

N° Réf :

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila
Institut des Sciences et de la Technologie Département des Sciences de la Nature et de la Vie
**Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de
Master**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie Végétale

Thème

Evaluation de l'activité antioxydante et anticoagulante des polyphénols du *Curcuma longa* L.

Préparé par:

- DEBBACHE Khawla
- GUENNICH Abir

Devant le jury composé de :

Président : HARRICHE Ouahiba	(MAA)	Centre universitaire de Mila.
Examinatrice : TALHI Fahima	(MAA)	Centre universitaire de Mila.
Promoteur : BOUKERIA Sabah	(MCB)	Centre universitaire de Mila.

Année Universitaire : 2018/2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciements

Avant toute chose, Nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la volonté pour faire ce travail.

Nous tenons à remercier vivement Madam Boukeria Sabah Vous nous avez accordé un immense honneur et un grand privilège en acceptant votre supervision pour préparer notre mémoire.

Nous vous remercions aussi pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. Nous vous prions, d'accepter dans ce travail le témoignage de notre haute considération, de notre profonde reconnaissance et de notre sincère respect.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre recherche :

Président : Madam Harriche Ouahiba

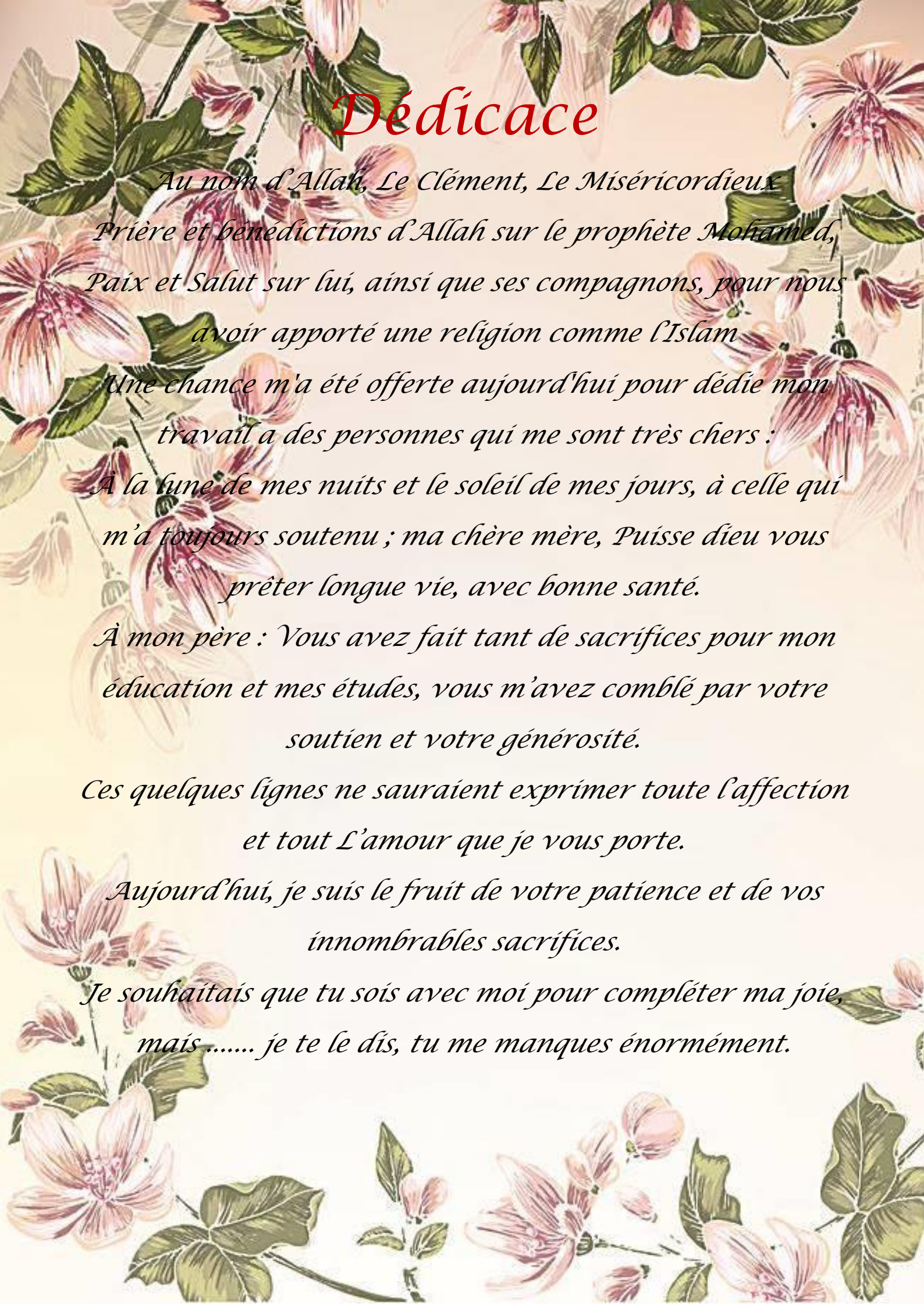
L'examinatrice : Madam Talhi Fahima

Nos vifs remerciements à tous nos enseignants, et les administrateurs du département des Sciences de la Nature et de la Vie.

Nous remercions également, Melle Nadjat Belghoul ; et toute l'équipe de laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital de Chelghoum-Laid, pour ces conseils, ces efforts avec nous.

Nous tenons à exprimer mes sincères gratitudes à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merçi



Dédicace

*Au nom d'Allah, Le Clément, Le Miséricordieux
Prière et bénédictions d'Allah sur le prophète Mohamed,
Paix et Salut sur lui, ainsi que ses compagnons, pour nous
avoir apporté une religion comme l'Islam*

*Une chance m'a été offerte aujourd'hui pour dédie mon
travail à des personnes qui me sont très chers :*

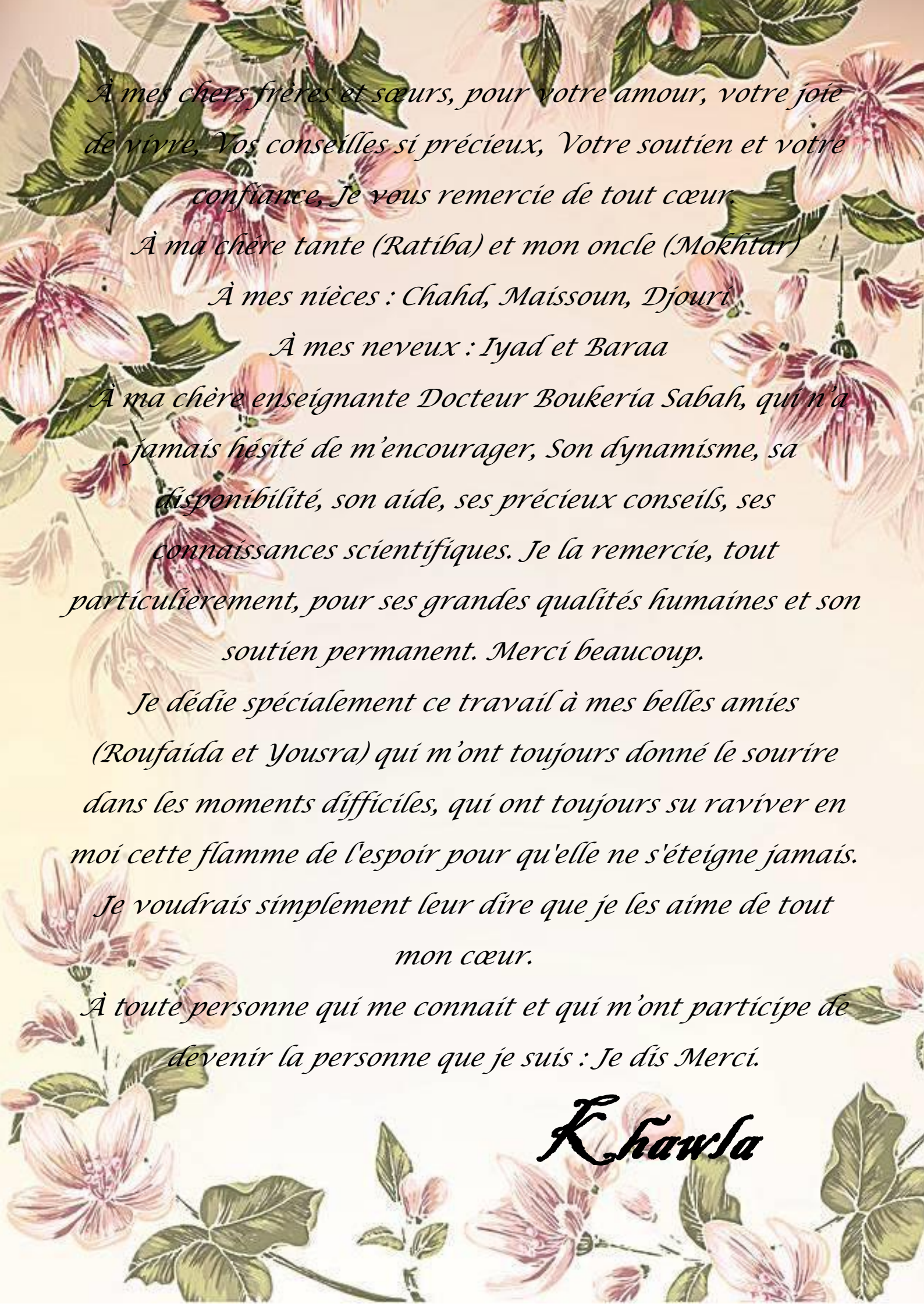
*À la lune de mes nuits et le soleil de mes jours, à celle qui
m'a toujours soutenu ; ma chère mère, Puisse dieu vous
prêter longue vie, avec bonne santé.*

*À mon père : Vous avez fait tant de sacrifices pour mon
éducation et mes études, vous m'avez comblé par votre
soutien et votre générosité.*

*Ces quelques lignes ne sauraient exprimer toute l'affection
et tout L'amour que je vous porte.*

*Aujourd'hui, je suis le fruit de votre patience et de vos
innombrables sacrifices.*

*Je souhaitais que tu sois avec moi pour compléter ma joie,
mais je te le dis, tu me manques énormément.*



*À 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.*

À ma chère tante (Ratiba) et mon oncle (Mokhtar)

À mes nièces : Chahd, Maïssoun, Djouri

À mes neveux : Iyad et Baraa

*À ma chère enseignante Docteur Boukeria Sabah, qui n'a
jamais hésité de m'encourager, Son dynamisme, sa
disponibilité, son aide, ses précieux conseils, ses
connaissances scientifiques. Je la remercie, tout
particulièrement, pour ses grandes qualités humaines et son
soutien permanent. Merci beaucoup.*

*Je dédie spécialement ce travail à mes belles amies
(Roufaïda et Yousra) qui m'ont toujours donné le sourire
dans les moments difficiles, qui ont toujours su raviver en
moi cette flamme de l'espoir pour qu'elle ne s'éteigne jamais.*

*Je voudrais simplement leur dire que je les aime de tout
mon cœur.*

*À toute personne qui me connaît et qui m'ont participé de
devenir la personne que je suis : Je dis Merci.*

Khawla

Dédicace

Je dédie ce travail à mon inspirant dans la vie, qui les mots ne le décrivent pas, mon cher papa et je lui dis : je t'aime.

Je tiens à présenter mes sincères dédicaces à ma mère qui a consacré sa vie à mon éducation et à faire mon bonheur et qui m'encourage toujours pour achever mes études tout en espérant de voir les fruits de son sacrifice.

