogramme :**

Les résultats obtenus pour l'antibiogramme réalisé à l'aide des antibiotiques suivants : **Gentamicine** (10 μ g/disque), **Cefotaxime** (30 μ g/disque), **Amoxicillin** (10 μ g/disque), **Spiromycine** (100 μ g/disque), **Nalidixique** (30 μ g/disque) et **Imipenème** (10 μ g/disque), testés sur nos souches microbiennes.

Tableau 13: Résultats de l'antibiogramme

Antibiotique (μ g/disque)		IPM	NA	Sr	GN	CTX	AMC
		10	30	100	10	30	10
Souches testées		Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	60	22	0	-	-	-
Gram-	<i>E.coli</i>	60	42	-	38	30	0
	<i>Bacillus subtilis</i>	40		30			

• Témoin n'a aucune activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les souches testées.

II.2. Discussion

II-2. 1. Rendement

Le choix de *Curcuma longa* L, est basé sur une prospection au niveau des herboristes de la région. Le calcul du rendement d'extraction des principes actifs de cette épice révèle l'importance de cette dernière. En effet il est difficile de comparer la valeur de notre rendement avec d'autre études, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques de la plante ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage, de la récolte et aussi des conditions dans les quelles l'extraction a été effectuée. (Lee et al., 2003)

Par ailleurs l'extraction par Soxhlet, nous a permis d'obtenir un rendement de 12.31%, en comparaison avec une autre étude où elle a été effectuée par macération (9.25%) (Boukri et al., 2014), nous en tirons que l'extraction à chaud par Soxhlet représente une méthode de choix plus économique en terme de rendement, de temps et de solvant.

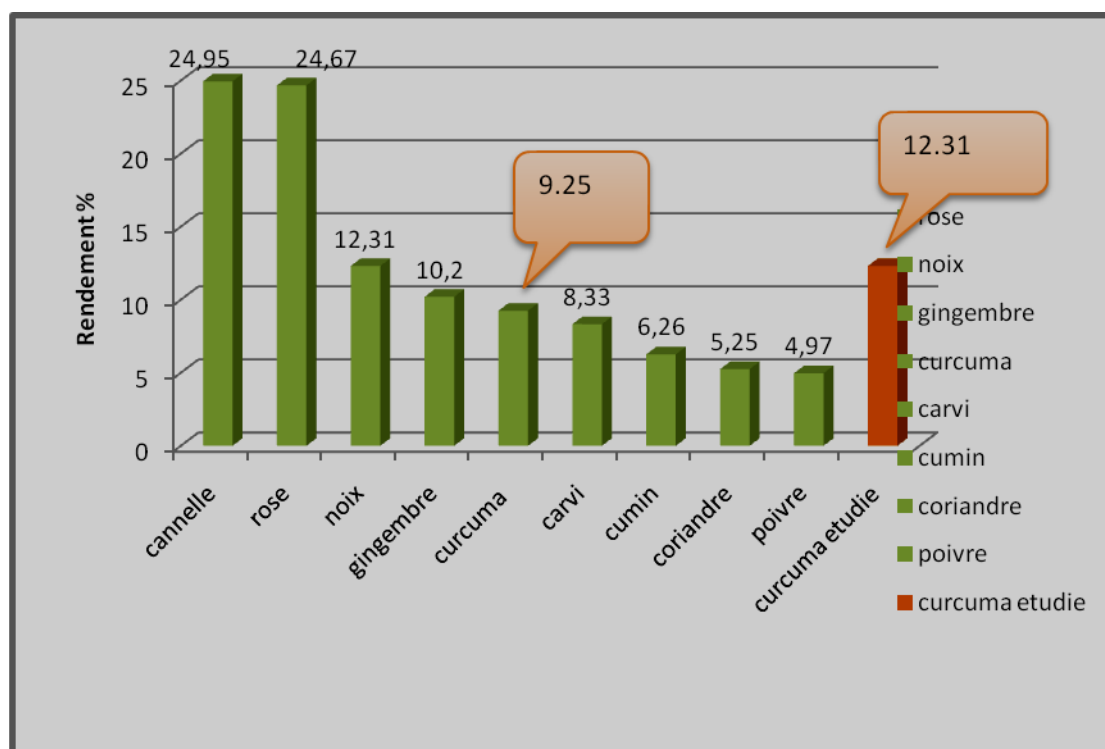


Figure 51 : Rendement d'extraction de quelques épices et parmi lesquelles le *Curcuma longa* L.

II.2. 2. Chromatographie liquide sur couche mince

Selon les résultats obtenus sur le chromatogramme :

- Le deuxième système donne une meilleure résolution donc séparation des différents composants de l'extrait méthanolique de *Curcuma longa* L.
- D'après la différence entre les RF obtenus dans, la séparation par chromatographie sur colonne peut se faire facilement et les composés purs isolés pourront être identifiés par RMN.
- En ce qui concerne l'identification des composés, nous avons comparé les couleurs et RF obtenus avec d'autres études sur la même plante. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Comparaison des couleurs et RF obtenus avec d'autres études

	SYSTEME 1		SYSTEME 2		RESULTATS D'UNE AUTRE ETUDES		
	RF	COULEUR DE SPOT	RF	COULEUR DE SPOT	RF	COULEUR DE SPOT	REFERENCE
SPOT 1	0,95	Violet foncé	0,95	Violet foncé	C : 0.93	Violet foncé	(Rohman., 2012)
SPOT 2	0,78	Violet	0,84	Violet	DMC : 0.76	violet	
SPOT 3	0,52	Violet claire	0,57	Violet claire	BDMC : 0.55	Violet claire	
SPOT 4	0,15	Jaune pale	0,18	Jaune pale	(0,00-0,25)	Jaune pale	(Bandyukova et al., 1973)