À ma famille, mes chères sœurs Assia, Houda, Randa et Nessma, aussi à mes chers frères Fouad, Atef et Abd-El Rahim

Pour tout ce qu'ils me font pour moi, et pour leur soutien éternel : je vous adore

À mes splendides amies ; merci pour tous les bons moments et le soutien que vous allez me donné.

A une très belle femme, que je ne connaissais pas, mais elle était toujours présente dans mon cœur avec son amour et son affection infinis, tout le respect pur vous Mama Warda

A mon partenaire de vie, Djamel.

Et bien sur à mes petits anges, Loudjain Isstighfar, Maria, Abd-el noor, Aïssa, Diyaâ et mouhamed je vous aime.

Abir

Résumé

Résumé

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car ; en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies.

Le but de cette étude est de réaliser une caractérisation biochimique, ainsi que d'évaluer les activités antioxydante et anticoagulante des extraits des parties souterraines du *Curcuma longa* L. utilisé en médecine traditionnelle. Le broyat a été soumis à une extraction et fractionnement pour avoir 3 extraits : méthanolique, éthanolique et aqueux.

Les tests de screening phytochimique réalisés sur l'espèce étudiée donnent une idée générale sur les métabolites secondaires qu'elle contient.

L'estimation quantitative par la méthode colorimétrique des polyphénols totaux auxquels a attribué les diverses activités biologiques ; a montré que nos extraits (méthanolique et aqueux) sont riches en ces composés, mais en quantités différentes (**0,592 et 0,073 mgEAG/g**) respectivement.

L'évaluation de pouvoir antioxydant qui a été réalisé *in vitro* en utilisant la méthode de piégeage de radicale libre DPPH ; a indiqué que l'extrait méthanolique a montré une bonne efficacité antioxydante par rapport à l'extrait aqueux (**65,42% et 22,62%**) respectivement.

L'évaluation de l'activité anticoagulante a été également réalisée *in vitro* en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ).

Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence de ces polyphénols ; indiquent qu'ils exercent une activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation, mais cette activité est plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène.

Mots clés: *Curcuma longa* L. , screening phytochimique, polyphénols, activité antioxydante, activité anticoagulante.

Abstract

Abstract

The antioxidant compounds are the subject of many works because, in addition to their use as conservatives in the foodstuffs by replacing synthesis antioxidants, they intervene in the treatment of many diseases.

The aim of this study was to evaluate the antioxidant and anticoagulant activities of *Curcuma longa* L. shoots extracts, used in folk medicine. The ground material was subjected to extraction and fractionation to have 3 extracts: methanolic, éthanolic and aqueous.

The phytochemical screening tests carried out on the two species studied gave a general idea of the secondary metabolism they continents, and revealed a variation between these two species.

The quantitative colorimetric estimation of the total polyphenols attributed to the various biological activities; has shown that showed the extracts (methanol and aqueous) are rich in these compounds, but in different amounts (**0,592 and 0,073 mgEAG / g**) respectively.

The antioxidant assessment that was conducted in vitro using the DPPH free radical scavenging method; indicated that the methanolic extract had a good antioxidant efficacy compared to the aqueous extract (**65.42% and 22.62%**) respectively.

The anticoagulant activity; was also evaluated in vitro by using two tests: the test of the cephalin-kaolin time and the test of Quick time.

The times of coagulation obtained on normal plasma in the presence of these polyphenols indicate that they carry an anticoagulant activity on the two pathways of coagulation but this activity is highly marked on the endogenous pathway than on the exogenous pathway.

Key words: *Curcuma longa* L. , phytochemical screening, polyphenols, antioxidant activity, anticoagulant activity.

ملخص

المركبات المضادة للأكسدة هي موضوع العديد من الأعمال لأنها؛ بالإضافة إلى استخدامها كمواد حافظة في الغذاء عن طريق استبدال مضادات الأكسدة الاصطناعية، فهي تشارك في علاج العديد من الأمراض.

الهدف من هذه الدراسة هو إجراء معاينة بيوكيميائية ، وكذلك تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للتخثر لمستخلصات الأجزاء الجوفية من *Curcuma longa* L المستخدمة في الطب التقليدي. تعرضت المادة الجوفية لاستخراج وتفتيت للحصول على المستخلصات: الميثانولية الايثانولية والمائية. تعطي اختبارات الحصر البيوكيميائي النباتي التي أجريت على الأنواع المدروسة فكرة عامة عن المستقلبات الثانوية التي تحتوي عليها.

التقدير الكمي لمجموع البوليفينول الذي نسبت إليه الأنشطة البيولوجية المختلفة؛ أظهرت أن المستخلصات (الميثانولية و المائية) غنية بهذه المركبات، ولكن بكميات مختلفة (0,592 و 0,073 mgEAG / g) على التوالي.

تم اجراء تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر باستخدام طريقة إزالة الجذور الحرة DPPH. اشار الاختبار الى ان المستخلص الميثانولي له فعالية جيدة مقارنة مع المستخلص المائي 65,42% و 22,62% على التوالي .

النشاطية المضادة للتخثر لمستخلصات عديدات الفينول للكرم الطويل تم تقديرها باستعمال اختبارين : اختبار cephaline kaolin (TCK) واختبار زمن كويك (TQ).

أوقات التخثر المتحصل عليها في بلازما طبيعية في وجود المركبات الفينولية ؛ تشير إلى أنها تمارس نشاطاً مضاداً للتخثر على كل من ممرات التخثر ، ولكن هذا النشاط يتميز بدرجة أكبر على المسار الداخلي منه في المسار الخارجي.

الكلمات المفتاحية: الكرم الطويل، الحصر البيوكيميائي ، البوليفينول ، نشاط مضادات الأكسدة ، نشاط مضاد التخثر.

Liste des abréviations

- % : Pourcentage
- (AH) n : un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH
- µl : Microlitre
- AAO : Activité antioxydant
- Abs : Absorbance
- ADN : Acide désoxyribo nucleotide.
- AFNOR : Association Française de Normalisation, Huiles essentielles,
- APG: Angiosperms Phylogeny Group
- ASC : Acide ascorbique
- AVK : anti vitamine k
- *C longa* : *Curcuma longa*
- C: Carbone
- C°: Degré Celsius
- C₅H₈ : Structure de base à cinq carbones
- CAT : La catalase
- CH₃ - (CH₂) n – COOH: Formule des acides gras saturés
- CH₃ - (CH₂)₁₄ – COOH: Acide palmitique
- CHCl₃ : Chloroforme
- Cl⁻ : Chlor
- Cm : Centimètre
- CuSO₄: Sulfate de cuivre
- DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α-diphényl-β-picrylhydrazyle)
- EAG/g.MS : Equivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche
- ERN : Les espèces réactives de l'azote
- ERO : Les espèces réactives de l'oxygène
- FCR : Folin Ciocalteu
- FECL₃ : Chlorure ferrique
- FX : Facteur X.
- g : gramme
- g/l: Rapport gramme par litre
- g/mol : Rapport gramme par mol
- GPX : Glutathion peroxydase

Liste des abréviations

- **GSH** : Glutathion
- **GSSG** : Glutathion oxydé
- **HPLC** : High Performance Liquid Chromatography
- **H**: Hydrogen
- **h** : heure
- **H₂ O₂** : Peroxydes d'hydrogène
- **H₂O** : Forme moluculaire de l'eau
- **H₂SO₄**: Acide sulfurique
- **H₃PMo₁₂O₄₀** : Acide phosphomolybdique
- **H₃PW₁₂O₄₀** : Acide phosphotungstique
- **HBPM** : Les héparines de bas poids moléculaire
- **HCL** : Acide chlorhydrique
- **HClO** : Hypochlorite
- **HE** : Huile essentielle
- **HNF** : Héparine non fractionnée
- **HOONO** : le peroxynitrite
- **IC₅₀** : Concentration inhibitrice à 50%
- **K (KH₂)** : La forme réduite de vitamine
- **KOH** : Hydroxyde de potassium
- **LSD** : Diéthylamide de l'acide lysergique
- **Me** : Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant
- **mg** : Milligramme
- **Mg²⁺** : Magnésium
- **min** : Minute
- **ml** : Millilitre
- **MtOH** : Méthanol
- **Mv** : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction
- **Na₂CO₃** : Carbonate de sodium
- **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- **NaOH** : Hydroxyde de sodium
- **NH₄OH**: Ammoniaque
- **nm** : Nanomètre
- **O**: Oxygen
- **pH** : Potentiel d'hydrogène

Liste des abréviations

- **PPP** : Plasma pauvre en plaquettes
- **RL** : Les radicaux libres
- **rpm** : Rotation par minute
- **ROOH** : Hydroperoxyde lipidique
- **S**: Seconde
- **SOD**: Syperoxyde dismutase
- **TCK** : Temps de céphaline kaolin
- **t** : Temps
- **TP** : Taux de prothrombine
- **TQ** : Temps de Quick
- **UV** : Ultra-violet
- **V/V** : Rapport volume par volume

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
01	Photographie de feuilles de <i>Curcuma longa</i> L.	6
02	Dessin représentant la plante entière	7
03	Rhizomes de <i>Curcuma longa</i> L.	7
04	Dessin d'un artiste Indien, représentant l'inflorescence	8
05	<i>Curcuma longa</i> Linné.	8
06	Présentation du <i>curcuma longa</i> durant la plantation	9
07	Structure chimique des principaux constituants de l'huile essentielle de <i>Curcuma</i>	11
08	Squelette de base des flavonoïdes	18
09	Structure d'alkaloïdes	19
10	Structure de la molécule d'isoprène	20
11	Structure de quelques composés monoterpéniques	20
12	Structure de quelques sesquitérpènes	21
13	Sources de production des radicaux libres	26

Liste des figures

14	Schéma des concepts actuels sur le processus de coagulation	28
15	Schéma simplifié de la cascade de coagulation	30
16	Rhizomes du <i>Curcuma longa</i> L.	35
17	Broyage et tamisage du <i>Curcuma longa</i> L.	35
18	Etapes de la macération éthanolique	36
19	Etapes de la macération méthanolique	37
20	Test des lipides	40
21	Test des alcaloïdes	41
22	Test des saponosides	42
23	Matériel de dosage des polyphénols totaux	44
24	Protocole de dosage des polyphénols totaux	45
25	Equation du radical DPPH transformé en DPPH	46
26	Préparation de la solution DPPH	47
27	Protocole d'évaluation de l'activité anti-oxydante	48
28	Etapes de préparation d'un pool de plasma	50
29	Réactifs préparé pour l'évaluation de TCK	51
30	Etapes vis-à-vis de la voie endogène (TCK)	52

Liste des figures

31	Matériel préparé pour l'évaluation de TQ	53
32	Etapas vis-à-vis de la voie exogène (TQ)	54
33	Rendement des extraits bruts	61
34	Droite d'étalonnage de l'acide gallique	62
35	Teneur en polyphénols totaux pour <i>C longa</i>	63
36	Capacité anticoagulante des extraits méthanoliques et aqueux de <i>C longa</i> vis-à-vis de la voie endogène.	72
37	Capacité anticoagulante des extraits méthanoliques et aqueux de <i>C longa</i> vis-à-vis de la voie exogène.	74

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
01	Systematique du <i>Curcuma longa</i> L.	6
02	Parties souterraines et aériennes de <i>Curcuma longa</i> L.	6
03	Valeur nutritionnelle et énergétique du <i>Curcuma Longa</i> L.	10
04	Facteurs de la coagulation	29
05	Groupes chimiques, réactifs d'identification et indicateurs utilisés.	38
06	Résultats de screening phytochimique	56
07	Effet paramètres étudiés sur l'AAO des extraits du <i>C longa</i> et le standard	65
08	Effet extrait sur l'AAO	65
09	Effet dilution sur l'AAO	66
10	Effet temps sur l'AAO	66
11	Effet interaction extrait /temps	67
12	Effet interaction extrait /dilution	68

Liste des tableaux

13	Effet interaction temps /dilution	68
14	La concentration inhibitrice (IC50) de l'extrait méthanolique de <i>C longa</i> et de l'ASC qui inhibent 50 % du Radical DPPH	70
15	La concentration inhibitrice (IC50) de l'extrait aqueux de <i>C longa</i> et de l'ASC qui inhibent 50 % du Radical DPPH	70

Table de matière

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie 01 : Synthèse bibliographique

Chapitre 01: Présentation du *Curcuma longa* L.

I.1. Historique	5
I.2. Classification systémique	5
I.3. Description du <i>Curcuma longa</i> L	6
I.4. Culture de <i>Curcuma longa</i> L	8
I.4.1. Croissance et développement.....	8
I.4.2. Plantation	9
I.4.3. Récolte	9
I.5. La valeur nutritionnelle et énergétique du <i>Curcuma longa</i> L.....	10
I.6. Propriétés du <i>Curcuma longa</i> L.....	11
I.7. Utilisation médicinale du <i>Curcuma longa</i> L	12

Chapitre 02: Métabolisme des plantes médicinales

II. Introduction	14
II.1. Les métabolites primaires	14
II.1.1. Les glucides.....	14
II.1.2. Les acides aminés et organiques	15
II.1.3. Les lipides	15
II.2. Les métabolites secondaires	16
II.2.1. Les composés phénoliques	16
II.2.1.1. Acide phénolique.....	16

Table des matières

II.2.1.2. Les tanins.....	16
II.2.1.3. Les Coumarines.....	17
II.2.1.4. Les flavonoïdes	17
II.2.1.5. Les anthocyanes	18
II.2.2. Les alcaloïdes	18
II.2. Les huiles essentielles.....	19
II.2.3.1. Définition	19
II.2.3.2. Composition chimique et propriétés physiques des huiles essentielles :	19

Chapitre 03: Activité antioxydante et anticoagulante

III.1. Activité antioxydante.....	24
III.1.1. Définition de stress oxydant.....	24
III.1.2. Les radicaux libres (RL).....	24
III.1.3. Production des radicaux libres	25
III.1.4. Les maladies liées au stress oxydatif.....	26
III.1.5. Les antioxydants.....	27
III.1.5.1. Les antioxydants enzymatiques.....	27
III.2. Activité anticoagulante	28
III.2.1. Coagulation	28
III.2.2. Facteurs de la coagulation	28
III.2.3. Le déroulement de la coagulation	29
III.2.3.1. La voie endogène ou intrinsèque.....	29
III.2.3.2. La voie exogène ou extrinsèque.....	30
III.2.4. Les anticoagulants	31
III.2.4. 1. Héparine.....	31
III.2.4. 2. Les antivitamines K (AVK).....	31

Partie 02 : Etude expérimentale

Chapitre 01: Matériel et méthodes

1. Matériel et Méthodes.....	35
1.1. Matériel végétal.....	35
1.2. Méthodes	35
1.2.1. Analyse qualitative	38

Table des matières

1.2.1.1. Caractérisation des éléments nutritifs (métabolites primaires).....	40
1.2.1.2. Caractérisation des métabolites secondaires (Screening phytochimique).....	40
1.2.2. Analyse quantitative	44
1.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)	44
1.2.3. Activités biologiques.....	46
1.2.3.1. Etude de l'activité anti-oxydante.....	46
1.2.3.2. Etude de l'activité anticoagulante	49
1.2.4. Analyse statistique.....	54

Chapitre 02: Résultats et discussion

1. Analyse qualitative	56
1.1. Résultats	56
1.2. Discussion.....	60
2. Rendement en extraits bruts.....	61
3. Analyse quantitative	62
3.1. Dosage des polyphénols totaux	62
3.1.1. Interprétation des résultats.....	62
3.1.2. Discussion	63
4. Activités biologique	64
4.1. Résultats de l'activité antioxydante.....	64
4.1.1. Discussion	71
4.2. Activité anticoagulante.....	72
4.2.1. Résultats	72
a) Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....	72
b) Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....	74
4.2.2. Discussion	74
Conclusion et perspectives.....	77

Références bibliographiques.

Annexes



Introduction générale

Introduction

Depuis l'antiquité, les humains apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales qui y sont liées, paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées et plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des humains. **(Verdrager, 1978)**

Au cours des dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis elles arrivent à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne. Laquelle en effet n'a pu trouver remède à tous les maux, en plus de se buter à une résistance accrue des pathogènes et à une panoplie d'effets secondaires liés à l'usage des médicaments traditionnels **(Segnou et al., 1992)**.

La phytothérapie (du grec « phytos » = plante, et « therapiea » = thérapie) est l'art de soigner par les plantes. C'est l'utilisation thérapeutique des plantes médicinales et de leurs extraits **(National Institute for Health, 2012)**. De nos jours, environ 25000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une plante ou une molécule active d'origine végétale et 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour se soigner **(Segnou et al., 1992 ; Aighewi B.A et al.,1998)**.

Les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, représentent l'un des groupes les plus importants du fait qu'ils aient une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins **(Gurib-Fakim A, 2006)**.

Introduction générale

En Algérie, l'industrie pharmaceutique, mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi les principes actifs sont étudiés depuis une vingtaine d'années (**Djebaili, 1984**).

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

L'objectif global de notre travail est d'évaluer in vitro l'activité antioxydante ; en utilisant le test du radical DPPH et ainsi que d'évaluer l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène et de la voie endogène de la coagulation par deux tests généraux (Temps de Quick (TQ) et temps de céphaline kaolin (TCK) respectivement)

Par conséquent, Notre travail s'articule en deux parties :

Partie 1 : Consiste en une revue bibliographique consacré à 3 chapitres :

- Le premier chapitre donne un aperçu général de la plante « *Curcuma longa* L. ».
- Le deuxième chapitre constitué un profil sur les métabolites primaire et secondaire.
- Le troisième chapitre donne quelques informations sur l'activité antioxydante et anticoagulante.

Partie 2 : Expérimentale, consacrée à la présentation de nos travaux personnels :

- Le premier chapitre résume le matériel et les méthodes utilisées pour le criblage photochimique, l'extraction, le dosage colorimétrique (des polyphénols) et les activités antioxydantes (Pouvoir réducteur et DPPH) et anticoagulantes (test TQ et TCK).
- Le deuxième chapitre qui englobe tous les des résultats obtenus ainsi leurs discussion.

Enfin, on a terminé par une conclusion générale sur les études réalisées et perspectives.

Partie 1
Synthèse
Bibliographique





Chapitre I

Présentation du *Curcuma longa* L.



I.1. Historique

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**).

Son emploi, en Asie, en Afrique et au Proche et Moyen-Orient, remonte à plus de 4000 ans. Dès cette époque, le curcuma est utilisé en tant qu'épice, mais aussi comme agent de coloration de plusieurs aliments, tels que le cari et la moutarde, de même que dans la production de cosmétiques, de teintures et de médicament (**Perry M-C, 2008**).

Le curcuma serait connu en Chine depuis très longtemps puisque le plus vieux traité de médecine chinoise.

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

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

Quand à son utilisation médicinale ; **Nicolas Lémery**, médecin et chimiste français, estime cette terra mérita comme une plante, 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.

I.2. Classification systématique

Selon la classification APG III (Angiosperms Phylogeny Group) ; la systématique du *Curcuma longa* est représentée dans le tableau 01.

Tableau 01 : Systématique du *Curcuma longa* L.

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Sous-classe	Zingiberidae
Ordre	Zingiberales
Famille	Zingiberaceae
Genre	<i>Curcuma</i>
Espèce	<i>Curcuma longa</i> L.

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 du *Curcuma longa* L.

Le *Curcuma longa* L. ; est une plante herbacée de 1 à 1,5 mètres de hauteur et une rhizomateuse vivace.

Les différentes parties aériennes et sous terraines de cette plante sont représentées dans le tableau 02

Tableau 02 : Parties souterraines et aériennes de *Curcuma longa* L.

Feuilles	• Ses feuilles, 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. (Boullard, 2001)	 Figure 01 : Photographie de feuilles de <i>Curcuma longa</i> L. (Reynal B & Multon J, 2009).
------------------------	---	---

Rhizome

- Les rhizomes principaux de forme ovoïde fournissent le curcuma rond et les secondaires le curcuma long. Epais, écailleux, se ridant par dessiccation, ces rhizomes sont d'une couleur jaune orangé en section, gris brunâtre en surface. Une odeur aromatique se dégage après section du rhizome. (Delaveau, 1987)

- L'extraction du rhizome à l'alcool éthylique, à l'acétone ou au chlorure de méthylène donne 6 à 10% d'oléorésine, qui contient 35 à 45% de curcumine et de ses dérivés, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine, connues sous le nom collectif de curcuminoïdes. Ces composés donnent au curcuma sa couleur jaune orangé, alors que l'huile essentielle lui confère son arôme et sa saveur typiques. (Jansen et al., 2005).



Figure 02 : Dessin représentant la plante entière, d'après [i]



Figure 03: Rhizomes de *Curcuma longa* L. (Boullard, 2001)

Fleurs	• L'inflorescence est un épi terminal atteignant 20 cm de long, apparaissant entre les gaines des feuilles. (Boullard, 2001) • Les fleurs possèdent : - un calice tubulaire, court, présentant 3 dents inégales - une corolle tubulaire à sa base, puis divisée en 3 lobes jaunes inégaux - des étamines dont une seule fertile, bifide, l'anthère présentant un large éperon courbé à la base. - un ovaire infère, triloculaire, surmonté d'un style terminé par un stigmate simple et en Crochet. (Itokawa et al., 2008)	 Figure 04: Dessin d'un artiste Indien, représentant l'inflorescence, d'après [i]
Fruit	• Le fruit, rarement produit, est une capsule à trois loges, contenant de nombreuses graines arillées. (James JS, 1996).	 Figure 05 : <i>Curcuma longa</i>, Linné. [ii]

I.4. Culture de *Curcuma longa* L.

I.4.1. Croissance et développement

A la mise en place de la culture, la germination des plants de curcuma est achevée en deux à quatre semaines ; après quoi intervient une période de croissance végétative active. La floraison et le développement des rhizomes débutent environ cinq mois après la plantation.

Les rhizomes continuent de se développer activement pendant à peu près sept à dix mois, en fonction des conditions climatiques ; puis les feuilles inférieures jaunissent et la récolte est prête à être arrachée. (Jansen P et al., 2005).

I.4.2. Plantation

Selon (Jansen P et al., 2005), Il y a en général deux façons de planter le *curcuma* : à plat ou sur billons. La culture à plat est normalement meilleure, mais aux endroits trop ou pas assez humides, la culture sur billons s'avère supérieure, car elle facilite le drainage et l'irrigation. Les billons doivent avoir 20 à 25 cm de haut et 45 à 50 cm de large et les rhizomes doivent être plantés à une distance de 30 à 40 cm, et à une profondeur de 7,5 cm. Le meilleur espacement en culture à plat est de 25 cm x 25 cm. Toutefois, de bons résultats ont été obtenus avec des espacements de 30 cm x 15 cm ou de 15 cm x 15 cm (figure 06). Si le curcuma est en culture associée, l'espacement est ajusté en conséquence.