C :Curcumin, DMC : De-methoxycurcumin, BDMC : bis demethoxycurcumin

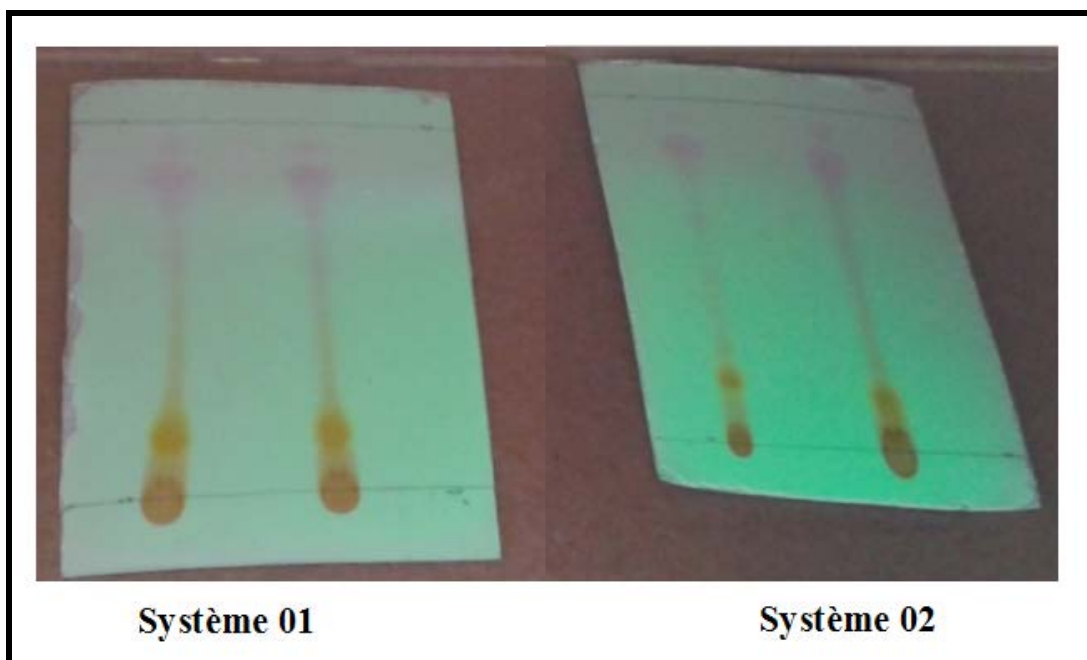


Figure 52: Résultats de l'analyse chromatographiques (CCM) de l'extrait du rhizome de *Curcuma longa* L.

- Les résultats permettent d'attribuer les 3 spots dont les Rf sont:0.95, 0.84, 0.57, à la Curcumin, la De-methoxycurcumin, et la bis-demethoxycurcumin à respectivement. (Rohman., 2012) (voir Tableau A dans l'annexe).
- Pour le 4^{ème} spot, une étude nous a permis de l'identifier comme une flavonoïde et plus précisément un polyhydroxyflavone (Bandyukova et al., 1973), et une autre étude nous confirme qu'il est une dihydroflavonol en se basant sur sa couleur jaune pale (Lahouel., 2005) (Tableau B dans l'annexes).

II.2.3.1. Dosage quantitatif des polyphénols

Les résultats des calculs nous permettent d'obtenir une teneur en polyphénols totaux égale à : **18.125 mg EAQ/g ES±0.01.**

Le dosage quantitatif des poly-phénols a donné une teneur très importante par rapport de celle trouvée par (Turki G., 2012) dans son étude sur le *Curcuma longa* L avec une valeur enregistrée de 4.14mg EAQ/g Ext

Cette différence peut être due par la faible spécificité du réactif de « Folin-Ciocalteu » qui est l'inconvénient principal de ce dosage colorimétrique.

Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tout les groupe d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et protéines...etc (Vuorela., 2005; Gomez-Caravaca et al., 2006).

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante, ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (température, sécheresse...) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tel que les poly-phénols (Falleh et al., 2008).

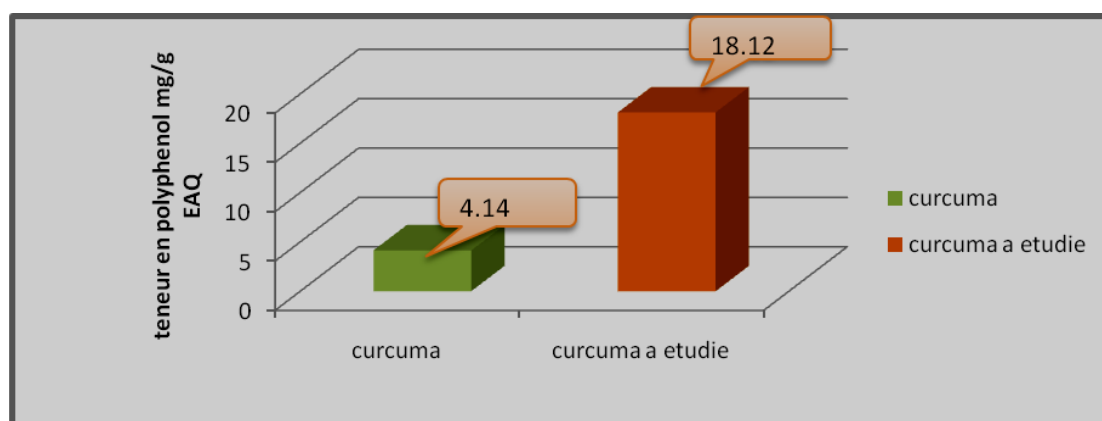


Figure 53: Comparaison des teneurs de *Curcuma longa* L en poly-phénols

II.2.3.2. Dosage quantitatif des flavonoïdes

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de poly-phénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe poly-phénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés (Gomez-Caravaca et al., 2006).

Les résultats du dosage des flavonoïdes d'après les calculs donnent une teneur de :

5.718 mgEQ/g ES±0.04.

L'examen de résultats obtenus laisse constater qu'il n'y a pas toujours une corrélation positive entre les teneurs d'un épice en poly-phénol et en flavonoïdes.

Dans notre cas l'extrait de *Curcuma longa* L est riche en polyphénol « curcuminoïdes » (18.125mgEQ/gES) et modéré en flavonoïdes « dihydroflavonol » (5.718 mgEAG/ g ES).

Une comparaison avec l'étude de (Boukri et al., 2014) donne pratiquement les mêmes résultats (Figure 54).

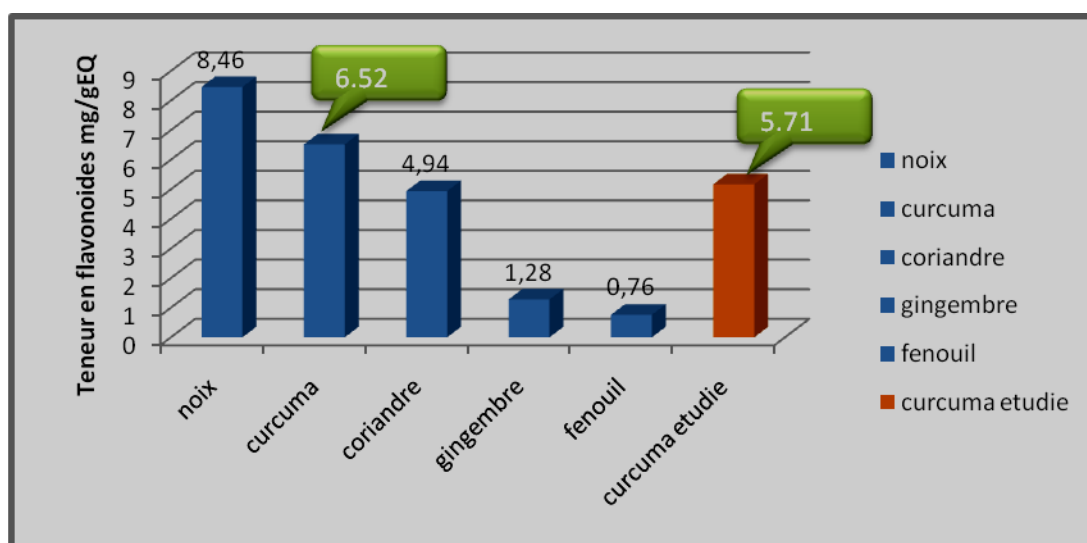


Figure 54 : Comparaison des teneurs de *Curcuma longa* L en flavonoïdes.

II.2.4. Etude de l'activité anti oxydante

Pour la capacité de piégeage de radicaux libres DPPH par notre extrait, l'IC₅₀ a été déterminé afin de pouvoir comparer cette capacité par rapport à celle de l'acide ascorbique comme molécule de référence.

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que la réduction de 50% du DPPH a été atteinte par notre extrait en 30min ce qui en fait une réaction intermédiaire en terme de cinétique.

L'IC₅₀ de l'acide ascorbique 110 µg /ml (**0.11mg/ml**) ± 0.003 est proche de celle obtenue par (Talbi et al., 2014) a une valeur de 0.13mg/ml ±0.001.

L'IC₅₀ et L'EC₅₀ de notre extrait sont égales à 86.4 µg /ml ±0.01 et (**0.017µg /µg DPPH**) ±0.01 respectivement ce qui est inférieur des celles de l'acide ascorbique sachant que plus la valeur de l'IC₅₀ et EC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante est importante.

Aussi pour le pouvoir anti radicalaire nous obtenons un résultat de 58% pour notre extrait qui est légèrement supérieure à celle enregistrée par l'acide ascorbique avec 45%.

En ce qui concerne le pourcentage d'inhibition du DPPH, nous avons remarqué qu'à concentrations égales de 10mg/ml notre extrait présente une activité antioxydante plus élevée 99% \pm 0.03, que celle de l'acide ascorbique 96% \pm 0.007, comme indiqué sur l'histogramme (**Figure 55**).

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que : les composés phénoliques contenus dans notre plante (flavonol et curcuminoïdes), sont doués d'un pouvoir antioxydant très important.

-Donc, on peut conclure que le *Curcuma longa* L, constitue un excellent antioxydant naturel de substitution.