Figure 06 : Présentation du *curcuma longa* durant la plantation ; d'après [iii]

I.4.3. Récolte

Le *Curcuma* est prêt à être récolté sept à dix mois voire douze mois après la plantation lorsque les feuilles inférieures jaunissent. La récolte se fait en retournant la terre.

- ✓ Il faut faire attention à ne pas abîmer les rhizomes et s'assurer que l'on arrache toute la touffe en même temps que la plante sèche.
- ✓ On coupe alors les sommités feuillées, on retire les racines et la terre qui y est attachée, puis on lave soigneusement les rhizomes.
- ✓ Les doigts sont séparés du rhizome mère.

- ✓ Quelques rhizomes peuvent être utilisés frais et, à l'exception de ceux qui sont nécessaires à la replantation, le reste est séché. (Jansen P et al., 2005)

I.5. La valeur nutritionnelle et énergétique du *Curcuma longa* L.

Le *Curcuma longa* est incroyablement riche en minéraux comme le Magnésium et le Potassium. Il est aussi très riche en vitamines, particulièrement la vitamine C. De plus, le curcuma est une épice incroyablement alcalinisante.

Le tableau 03 représente brièvement la valeur nutritionnelle et énergétique calculée pour 100 g de poudre de rhizome de *Curcuma longa* L.

Tableau 3 : Valeur nutritionnelle et énergétique du *Curcuma Longa* L.
(Pour 100 g) (Shahid, 2016)

Énergie	354 Calories	Minéraux		Vitamines	
Eau	11.36 g	Calcium	183.00 mg	Vitamine A et B12	0.00 µg RAE
Protéine	7.83 g	Cuivre	603.00 µg	Vitamine B1	0.15 mg
Sucre	3.21 g	Fer	41.42 mg	Vitamine B2	0.23 mg
lipide	9,9 g	Magnésium	193.00 mg	Vitamine B2	0.23 mg
fibre	21.10g				
Acides gras		Manganèse	7.83 mg	Vitamine B3	5.14 mg
Total	9.88 g	Phosphore	268.00 mg	Vitamine B6	1.80 mg
Omega 3	0.48 g	Potassium	2525.00 mg	Vitamine B9	39.00 µg DFE
Omega 6	1.69 g	Autres		Vitamine C	25.90 mg
Omega 9	1.66 g	Phytostérol	82.00 mg	Vitamine E	3.10 mg
Gras saturés	3.12 g	Curcumine	3888.80 mg	Vitamine K	13.40 µg

Par distillation à la vapeur d'eau, les rhizomes produisent 2 à 7% d'huile essentielle, qui est rouge orangé et légèrement fluorescente. Ses constituants principaux sont un sesquiterpène, le zingibérène (25%) et ses dérivés cétoniques : la turmérone (35%) et l'ar-turmérone (déhydroturmérone) (12%), (**Figure 07**).

L'huile essentielle de curcuma se compose également en petites quantités de monoterpènes Oxygènes, associés à de petites quantités de sesquiterpènes hydrocarbonés et de monoterpènes hydrocarbonés. La contribution relative de chaque composant à l'arôme et à la flaveur est mal connue. L'arôme de l'huile essentielle distillée à la vapeur est différent de celui de l'épice, ce qui serait dû à la formation d'artefacts lors de la distillation

(Jansen et al., 2005)

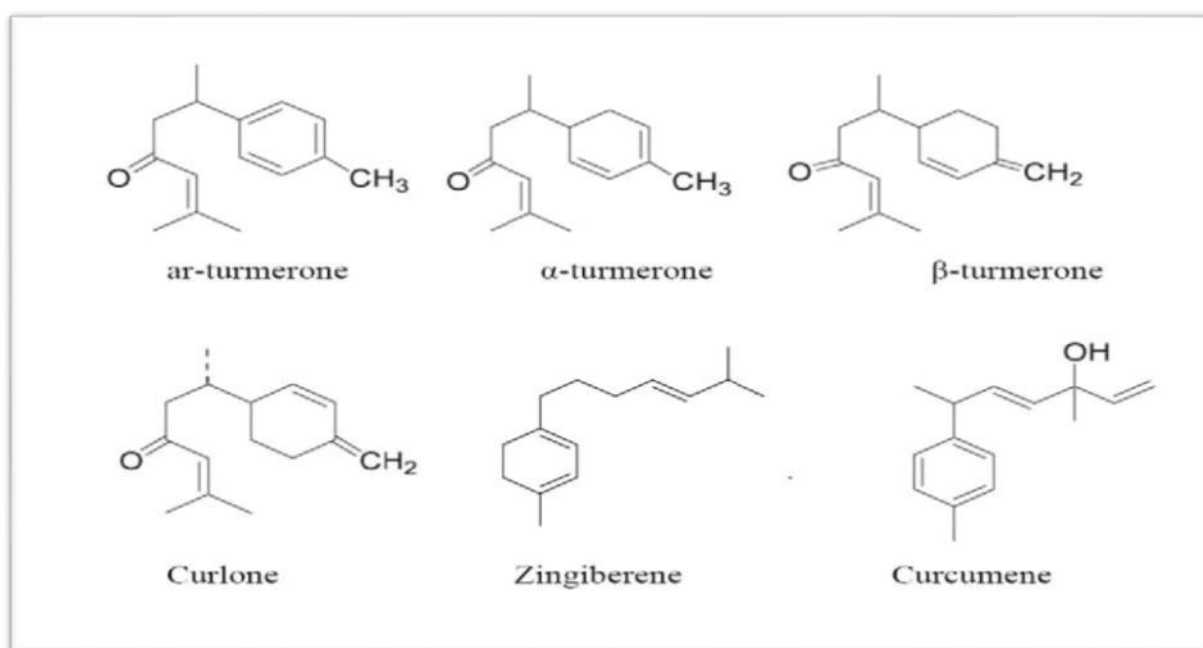


Figure 07 : Structure chimique des principaux constituants de l'huile essentielle de *Curcuma* (Dohare et al., 2008).

I.6. Propriétés du *Curcuma longa* L.

La qualité d'un rhizome s'évalue selon des critères précis d'apparence (taille, forme, couleur), de parfum et d'arôme. Cependant, l'importance relative de ces critères est fonction de l'usage final du produit. Par exemple, lorsque le curcuma est utilisé en tant qu'agent colorant, sous forme de poudre ou d'oléorésine, ni l'apparence, ni le parfum des rhizomes n'aura d'importance. Seule la teneur en curcumine est appréciée. (Purseglow J.W et al., 1981)

Le *Curcuma* fait l'objet de normes et de spécifications reconnues sur le marché international. Leur but est de définir de bonnes pratiques de fabrication et d'assurer la qualité d'un produit.

Les normes garantissent l'authenticité du produit ; les critères étudiés seront donc l'apparence, la couleur et la saveur ainsi que l'absence de contamination microbienne, d'insectes, de matières étrangères, de composants toxiques. Les spécifications mettent l'accent sur la qualité au moyen de méthodes d'analyse spécifique des principes actifs caractéristiques de l'espèce. Chaque pays définit ses propres normes en concordance avec l'Organisation Internationale de Normalisation. (**Purseglow J.W et al.,1981**)

Enfin, le *Curcuma longa* L. est inscrit sur la liste A des plantes médicinales, publiée dans la Xe édition de la pharmacopée française.

I.7. Utilisation médicinale du *Curcuma longa* L.

Selon (**Wun, 2003**), on lui attribue même des effets thérapeutiques semblables aux classes de médicaments suivants :

- ✓ 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)



Chapitre II

Métabolisme des plantes médicinales



II. Introduction

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser des substances très diverses : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (**Kansole M.M.R, 2009**).

Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ils sont divisés en quatre grandes familles : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques.

Les métabolites secondaires sont des produits, à structure chimique souvent complexe, très dispersés et très différents selon les espèces (**Cuendet M, 1999**). Ils représentent une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (**Thomas O.P, 2009**).

Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, et dans les relations entre les plantes et leur environnement : plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation (**Gravot A, 2008**).

II.1. Les métabolites primaires

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque.

Inversement, un métabolite secondaire n'est pas directement impliqué dans ces processus physiologiques fondamentaux (indispensables) d'un organisme, mais possède typiquement une fonction écologique importante (c'est-à-dire une fonction relationnelle). (**Benslama A, 2016**).

II.1.1. Les glucides

Les glucides sont des molécules indispensables à la survie des organismes vivants car leurs formes les plus simples sont à la base des mécanismes énergétiques et de la biosynthèse des autres métabolites. Chez les végétaux on les retrouve sous différentes formes : polymères, énergétiques (amidon) ou structuraux (cellulose, pectines...), sucres simples et hétérosides. (**Thomas M, 2011**).

II.1.2. Les acides aminés et organiques

Ces métabolites primaires polaires sont présents dans différentes parties des plantes (**Sijelmassi A, 2003 ; Armouche H. 2007**). Les fruits et le jus d'argousier contiennent dix-huit acides aminés dont les plus abondants sont l'acide aspartique, la proline et la thréonine.

Indépendamment de leurs rôles principaux, en particulier leur utilisation en tant que blocs constitutifs pour la condensation dans des peptides et protéines, les α -acides aminés sont employés par des usines, des mycètes et des bactéries en tant que blocs constitutifs biosynthétiques. Beaucoup d'alcaloïdes sont dérivés de la phénylalanine et de la tyrosine, par exemple les pénicillines et les céphalosporines sont biosynthétisés des tripeptides (**Beaufrère B, 2002**).

Des acides organiques sont également présents tels que l'acide malique(A), l'acide quinique (B) et l'acide citrique(C). (**Sijelmassi A, 2003**)

II.1.3. Les lipides

Selon (**Berreguioua A, 2016**) ; les lipides sont des molécules à caractère hydrophobe (à solubilité nulle ou faible dans l'eau) et solubles dans des solvants organiques.

❖ Les lipides vrais

Ils résultent de la condensation d'acides "gras" avec des alcools par liaison ester ou amide.

a) Les acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques $R-COOH$ dont le radical R est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe (gras).

a.1. Les acides gras saturés

De formule générale $CH_3 - (CH_2)_n - COOH$, chaque acide gras est constitué par une chaîne hydrocarbonée, plus ou moins longue, fortement apolaire et un groupement carboxyle polaire. Exemple : l'acide palmitique en C16 de formule $CH_3 - (CH_2)_{14} - COOH$.

a.2. Les acides gras insaturés

Ils présentent dans leur molécule une ou plusieurs doubles liaisons. La présence de ces doubles liaisons leur confère des propriétés physico-chimiques particulières.

a.3. Les acides gras atypiques

Des acides gras à nombre impair de carbones, ou des acides avec des modifications de la chaîne carbonée portant sur l'insaturation, ou ayant subi des substitutions ou des cyclisations.

b) Les lipides simples

Les lipides simples, encore appelés homolipides sont des corps ternaires (C, H, O). Ils sont des esters d'acides gras que l'on classe en fonction de l'alcool :

- acylglycérols (ou glycérides) : sont des esters du glycérol,
- cérides : sont des esters d'alcools à longue chaîne (alcool gras),
- stérides : sont des esters de stérols (alcool polycyclique).

II.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes, ces produits sont en très grand nombre, plus de 200.000 structures définies et sont d'une variété structurale extraordinaire.

Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, un genre ou une famille de plante, ils sont classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, et les composés phénoliques (**Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006**).

➤ Molécules issues du métabolisme secondaire

Les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Les métabolites secondaires à structures chimiques souvent complexes, sont très dispersés et très différents selon les espèces (**Thomas M, 2011 ; Cheriti A et al., 1995**).

II.2.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (**Bamforth, 2000 ; Lugasi A et al., 2003**)

II.2.1.1. Acide phénolique

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (**Pandey et Rizvi, 2009**).