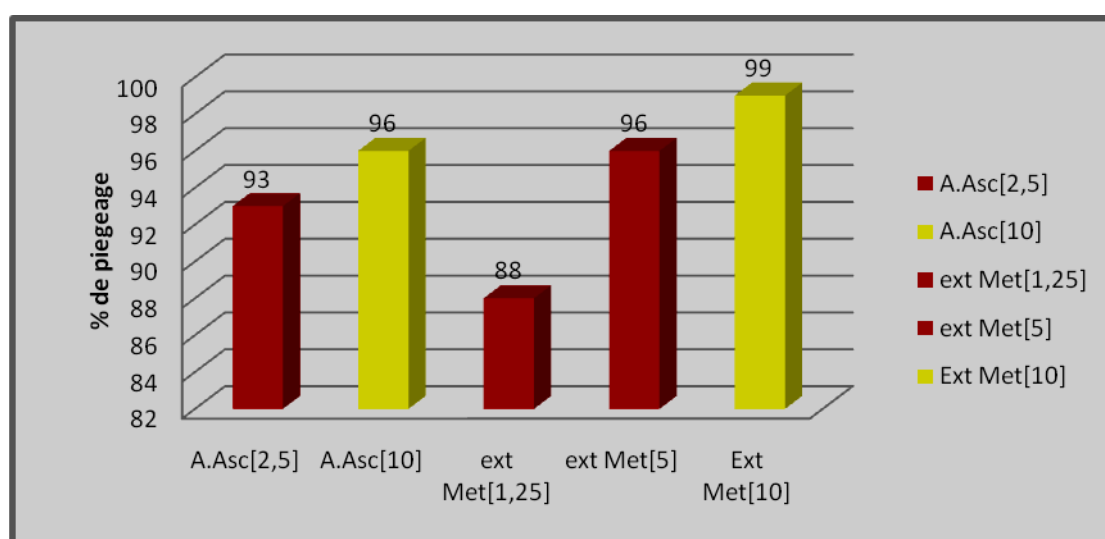


Figure 55 : Activité antioxydante de l'acide ascorbique et l'extrait méthanolique de *Curcuma longa* L à différentes concentrations

II.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

- Nous remarquons une activité modérée pour *Staphylocoque aureus* avec un diamètre d'inhibition variant de 8 à 16mm \pm 0.7.

Plus importante avec une zone d'inhibition allant de 8 à 18mm \pm 0.4, pour *Escherichia coli* ATCC 2592 et de 10 à 20 \pm 0.3 pour *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Ce qui démontre la sensibilité de ces souches à notre extrait.

- Par contre *Risopus oryzae* M491890.1 est une souche très résistante.

Nous effectuons une comparaison avec quelques références bibliographiques sur les mêmes souches microbiennes:

D'après (Zeghad., 2008), la zone d'inhibition d'*E- Coli* ATCC 2592

varie de (8 à 18) mm, ce qui rejoint le résultat de notre étude.

La même étude révèle que pour les *Staphylocoque aureus* ATCC 25923, l'intervalle des zones d'inhibitions est entre (10 à 15) mm, cela converge également avec nos résultats.

On en conclut que nos résultats sont plus au moins homogènes avec ceux relevés dans la littérature.

Ce qui est remarquable c'est la résistance de *Risopus oryzae* M491890.1

- La comparaison entre l'effet antibactérien contre les trois souches montre une plus grande sensibilité du *Bacillus subtilis* en comparant avec *E. Coli* et *Staphylococcus aureus*, (Figure56).

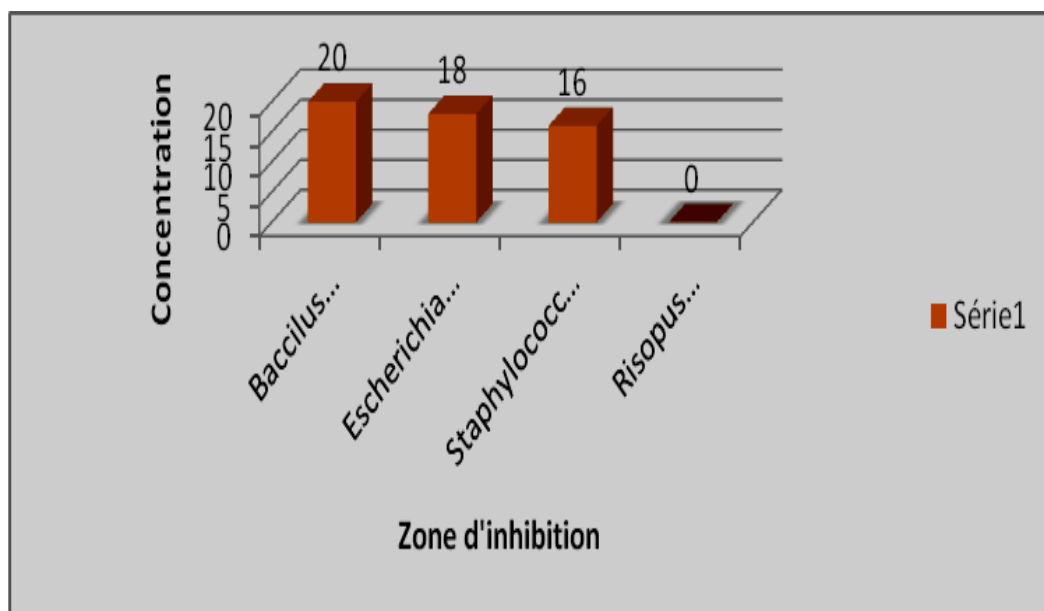


Figure 56: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de *Curcuma longa* L sur les différentes souches dans la solution mère.

II.2.6. 1. Antibiogramme

En vue des résultats obtenus pour l'antibiogramme et tenant compte des concentrations des disques d'antibiotiques, le pouvoir inhibiteur de *Curcuma longa* L sur *E. Coli* et *Bacillus subtilis* est très satisfaisant en comparaison à celui des antibiotiques NA, Sr, et CTX ce qui est très encourageant pour développer des préparations médicamenteuses à base de *Curcuma longa* L.

On peut constater aussi que notre extrait brut est capable de donner un effet inhibiteur important même à de très faibles concentrations

Conclusion générale

Ce travail nous a permis en premier lieu de maîtriser des techniques analytiques universelles de base en passant de l'extraction à l'analyse qualitative et quantitative des métabolites secondaires issus du rhizome du *Curcuma longa* L ainsi que sa valorisation par l'évaluation de son potentiel antioxydant et antimicrobien.

La partie rhizome de *Curcuma longa* L, soumise à l'extraction au Soxhlet à chaud, nous a permis d'obtenir un rendement de 12.31% ce qui est plus intéressant en terme de quantité, d'économie de temps et de solvant que l'extraction à froid par macération.

Le screening chimique par chromatographie liquide sur couches minces CCM nous a donné une idée sur les classes de métabolites secondaires présents dans notre extrait essentiellement des poly-phénols, et leurs RF nous ont permis de les identifier de même que les systèmes de solvants utilisés nous permettent d'établir les conditions de leur séparation par chromatographie sur colonne.

Le dosage des poly-phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu, et des flavonoïdes en utilisant la méthode au trichlorure d'aluminium, nous a permis d'évaluer la richesse de notre extrait en ces composés: la teneur en poly-phénols totaux est de 18,125 (mg EAG \g) représentés majoritairement par les curcuminoïdes. Alors que la teneur en flavonoïdes est de 5,718 (mg EAG \g).

Afin de valoriser notre épice, nous nous sommes proposées d'en évaluer l'activité antioxydant, pour cela le test au DPPH a été utilisé, et les résultats ont montré que la meilleure activité est obtenue pour la concentration la plus élevée (10ml/mg) à 99% d'inhibition ce qui en fait un agent antioxydant de première classe qui peut être employé pour des applications aussi bien thérapeutiques qu'alimentaires, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et sont d'excellents conservateurs alimentaires naturels.

Pour l'activité antibactérienne de *Curcuma longa* L, elle s'est avérée prononcée avec le *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*, et modérée avec *Staphylococcus aureus* mais sans activité avec *Risopus oryzae*, ces résultats obtenus *in vitro* ne constituent qu'une première étape de la recherche des produits antimicrobiens naturels qui sont proposés dans le domaine de la santé.

Cela nous a permis d'établir une corrélation entre le contenu poly phénolique de notre extrait et les activités biologiques testées.

Pour finir, le *Curcuma* est un agent antioxydant naturel prometteur et non toxique, ayant un large spectre de fonctions biologiques et devrait trouver une application en tant que nouveau médicament, indiqué notamment pour les désordres inflammatoires, la carcinogenèse, et les pathologies causées par le stress oxydatif.

C'est ainsi que le *Curcuma* passera de simple épice à un véritable médicament, dont les multiples indications sont encore à découvrir et à définir, et la biodisponibilité à améliorer par des techniques modernes comme la nano-encapsulation, et à partir de la formule chimique de la curcumine, découvrir de nouvelles molécules plus puissantes et aux effets plus ciblés.

Références bibliographiques

- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., 2007.** Revue du Rhumatisme. Rhumatisme.Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases. Rôle dans les maladies rhumatismales. Revue médicale. 74 ; 636-643.
- Aggarwal B.B., Bhatt I.D., Ichikawa H., Ahn K.S., Sethi G., Sandur, SK., 2006.** Curcumin-biological and medicinal properties. Turmeric. The genus Curcuma. Taylor and Francis Group. 297-368.
- Alekshun M.N., Levy S.B., 2007.** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell. 128; 1037-1050.
- Park C.H., Hahm E.R., Park S., Kim H.K., Yang C.H., 2005.** Febs Lett. 579; 2965- 2971.
- Antwerpen P.V., 2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myclopéroxydase / Peroxyole d'hydrogène / Clilorure. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques Bruxelles.
- Atti I., 2014.** Mémoire de master academique en biochimie. Univ. Kasdi Merbah Ouargla.
- Bandyukova V.A., Shinkareako A.L., 1973.** The thin layer chromatography of flavonoids. Chemistry of natural compound. 9(1); 17-21.
- Barzegar A., et Ali A., 2011.** Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical-Scavenging Activity of Curcumin. Plos One. 6 (10); e26012.
- Bharath S., Hsu M., Kaur D., 2002.** Glutathione, iron and Parkinson's disease. Biochem. Pharmacol. 64; 1037-48.
- Boudiaf k., 2006.** Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de nigella sativa. Mémoire de magister. Setif.
- Boukri N., 2014.** Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout. Université Kasdi Merbah Ouargla. 48-57.
- Boullard B., 2001.** Dictionnaire des plantes médicinales du monde. Paris, Estem. 174.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., 2001.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, Plant Science. 161; 839-851.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Sci Technol. 28 ; 25-30.
- Daglia M., 2011.** Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology. 23; 1-8.
- Delattre J., Beaudoux J.L., BONNEFONT D., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. 87 ; 108.
- Delaveau P., 1987.** Les épices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Paris. Albin Michel. 130-136.