II.2.1.2. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré

d'oxydation (**Hemingway, 1992**). Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (**Cavin, 1999**).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

II.2.1.3. Les Coumarines

Les coumarines de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales, ils ont fréquemment un rôle écologique ou biologique, ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Anderson C.M et al., 1996 ; Igor Passi L.B, 2002**).

Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du coeur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (**Gonzalez A & Estevez-Braun A, 1997**).

II.2.1.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal (**Ghedira, 2005**), qui sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols (**figure 08**).

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, antioxydantes et anti-cancéreuses (**Middleton E & Drzewiecki G, 1993**).

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines.

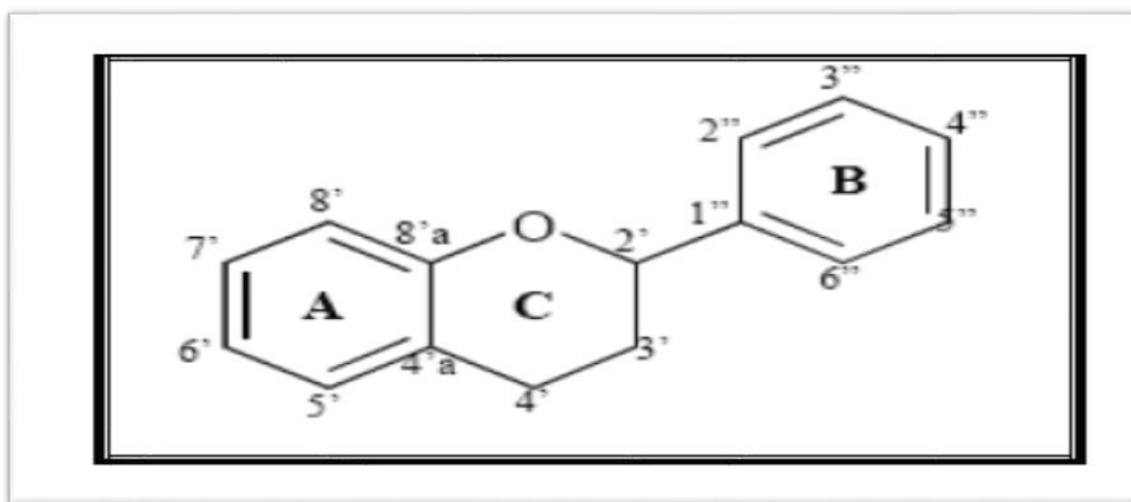


Figure 08 : Squelette de base des flavonoïdes (**Girotti-Chanu, 2006**).

II.2.1.5. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (**Bessas et al., 2007**).

II.2.2. Les alcaloïdes

Le mot alcaloïde dérive du mot *alcalin* qui était utilisé pour décrire les bases de **Lewis** contenant les hétérocycles azotés. Le terme alcaloïdes a été introduit par **W.Meisner** au début du **XIXe** siècle pour désigner des substances réagissant comme des bases (**figure 9**). Il n'existe pas de définition précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels (**Bruneton, 1999**). Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), certains sont employés dans la médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine, la codéine), dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie, atropine) souvent accompagnés des hypnotiques, ou comme agents antipaludéens (quinine, chloroquinine) ou agents anticancéreux (taxol, vinblastine, vincristine) (**Muanda, 2010**).

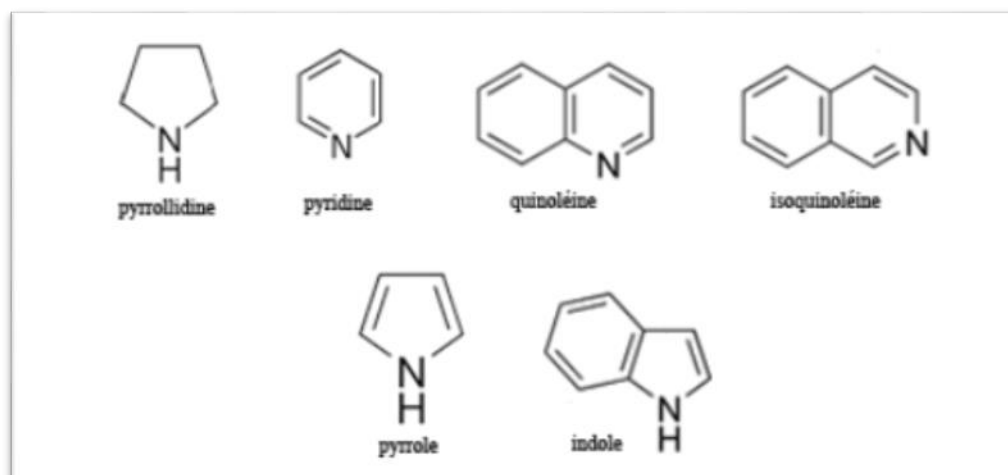


Figure 09 : Structure d'alcaloïdes (Maldonado, 2012)

II.2.3. Les huiles essentielles

II.2.3.1. Définition

Les huiles essentielles sont des substances odorantes, huileuses, volatiles, incolores, ou jaunâtres, inflammables ; s'altérant facilement à l'air en se résinifiant.

Elles sont ordinairement liquides à température ambiante, et n'ont pas le caractère gras et onctueux des huiles fixe, au toucher (Durvelle J.P, 1930).

La norme AFNOR définit une huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière première végétale ; soit par entraînement à la vapeur d'eau ; soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de citrus ; qui sont séparées ensuite de la phase aqueuse par des procédés physiques (AFNOR, 2000).

II.2.3.2. Composition chimique et propriétés physiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels plus complexes caractérisés par deux ou trois composés de très haute concentration (20 - 70%), comparés aux autres constituants présents en faibles quantités. Généralement, ces composés majoritaires déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles. Les constituants des huiles essentielles appartiennent à deux groupes d'origine biosynthétique distincte : le groupe majoritaire des composés terpéniques et l'autre des composés aromatiques et aliphatiques (Bakkali Fet *al.*, 2008)

A) Les terpénoïdes

Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires, végétaux, plus de 15.000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C₅H₈), communément appelée isoprène (Figure 10). Selon le nombre

répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C10), sesquiterpénoïdes (C15) et diterpénoïdes (C20).

Dans la composition de la plupart des huiles essentielles les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie (Calsamiglia S et al., 2007 ; Benchaar C et al., 2008).

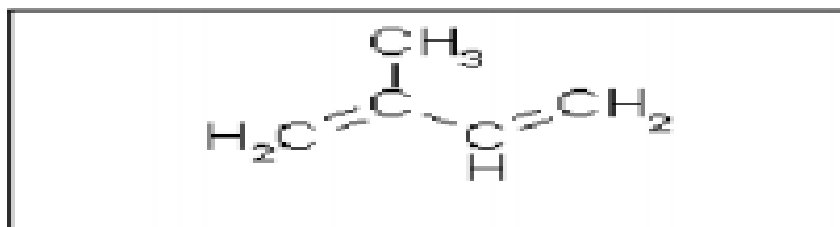


Figure 10 : Structure de la molécule d'isoprène (Calsamiglia S et al., 2007)

A)1. Les monoterpènes :

Les monoterpènes comportent dix atomes de carbones et sont issus de la condensation de deux unités d'isoprène, selon le mode de couplage « tête-queue ». Dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des monoterpènes) (Ayad, 2008).

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) (Figure 11) (Allen et al., 1977).

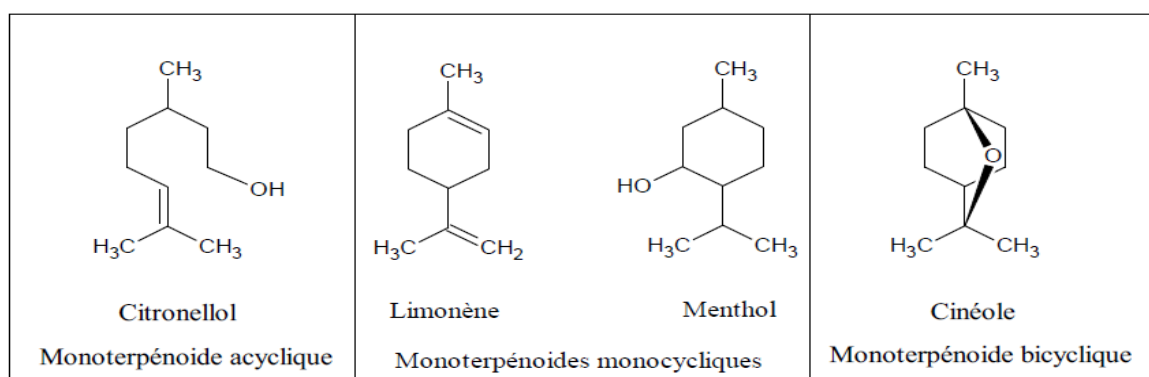


Figure 11 : Structure de quelques composés monoterpéniques (Lemjalied L, 2015)

A)2. les sesquiterpènes :

Les sesquiterpènes (Figure 12) ; forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones (Belbache, 2003), ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des Plantes (Ayad, 2008).

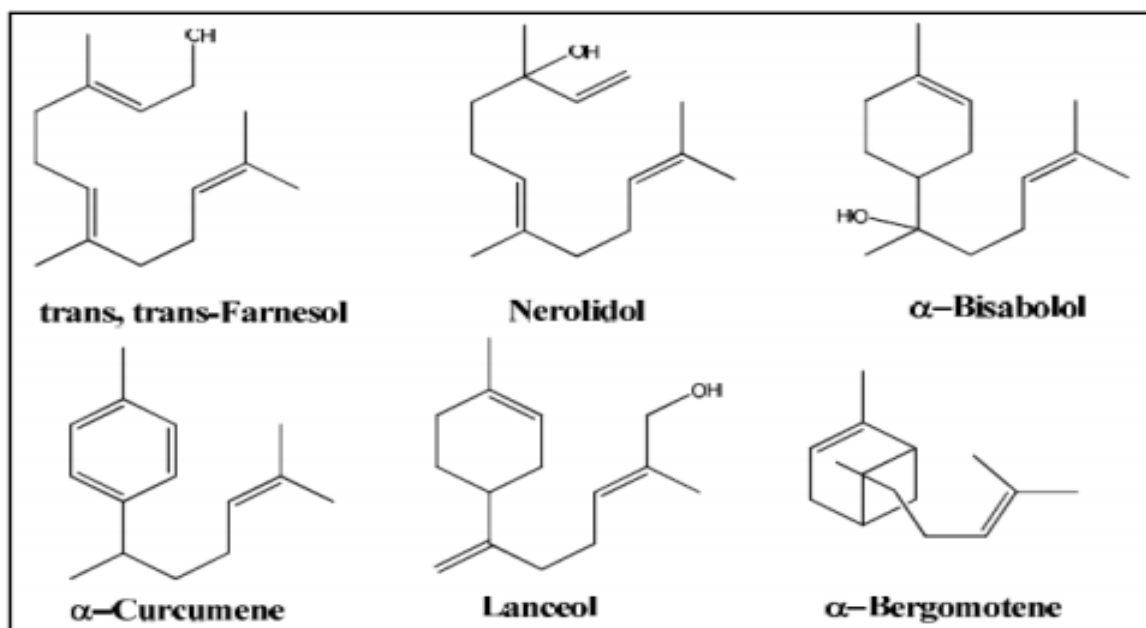


Figure 12 : Structure de quelques sesquitérpenes (Loomis et Croteau, 1980)

B) Groupe des phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Néanmoins, certaines plantes possèdent ces composés avec des proportions significatives. Les phénylpropanoïdes dérivent majoritairement de la phénylalanine. Ils sont constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones (Sangwan N.S et al., 2001)

C) Les composés d'origine diverses :

Selon le mode de récupération utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînables lors de l'hydrodistillation, carbure (linéaires et ramifiés, saturés ou non), acides (C3 à C10), alcools, aldéhydes, esters acycliques, lactones.