- Djeridane A., Yous M., Nadjemi B., Boutassouna D., stocker P., Vidal N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97; 654-660.
- Dulger B., Gonuz A., 2004.** Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences.* 7 (9); 1559-1562.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdely, C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. Organs, and their biological activities. *C. R. Biologies.* 331; 372-379.
- Favier A., 1997.** Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Biol. Clin.* 55 (1) ; 9-16.
- Favier A., 2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique,* 108-115.
- Gaurisankar S., Tanya D., 2008.** Anti cancer effects of curcumin. *Cycle of life and death. Cell, Div.*
- Goel A., Kunnumakkara A.B., Aggarwal B.B., 2008.** *Biochem. Pharmacol.* 75; 787–809.
- Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., 2006.** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41; 1220-1234.
- Goudable J., Favier A., 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Laboratoire de biochimie C. Hôpital Edouard. Herriot, Lyon. GREPO. Université de Grenoble. la Tronche.
- Grugeau C., 1995.** *Curcuma longa* L. Thèse de doctorante en pharmacie. Université limoge.
- Gupta C., Gorkem K, et Bharat B., 2013.** « Curcumin, a Component of Turmeric: From Farm to Pharmacy ». 1: 2–13.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., 2007.** Le stress oxydant. *Rev. Med. Liege.* 62(10); 628-638.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2007.** *Free Radicals in Biology and Medicine,* 4th ed. Oxford University Press. 20-31.
- Halvorsen B.L., Carlsen M.H., Philip K M., Bohen S K., Holte K., Jacobs D R., BLOMHOFFER J.R., 2006.** Content of redox-active compounds (antioxidants) in foods consumed in the United States *Am J Clin Nutr.* 84; 95-135.

- Hombourger C., 2010.** Le Curcuma, de l'épice au médicament. Thèse de Doctorat en Pharmacie.
- Itokawa H., Shi Q., Akiyama T., Morris-Natschke S., Lee K.H., 2008.** Recent advances in the investigation of curcuminoids.
- Jansen P.C.M., Grubben G.J.H., Cardon D., 2005.** Ressources végétales de l'Afrique tropicale 3. Colorants et tanins. Wageningen, Pays-Bas, PROTA. 238
- Jayaprakasha G.K.L., Jagan M.R., 2005.** Chemistry and biological activities of *C. longa*. Trends in Food Science & Technology. 533-548.
- Jenkins G., 2002.** Molecular mechanisms of skin ageing. Mechanisms of Ageing and Development 123. 7: 801-810.
- Jeong G.S., Oh G.S., Pae H.O., Jeong S.O., Kim Y.C., Shin M.K., Seo B.Y., Han S.Y., Lee H.S., Jeong J.G., 2006.** Comparative effects of curcuminoids on endothelial heme oxygenase-1 expression. Ortho-methoxy groups are essential to enhance heme oxygenase activity and protection. 38; 393-400.
- Jurenka J.S., 2009.** Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*. A review of preclinical and clinical research, Altern Med Rev.
- Kanoun K., 2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. Rayhane de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire de Magister Université de Tlemcen.
- Koechlin-ramonatxo C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition clinique et métabolisme. 20; 165-177.
- Lahouel M., 2005.** Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat .Université Mentouri Constantine.
- Lee A.T., Proenc C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araujo M.E.M., 2003.** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. Food Chem. 103; 778-786.
- Liu L., Shang Y., Li M., Han X., Wang J., Wang J., 2015.** Curcumin ameliorates asthmatic airway inflammation by activating nuclear factor-E2-related factor 2/heme oxygenase (HO)-1 signalling pathway. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 42; 520-529.
- Maamri S., 2008.** Etude de *pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien. Dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire de Magister Université de Boumerdes.

Manandhar N.P., 1995. Substitute spice in Nepal. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants.* 3; 7-77.

Marfak A., 2011. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools, formation des depsides. Thèse de doctorat Université de Limoges.

Mata A.T., Proenc C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araujo M.E.M., 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* 103; 778-786.

Matés J., Perez-Gomez C., Nunez I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *ClinBiochem.* 32 ; 595-603.

Menon V., Sudheer A.R., 2007. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin, *Adv Exp Med Biol.* 595; 105-25.

Morel J.M., 2008. Traité pratique de Phytothérapie, *Curcuma longa.* 211-212.

Muanda F.N., 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine-Metz.

Nkhili E., 2009. Polyphénols de l'Alimentation. Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant Thèse de doctorat Université de MARRAKECH. 187-193

Nomura K., Imai H., Koumura T., Kobayashi T., Nakagawa Y., 2000. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J.* 351; 183-193.

Ouelbani R., Bensari S., Mouas T.N., Douadi K., 2016. Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology.* 194; 196-218.

Parekh J., Chanda S.V., 2007. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology.* 31; 53-58.

Park C.H., Hahm E.R., Park S., Kim H.K., Yang C.H., 2005. *Febs Lett.* 579; 2965- 2971.

Penso G., 1986. Les plantes médicinales dans l'art et l'histoire. Paris. Roger Da Costa.

Perrone J., 2015. Biological and therapeutic activities and anticancer properties of curcumin, *Exp Ther Med.* 10(5); 1615–1623.

Perry M.C., 2008. Evaluation de la curcumine comme agent anti-cancéreux dans le traitement des tumeurs cérébrales. Mémoire Chimie Montréal.

Pincemail J., 1998. Espèces oxygénées en médecine humaine: une approche didactique. Vaisseaux, Coeur, Poumon. 3 ; 133-8.