Dans les concentrations, il n'est pas rare de trouver des produits de masse moléculaire plus importante non entraînés à la vapeur d'eau ; homologues des phénylpropanes, diterpènes coumarines (Bruneton, 1993).

❖ Propriétés physiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des liquides à température ordinaire, d'odeur aromatique très prononcée, généralement incolores ou jaune pâle à l'exception de quelques huiles essentielles telles que l'huile de l'Achillée et l'huile de la Matricaire. Ces dernières se caractérisent par une coloration bleue à bleu verdâtre, due à la présence de l'azulène et du chamazulène (Abou Zeid, 2000).

Les huiles essentielles s'évaporent et se volatilisent à température ambiante. Très peu solubles dans l'eau à laquelle elles communiquent leurs odeurs, cette eau est dite « eau distillée florale ». Les huiles essentielles sont solubles dans les alcools, dans les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques (**Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1999 ; Abou Zeid, 2000 ; Ghestem et al., 2001**).



Chapitre III

Activité antioxydante et anticoagulante



III.1. Activité antioxydante**III.1.1. Définition de stress oxydant**

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (**Barouki R, 2006**), il se produit dans la cellule quand la concentration des espèces réactives excède les capacités antioxydantes de cette cellule (**Roberts CK & Sindhu KK, 2009**). Ainsi, le stress oxydant est la conséquence d'une augmentation dans la génération des espèces réactives (dans le cas par exemple des intoxications aux métaux lourds, dans l'irradiation (**Favier A, 2003**), tabagisme, les maladies inflammatoires, le stress ...etc) (**Koechlin-Ramonatxo C, 2006**) et /ou d'une défaillance dans les systèmes antioxydants (**Roberts CK & Sindhu KK, 2009**) à cause soit ; d'un déficit nutritionnel en antioxydants comme les vitamines ou aux anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine, soit enzymatiquement antioxydante, soit synthétisant un antioxydant, soit régénérant un antioxydant (**Favier A, 2003**).

III.1.2. Les radicaux libres (RL)

Les radicaux libres et les autres espèces réactives présentent un paradoxe dans leur fonction biologique (**Seifried HE et al.,**), ils sont indispensables à la vie et responsables de nombreuses fonctions physiologiques d'une part et d'autre part ils constituent des espèces hautement dangereuses susceptibles lors d'un stress oxydant d'endommager par oxydation les différentes molécules biologiques notamment les lipides, les protéines et l'ADN (**Koechlin-Ramonatxo C, 2006 ; Favier A, 2003**).

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électron à partir d'un composé non radical (**Koechlin-Ramonatxo C, 2006**).

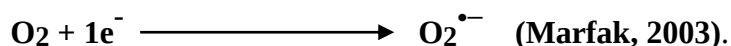
Les radicaux libres qui proviennent de l'O₂ sont appelés « Les espèces réactives de l'oxygène » (**ERO**), alors que les radicaux libres qui sont générés de la réaction de l'oxygène avec l'azote sont considérés comme une sous-classe des radicaux libres appelés « Les espèces réactives de l'azote » (**ERN**) (**Penna C et al.,**).

III.1.3. Production des radicaux libres

On distingue deux types de production des radicaux libres :

a) Production endogène :

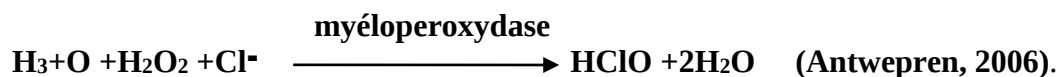
L'une des sources majeures des ERO est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial.



Une autre source possible est la xanthine oxydase. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique.



L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement via les cellules phagocytaires. L'activation de ces cellules immunitaires par des stimuli exogène ou endogène s'accompagne d'une accélération de leur consommation d'oxygène avec activation d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase qui catalyse la réduction de cet oxygène en anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Ce dernier donne le ($\text{H}_2 \text{O}_2$) par dismutation. Le $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 participent à la libération d'hypochlorite sous l'influence d'une enzyme leucocytaire, la myéloperoxydase (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002 ; De Moffarts et al., 2005**).



D'autres systèmes sont capables de produire les ROS, citons par exemple : les réactions catalysées par les lipooxygénases et cyclooxygénases dans la voie de synthèse des leucotriènes, et prostaglandines (**Babior et al., 2002**) ; les aldéhydes oxydases ou les protéines hémiques qui peuvent oxyder leur fer (I) en fer (III) avec production du radical $\text{O}_2^{\bullet}$ (**Antwerpen, 2006**).

Des infections bactériennes ou virales provoquent, elles aussi selon (**Aurousseau 2002**), des phénomènes radicalaires à caractère exponentiel après augmentation de la population des macrophages impliqués dans leur élimination.

C'est ainsi l'auto-oxydation des monoamines (dopamine, épinéphrine, et norépinéphrine) ; et l'hémoglobine en présence de traces de métaux peut également être à l'origine de la production des ERO (**Gueye, 2007**).

b) Production exogène :

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres ; **(Figure 13)**.

Les rayonnements UV (ultra-violet) induisent la synthèse de radicaux libres et de molécules génératrices de radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photo-sensibilisants.

Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène **(Afonso et al., 2007)** Les fumées de combustion (de cigarettes, de bois, etc.), la consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter **(Pincemail et al., 2001 ; Lee et al., 2006 ; Pincemail et Defraigne, 2004)**.

En plus, Des toxiques tels que l'oxyde d'azote ; le NO• peut former avec l'anion super oxyde le peroxynitrite (HOONO), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques **(Halenge, 2007)**, et aussi ; il est responsable d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires **(Hadi, 2004)**.



Figure 13 : Sources de production des radicaux libres (Hocine F et Gorine M, 2017)

III.1.4. Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète **(Atawodi, 2005 ; Georgetti et al., 2003)**.

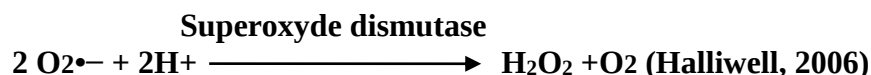
III.1.5. Les antioxydants

Un antioxydant est toute substance capable de retarder ou d'inhiber l'oxydation des substrats biologiques (Al-Mamary et al., 2002 ; Boyd et al., 2003 ; Karou et al., 2005). Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant, 2004). Ces antioxydants ont deux origines :

III.1.5.1. Les antioxydants enzymatiques

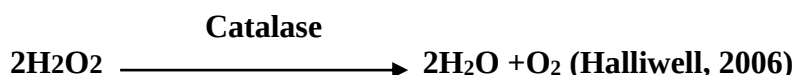
➤ Superoxyde dismutase (SOD)

Le rôle majeur du superoxyde dismutase ou SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Thérond, P et al., 2000). Ils sont des métalloprotéines dont le site actif contient du cuivre, du zinc, du manganèse, du fer ou du nickel. Ils catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Droillard, M.J et Paulin A, 1990 ; Jacques B et André R, 2004).



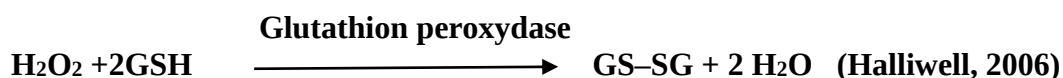
➤ La catalase (CAT) :

Les catalases sont des enzymes qui permettent de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau : sont localisées à l'intérieure de peroxysome exclusivement, ce qui limite leur action par rapport à d'autre enzyme, cytoplasmique (Libbey, 2007).



➤ Les glutathions peroxydases (GPX) :

La glutathion peroxydase possède une forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène et, par conséquent, catalyse l'élimination de H₂O₂ même présent à de très faibles concentrations (Bédane C, 2008).



III.1.5.2. 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 (Blandine G, 2006).

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO. Le mécanisme indirect implique la chélation des métaux de transition ce qui empêche la production du radical hydroxyle, hautement toxique (Kohen et Nyska, 2002).

On trouve dans cette catégorie : les caroténoïdes et l'ubiquinol, la vitamine E, la vitamine C, le glutathion réduit (GSH), l'acide urique, la bilirubine et l'acide alphalipoïque (**Delattre et al., 2005**).

III.2.3. Activité anticoagulante

III.2.1. Coagulation

La coagulation est le processus qui aboutit à la formation de fibrine nécessaire à la consolidation du clou plaquettaire. Il s'agit d'une séquence de réactions enzymatiques permettant l'activation de facteurs plasmatiques inactifs en protéases actives (**Plaziat Decourcel, 2009**).

La physiologie de la coagulation fait appel, pour l'activation initiale, à l'interaction entre un composant cellulaire, le facteur tissulaire, et un composant plasmatique, le facteur VII. La liaison (facteur tissulaire-facteur VII) induit une activation du facteur VII. Il s'en suit une chaîne de réaction, appelée cascade de la coagulation, qui aboutit à la formation de facteur X activé à partir de sa pro enzyme, le facteur X. Le facteur X activé permet la transformation de la prothrombine en thrombine (**figure 14**), enzyme clé de la coagulation (**Schved JF, 2008 ; Falanga A et al., 2015**).

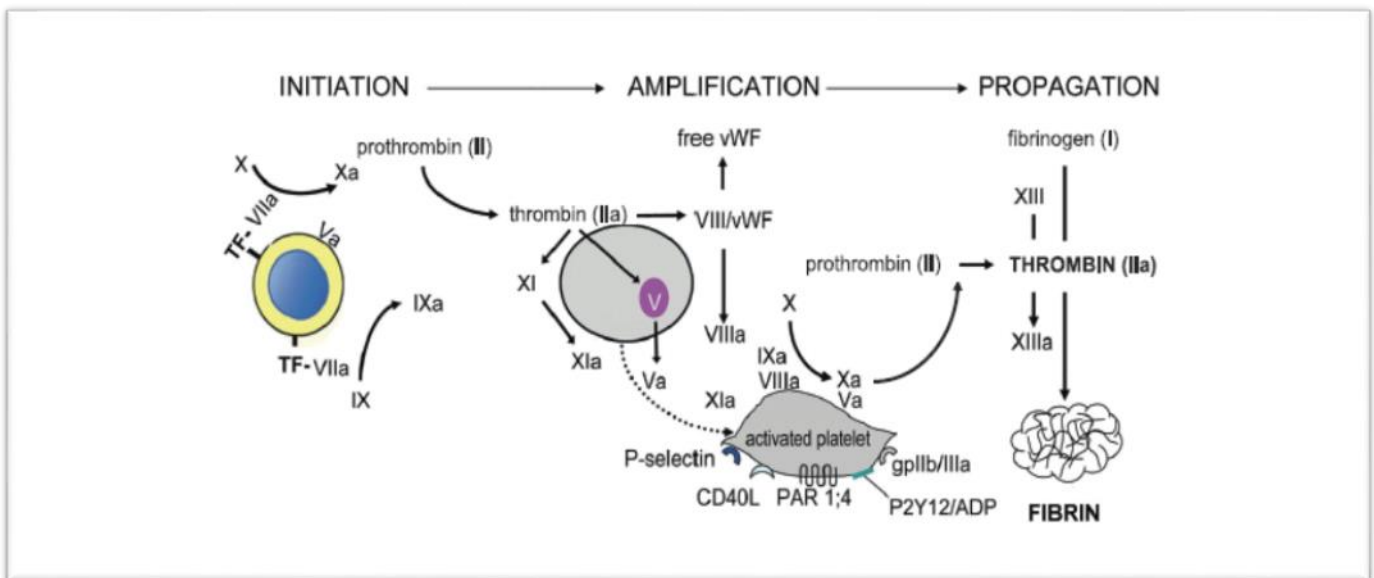


Figure 14 : Schéma des concepts actuels sur le processus de coagulation (**Raffaele De Caterina et al., 2013**).

III.2.2. Facteurs de la coagulation

La coagulation nécessite l'intervention de nombreux facteurs plasmatiques, nommés de I à XIII. Ces facteurs sont présents sous forme de précurseurs inactifs dans le sang. Lorsqu'ils

sont activés par protéolyse, on leur adjoint la lettre « a ». Les facteurs sont synthétisés par le foie (Pench L, 2015). Les principaux facteurs de coagulation sont reportés sur le tableau 04 :

Tableau 04 : Facteurs de la coagulation (Revel T et Doghmi K ,2004)

N° de facteurs	Nom de facteurs	Fonction	Lieu de synthèse	Vitamine K-dépendance
I	Fibrinogène	Substrat	Foie	
II	Prothrombine	Zymogène	Foie	+
V	Pro-accélélerine	Cofacteur	Foie	
VII	Proconvertine	Zymogène	Foie	+
VIII	Facteur antihémophilique A	Cofacteur	Foie	
IX	Facteur antihémophilique B	Zymogène	Foie	+
X	Facteur Stuart	Zymogène	Foie	+
XI	Facteur Rosenthal	Zymogène	Foie	
XII	Facteur Hageman	Zymogène	Foie	
XIII	Facteur de stabilisation de la fibrine	Zymogène	Multicellulaire	

III.2.3. Le déroulement de la coagulation

III.2.3.1. La voie endogène ou intrinsèque

Dans cette voie de coagulation tous les éléments nécessaires de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII par leur contact aux structures électronégatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycosaminoglycane) (Vogler *et al.*, 2009), une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kallikréine qui à son tour peut activer le F XII.

Le F XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX (Vogler *et al.*, 2009). Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes (PS) par l'intermédiaire des ions calcium et forme, en présence de son co-facteur, le facteur VIII, le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X. Cette dernière forme avec son cofacteur (le facteur V), les phospholipides plaquettaires et par l'intermédiaire aussi des ions de calcium, le

complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine en thrombine (Figure 15) (Ajjan et Grant, 2006).

III.2.3.2. La voie exogène ou extrinsèque

La voie exogène est la voie la plus simple et la plus rapide que la voie endogène, Elle fait intervenir un nombre limité de facteurs (Caen et al., 1975) . Cette voie est activée par un facteur non plasmatique qui est le facteur tissulaire, une glycoprotéine membranaire exprimée sur la surface des cellules endothéliales et les cellules de la matrice souendothéliale.

Lors d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire devient en contact avec le plasma ce qui permet l'interaction avec le facteur VII (pro-convertine) pour former un complexe enzymatique réactif (Facteur tissulaire-FVII) .Ce complexe est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquent de prothrombine en thrombine (Colvin, 2004). La thrombine formée par les deux voies catalyse la conversion de fibrinogène en monomères de fibrine qui s'associent les uns aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (Figure 15) (Ajjan et Grant, 2006).

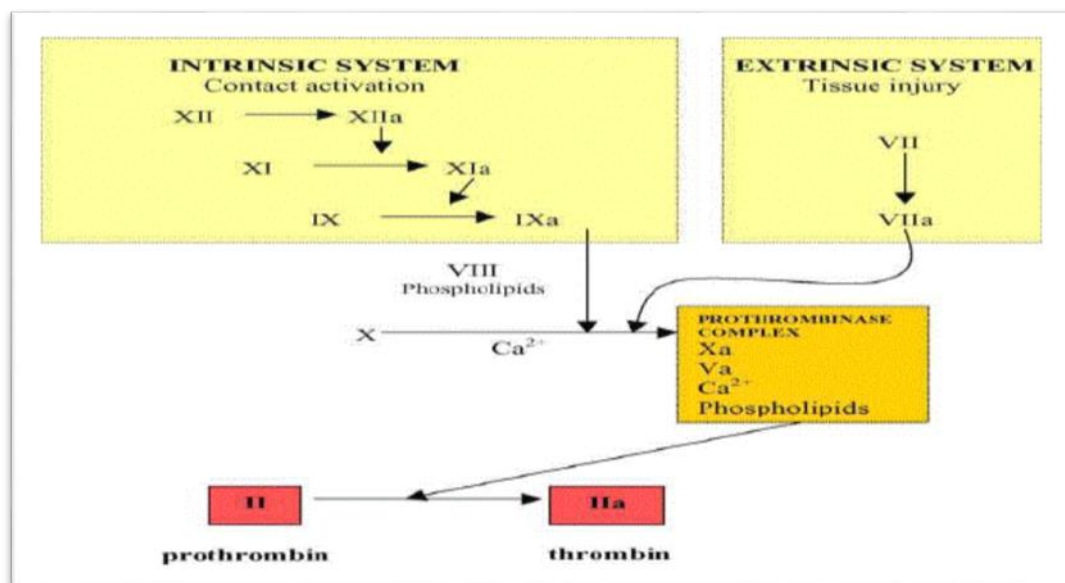


Figure 15 : Schéma simplifié de la cascade de coagulation (Ajjan et Grant, 2006).

III.2.4. Les anticoagulants

Les médicaments intervenants au niveau de la cascade de la coagulation sont appelés « Anticoagulants ». Ils agissent à différents niveaux mais empêchent tous la formation du caillot de fibrine.

Les anticoagulants sont utilisés pour la prévention et le traitement d'événements thrombotiques sévères. Les plus utilisés sont jusqu'à présent l'héparine et ses dérivés et les anti-vitamines K (AVK). De nombreuses études cliniques ont démontré leur action dans la prévention et le traitement de complications thromboemboliques (**Kortchinsky et al., 2013**).

III.2.4. 1. Héparine

On distingue deux grands groupes d'héparines :

- Les héparines « non fractionnées », dites héparines standards.
- Les héparines « fractionnées », dites de bas poids moléculaires.

L'héparine est essentiellement stockée dans les mastocytes, présents dans les organes richement vascularisés. Les héparines commerciales sont extraites à partir de la muqueuse intestinale de porc et de poumon de bœuf (**Amandine, 2009**).

La succession de différents traitements livre un mélange de chaînes polysaccharidiques partiellement fragmentées, polieuses de résidus aminés sulfatés et acétylés en nombre variable. C'est ce mélange qui constitue ce que l'on appelle communément « héparine standard » ou héparine non fractionnée (HNF) dont le poids moléculaire varie entre 5 000 et 30 000 daltons (15000 daltons en moyenne).

Les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) sont préparées par dépolymérisation chimique ou enzymatique des héparines standards. Leur poids moléculaire varie de 2 500 à 8000 daltons (5000 daltons en moyenne) (**Amandine, 2009**).

III.2.4. 2. Les antivitamines K (AVK)

La vitamine K intervient dans la carboxylation des molécules d'acide glutamique de l'extrémité N- terminale de la chaîne glycoprotéinique de quatre facteurs de la coagulation FII, FVII, FX et FIX. Cette carboxylation est nécessaire pour l'activité biologique et la fixation de ces facteurs sur les surfaces phospholipidiques plaquettaires, et elle nécessite la présence de la forme réduite de vitamine K (KH₂). Ce dernier est transformé après la γ -carboxylation en époxyde de vitamine K, qui est régénérée *via* la vitamine K époxyde réductase, pour être utilisée dans une autre réaction de carboxylation.

Les anti-vitamines K exercent leurs effets anticoagulants en inhibant le recyclage de vitamine K, ce qui conduit à la perte de l'activité enzymatique des facteurs vitamines K dépendants et par conséquent la ralentie de la vitesse de la coagulation (**Batty et Smith, 2010 ; Hirsh et al., 2001**).





Chapitre I

Matériel et méthodes



1. Matériel et Méthodes

1.1. Matériel végétal

➤ Echantillonnage

L'objectif de notre travail est porté sur l'étude phytochimique et les activités biologiques antioxydantes et anticoagulantes des polyphénols du *Curcuma longa* L.

La plante *Curcuma longa* L. qui fait l'objet de notre étude phytochimique et biologique ; a été identifiée et achetée d'un herboriste de la wilaya de Setif en Décembre 2019 sous forme de Rhizome secs (**Figure 16**).



Figure 16 : Rhizomes du *Curcuma longa* L. (Photo personnelle, 2019)

1.2. Méthodes

➤ Préparation de matériel végétal

Broyage et tamisage

Les rhizomes du *Curcuma longa* L. ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre (**figure 17**); Cette dernière est récupérée après tamisage et conservée dans des flacons en verre fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

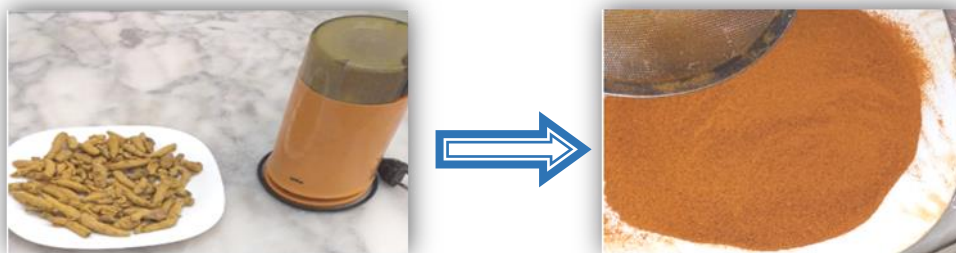


Figure 17 : Broyage et tamisage du *Curcuma longa* L. (Photo personnelle, 2019)

➤ **Préparation des extraits végétaux**

On a utilisé la macération comme une méthode d'extraction, celle-ci se base sur le prolongement de la matière végétale dans un solvant à une température ambiante, ainsi que le temps requis par l'expérience.

Cette étape vise à extraire le maximum des molécules chimiques existante dans les rhizomes de la plante ; pour cela on utilise des solvants organiques qui accélèrent l'extraction et augmentent le rendement.

A) Préparation de l'extrait éthanolique

50g de broya (*C longa*) a été macéré dans 250ml d'éthanol (80%) sous agitation mécanique à une température ambiante pendant 2 à 3 jours. Après 3 jours ; le produit obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre de type Whatman, après ça ; le filtrat obtenu est conservé dans un flacon en verre fermé hermétiquement et stocké à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation (**Figure 18**).