Pincemail J., Lecomte J., Collart E., Castiaux J.P., Defraigne J., 2001. Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. Vaisseaux Coeur Poumons. 6; 1-3.

Portes E., 2008. Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes. Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de doctorat Université Bordeaux I. 44-46.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2003. La chimiothérapie antimicrobienne. In. Microbiologie, 2^{ème} ed. Bruxelles. 806-811.

Rohman A., 2012. Analyse des curcuminoïdes dans les produits alimentaires et pharmaceutiques. Int. Food Res. J. 19; 59-66.

Rota M.C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayor J.A., Jordan M.J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food control. 19; 681-687.

Roussel A.M., 2009. Qui manque d'antioxydants et comment le savoir ? Cahiers de nutrition et de diététique. 7.

Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P., 2011. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. Internationale Pharmaceutica Scientia, 1 (1); 25-41.

Shahide N., 2016. Valeurs thérapeutiques de curcuma. Laboratoire phytomisan France.

Shimizu H., (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, Stroke, 35 (9); 2072-2077.

Shishodia S., Sethi G., Aggarwal B.B., 2005. Curcumin: getting back to the roots. 1056; 206-17.

Souchard J.P., Arnal J.F., Rochette L., 2002. Les radicaux libres et le stress oxydatif radicalaire. Techniques en biologie. 23 ; 245-257.

Tajini A., Taibi A., 2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de curcuma longa. université abou bekr belkaid – tlemcen.

Talbi H., Boumaz A.K., El-mostafa J., Talbi, A., 2014. Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L. 05.

Turbide M., 2013. L'aromathérapie, huiles essentielles du Québec et du monde, application thérapeutique. Collection santé-arome.

Turki G., Marfak A., 2012. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de Leur reactivite avec les radicaux issus des Alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat. Limoges.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39 ; 44-84.

Vuorela S., 2005. Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. université Helsinki.

Watson J.L., Hill R., Yaffe P.B., Greenshields A., Walsha M., Lee P.W., Giacomantonio C. A., Hoskin D.W., 2010. *Cancer Lett.* 297; 1-8.

Wong J.G; Anderson R.A; Graham G.M; Chu M.C; Sauer M.V; Guarnaccia M.M; Lobo R.A., 2006. The effect of cinnamon extract on insulin resistance parameters in polycystic ovary syndrome: a pilot study.

Wun C., 2003. Safty and antiinflammatory activity of curcumin. *Compoment Med Res.* 131; 682-91.

Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Ouar Korich M.N., 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb.* 91.

Young I.S., Woodside J.V., 2001. Antioxidant in health. *Science.* 54 (3); 176-186.

Youssef L., 2016. Fonctionnalisation de biopolymères extraits de macroalgues pour encapsuler des principes actifs hydrophobes. Thèse de Doctorat en biochimie.

Zeghad N., 2008. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique et évaluation de leur activité antibactérienne. *Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis.* 77.

Annexes

❖ SOXHLET :

Définition: L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première



Annexe01 : Soxhlet de labo biochimie

❖ ROTAVAPEUR :

Definition : L'évaporateur rotatif est un système permettant de vaporiser le composé le plus volatil d'un mélange. Il est utilisé en particulier quand on souhaite récupérer l'huile essentielle pure contenue dans un mélange d'huile essentielle et de solvant.



Annexe02 : Appareillage de rotavapeur

❖ SPECTROPHOTOMETRE

Definition: est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre.



Annexe03 :spectrophotometre

❖ LA LAMPE UV

Definition: est une ampoule fluorescente qui envoie des rayons ultraviolets pour La visualisation de la plaque CCM.



Annexe04 : Lampe UV.

❖ L'ETUVE :

Définition: Chambre de bains dont on élève la température pour faire transpirer. Local où la température est très élevée et la chaleur humide. Appareil utilisé en microbiologie pour maintenir les cultures de microbes à température constante et donc faciliter leur développement.



Annexe05 : Etuve Memmert.

Tableau A : Les RF du curcuminoïdes obtenu par l'étude de Rohman.,(2012)

	<i>Curcuma longa</i> L(Rhizome)
Standard	Methanol
C :0.95	0.93±0.008
DMC :0.85	0.76±0.020
BDMC :0.54	0.55±0.026

Tableau B : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes (Bandyukova et al., 1973)

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8, tri OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu claire (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH Substitué
Jaune terne Jaune Fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH Libre
Jaune vert brillant	5 OH libre ou 5 OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone Flavanones
Jaune pâle	Dihydroflavonols

Résumés

Résumé

Le *Curcuma longa* L, est une plante utilisée et reconnue pour ses vertus thérapeutiques depuis l'antiquité en médecine traditionnelle. Ainsi, le présent travail porte sur une étude phytochimique qualitative et quantitative des poly-phénols et flavonoïdes majoritaires contenus dans cette plante, et la corrélation de ces résultats avec des activités antioxydante et antibactérienne avérées.

L'extrait préparé à partir du rhizome séché et broyé de *Curcuma longa* L par une extraction au Soxhlet à chaud, a donné un rendement important de 12.31%.

L'analyse qualitative des métabolites secondaires contenus dans notre extrait, a été réalisée par chromatographie sur couche mince CCM, par révélation physique et chimique et qui ont montré une forte présence majoritaire de poly-phénols.

La quantification des poly-phénols et des flavonoïdes a été effectuée par spectrophotométrie, leurs dosages par des méthodes analytiques classiques, ont révélé une teneur de 18.125 mg EAG/g pour les poly-phénols et 5.718 mg EQ/g pour les flavonoïdes.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de notre extrait réalisé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH, a montré une forte activité anti-oxydante (99%) supérieure à celle enregistrée avec l'acide ascorbique (96%) aux mêmes concentrations.

Quand à l'activité antibactérienne, elle a été réalisée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, les résultats ont montré une efficacité de notre extrait contre la plupart des souches testées même à de très faibles doses pour certains.

Mots clés : Poly-phénols, Curcuminoides, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

ملخص

الكرم هو نبات مستخدم منذ القدم في الطب التقليدي، معترف به لخصائصه العلاجية . وبالتالي، يركز هذا العمل على دراسة نوعية وكمية لل polyphenols الكيميائي النباتي و flavonoides في السيطرة على هذا النبات والترابط بين هذه النتائج مع الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للجراثيم .

المستخلص المحضر من جذمور الكرم المجفف و المطحون و المستخرج بواسطة جهاز Soxhlet أعطانا مردود قدر ب: 12.31 %

أدى التحليل النوعي للمركبات الايضية الثانوية الموجودة في مستخلص الكرم إلى إظهار مدى غناه بال polyphenols

كما أدى التحليل الكمي إلى إبراز محتواه من polyphenols بقيمة تعادل 18.12mg/g و EAG و flavonoides بقيمة تعادل 5.71mg/g EQ

و أما بالنسبة لتقييم قدرة المستخلص المضادة للأكسدة فقد اظهر هذا الأخير نشاط عالي قدر ب: 99% مقارنة بنشاط الفيتامين س (96%) المسجل في نفس التركيز.

وفيما يخص النشاط المضاد للبكتيريا فقد أوضحت النتائج أن هناك فعالية للمستخلص ضد معظم السلالات المختبرة حتى عند مستويات منخفضة عند البعض منها .

الكلمات المفتاحية: البوليفينولات ، الكركمينويد ، الأنشطة المضادة للأكسدة ، الأنشطة المضادة للجراثيم

Abstract

Curcuma longa L, is a plant used since ancient times in traditional medicine and recognized for its therapeutic virtues. Thus, the present work deals with a qualitative and quantitative phytochemical study of the majority polyphenols and flavonoids contained in this plant and the correlation of these results with proven antioxidant and antibacterial activities.

The extract prepared from the dried and ground rhizome of *Curcuma longa* L by Soxhlet extraction under hot conditions gave a high yield of 12.31%.

The qualitative analysis of the secondary metabolites contained in our extract was carried out by chromatography on a thin layer TLC by physical and chemical revelation and which showed a strong majority presence of polyphenols.

Quantitation of the polyphenols and flavonoids was carried out by spectrophotometry, their assays using conventional analytical methods revealed a content of 18.125 mg / g EAG for polyphenols and 5.718 mg / g EQ for flavonoids.

The evaluation of the antioxidant power of our extract, which was carried out using the DPPH free radical scavenging method, showed a strong antioxidant activity (99%) greater than that recorded with ascorbic acid (96%) at the same concentrations.

As for the antimicrobial activity, it was carried out by the disk diffusion method, the results showed an efficacy of our extract against most of the strains tested even at very low doses for some.

Mots clés : Polyphenols, Curcuminoides, antioxydant activity, antimicrobial activity.

Année universitaire : 2016-2017

Présenté par : BOUKEHIL HOUDA
SEGGANI SORAYA

Corrélation entre le contenu polyphénolique et l'activité antioxydante et antimicrobienne *in vitro* de *Curcuma longa* L.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention de diplôme de Master en Biochimie/Nutrition Moléculaire et Santé.

Résumé :

Le *Curcuma longa* L, est une plante utilisée et reconnue pour ses vertus thérapeutiques depuis l'antiquité en médecine traditionnelle. Ainsi, le présent travail porte sur une étude phytochimique qualitative et quantitative des poly-phénols et flavonoïdes majoritaires contenus dans cette plante et la corrélation de ces résultats avec des activités antioxydante et antibactérienne avérées.

L'extrait préparé à partir du rhizome séché et broyé de *Curcuma longa* L par une extraction au Soxhlet à chaud, a donné un rendement important de 12.31%.

L'analyse qualitative des métabolites secondaires contenus dans notre extrait à été réalisée par chromatographie sur couche mince CCM, par révélation physique et chimique et qui ont montré une forte présence majoritaire de poly-phénols.

La quantification des poly-phénols et des flavonoïdes a été effectuée par spectrophotométrie, leurs dosages par des méthodes analytiques classiques, ont révélé une teneur de 18.125 mg EAG/g pour les poly-phénols et 5.718 mg EQ /g pour les flavonoïdes.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de notre extrait réalisé par la méthode du piégeage du radical libre DPPH, a montré une forte activité anti-oxydante (99%) supérieure à celle enregistrée avec l'acide ascorbique (96%) aux mêmes concentrations.

Quand à l'activité antibactérienne, elle a été réalisé par la méthode de diffusion des disques, les résultats ont montré une efficacité de notre extrait contre la plupart des souches testées même à de très faibles doses pour certaines.

Mots clés : Poly-phénols, Curcuminoïdes, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Laboratoire de de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales.

Membres du jury

Président du jury: Mme MECHAKRA Aicha
Rapporteur: Mme MOUAS Toma Nardjes
Examineur: Mer KITOUNI Rachid

Pr. UFM Constantine1
MCA. UFM Constantine1
MAA. UFM Constantine1