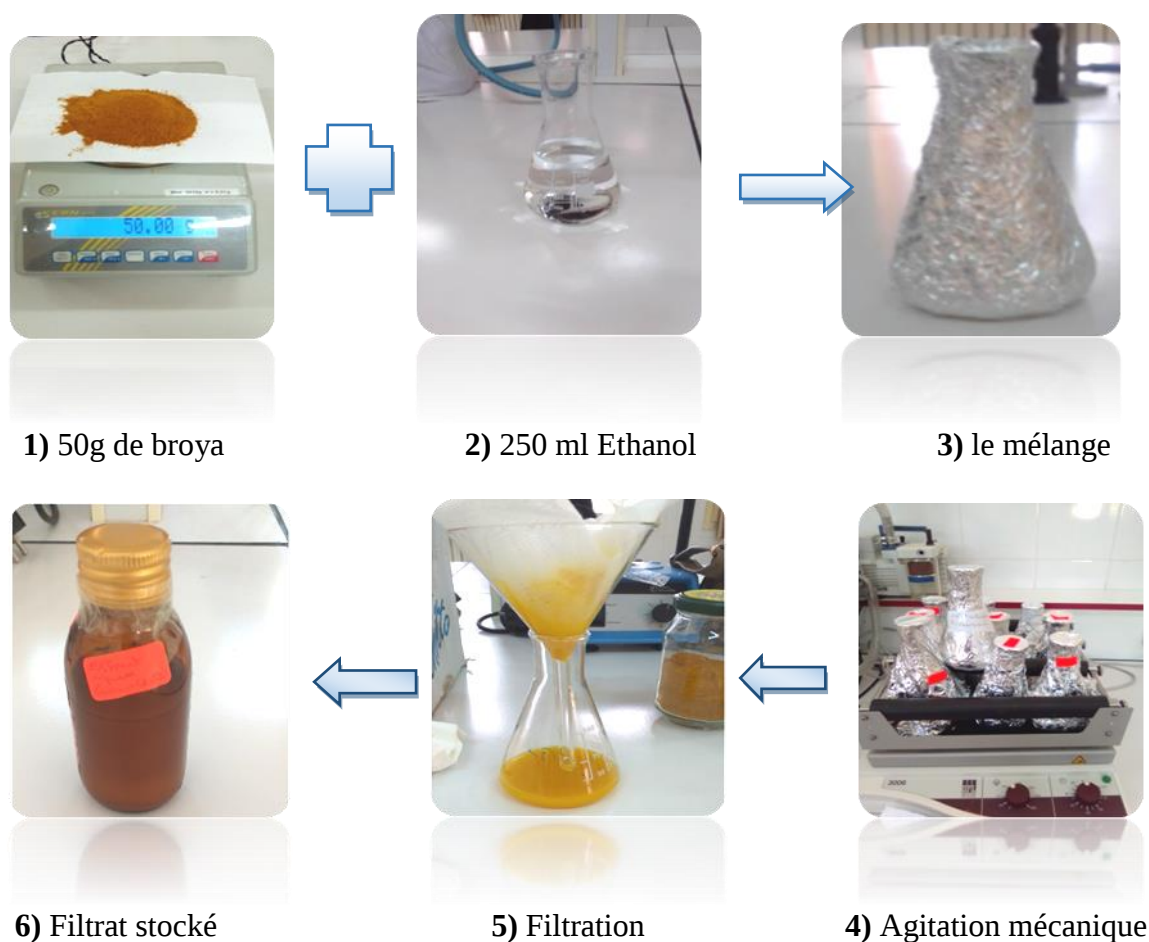


Figure 18 : Etapes de la macération éthanolique (Photo personnelle, 2019).

B) Préparation de l'extrait aqueux

Pour préparer un extrait aqueux, une quantité de 10g de broya de (*C longa*) a été macéré dans 100ml d'eau distillé sous agitation mécanique pendant une nuit à une température ambiante. La solution obtenue est filtré à l'aide d'un papier filtre de type Whatman. Le filtrat est ensuite évaporé dans une étuve à une température de 40 °C pour éliminer l'eau.

C) Préparation de l'extrait méthanolique

Une quantité de 10g de matériel végétal broyé est macérée dans une solution de méthanol/eau (70 : 30, V/V) sous agitation mécanique à une température ambiante pendant 2 à 3 jours, le macérât a été ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre de type Whatman.

Le filtrat obtenu est soumis à une évaporation par rotavapeur. Enfin, le produit final est stocké dans une boîte de Pétri en verre fermée hermétiquement à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation (**Figure 19**).

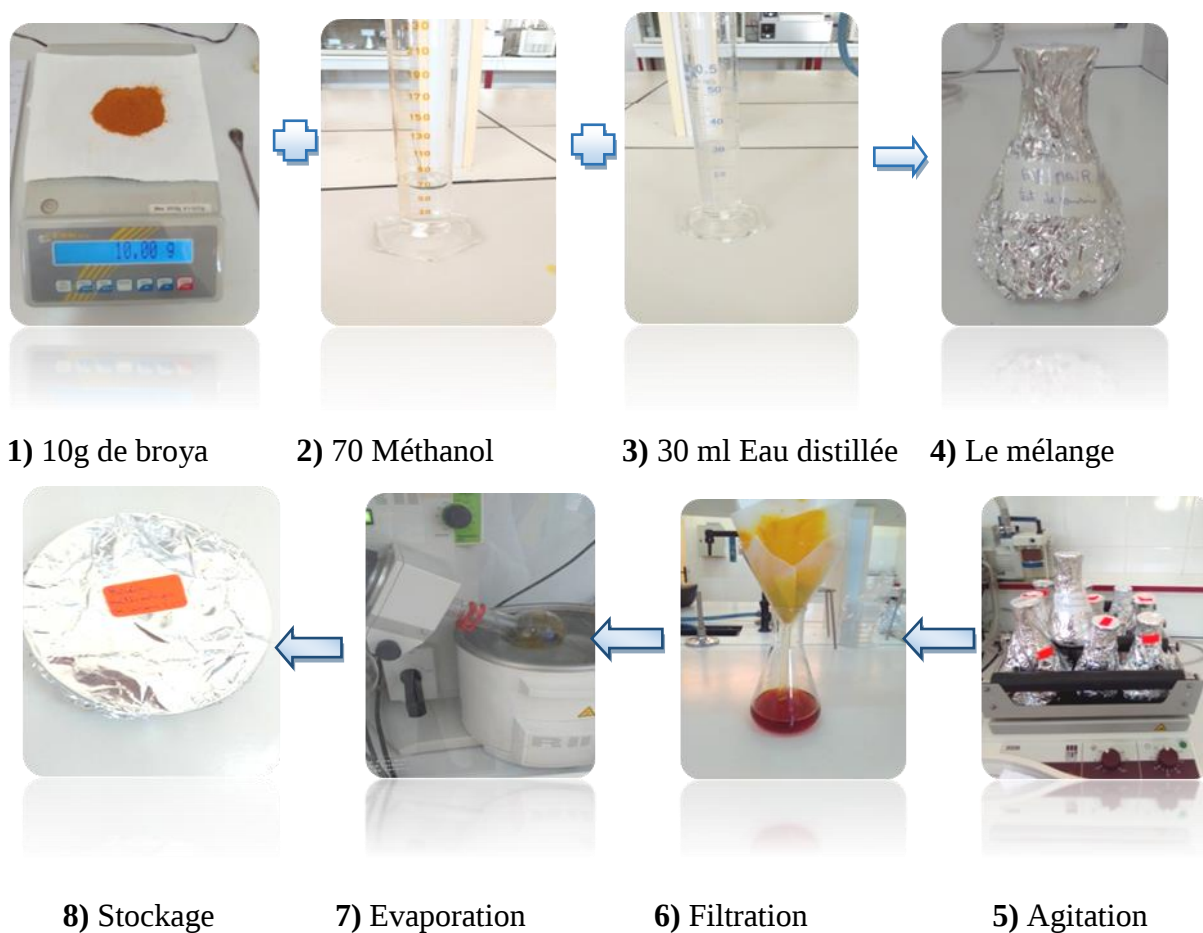


Figure 19 : Etapes de la macération méthanolique (Photo personnelle, 2019)

1.2.1. Analyse qualitative

Les tests de l'analyse qualitative de notre plante sont réalisés au sein du laboratoire du Centre Universitaire Abd elhafid Boussouf Mila.

Ces tests nous permettent de détecter la présence ou l'absence des groupes chimiques ; existants dans une partie quelconque de la plante par des réactions de précipitation ou de coloration ; en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés (**Tableau 05**).

Tableau 05 : Groupes chimiques, réactifs d'identification et indicateurs utilisés.

Groupe chimique	Réactifs d'identification	Indicateur
Métabolites primaires		
Lipides	- Ether de pétrole - H ₂ SO ₄	- Une coloration violette
Protéines	- NaOH 20% - CuSO ₄ 2%	- Une coloration violette, avec une teinte rougeâtre
Métabolites secondaires		
Sapanosides	- Indice mousse > 1cm	- Apparition d'une mousse persistante
Flavonoïdes	- HCl - Copeaux de magnésium	- Une coloration rose ou rouge ou jaune
Alcaloïdes	- Réactif de wagner - Acide chlorhydrique HCL (10%) - Hydroxyde d'ammonium - Etherdi-éthylique, HCL (2%)	- Précipité brun

Tanins	- FeCL3 (2%)	- Coloration verdâtre ou bleu noirâtre
Anthocyanes	- NH₄OH - H₂SO₄	- coloration rouge en milieu acide, et bleu violacée en milieu basique.
Anthraquinones libres	- NH₄OH (20%)	- une coloration plus ou moins rouge
Quinones	- HCl - Chloroforme - Ammoniaque	- Coloration rouge
Séroïdes	- Anhydride acétique - H₂SO₄	- Une coloration violette qui vire au bleu puis au vert
Terpinoides	- Chloroforme - H₂SO₄	- Formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase
Stérols	- H₂SO₄ - Chloroforme - Anhydride acétique	- Formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant.
Coumarines	- KOH (10%) - HCl (10%)	- Précipitation rouge brune
Sucres réducteurs	- Réactif de Fehling - Eau distillée	- Précipité rouge brique

1.2.1.1. Caractérisation des éléments nutritifs (métabolites primaires)**a) Caractérisation des protéines**

Rajouté quelques gouttes de CuSO_4 (2%) à 1g de poudre végétale humecté préalablement dans 2ml de NaOH 20%. L'apparition d'une coloration violette, avec une teinte rougeâtre indique la présence de protéine (Afaq et Malik, 2005).

b) Caractérisation des lipides

Macérer 5 g de la poudre dans 30 ml d'éther de pétrole pendant 30 min. Après filtration, évaporer le filtrat sur la plaque chauffante. Ajouter au résidu graisseux 3 gouttes de H_2SO_4 (figure 20).

L'apparition d'une coloration violette indique la présence des lipides (Afaq et Malik, 2005).



Figure 20 : Test de lipides (Photo personnelle, 2019)

1.2.1.2. Caractérisation des métabolites secondaires (Screening phytochimique)

Les tests phytochimiques réalisés, généralement sur des extraits déjà préparés par macération sont basés sur :

- Les essais de solubilité, des constituants de la plante, vis-à-vis des solvants organiques de polarité différente : Ethanol, Méthanol, Eau distillé.
- Les réactions de coloration et de précipitation.

A) Identification des groupes chimiques à partir de l'extrait éthanolique**a) Recherche des flavonoïdes**

On ajoute à 5 ml d'extrait à tester, quelques gouttes de HCl et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose, rouge ou jaune prouve la présence des flavonoïdes (Trease et Evans, 1987).

b) Recherche des alcaloïdes

Le test est réalisé par des réactions de précipitation avec le réactif de Wagner. 20 ml de l'extrait a été ajouté à 5 ml d'acide chlorhydrique HCl (10%), puis chauffer dans un bain marie, où un volume de solution d'hydroxyde d'ammonium (10%) a été ajouté jusqu'à obtention d'un milieu de pH = 9, une extraction avec de l'éther di éthylique est ensuite réalisée suivi d'une concentration avec un dispositif « évaporateur rotatif » (**Figure 21**).

Le résidu est repris dans 5 ml de HCl (2%), est trait par quelques gouttes de réactif de Wagner afin d'obtenir un précipité brun indiquant la présence des alcaloïdes (**Memelink et al., 2001**).



Figure 21: Test des alcaloïdes (**Photo personnelle, 2019**)

c) Recherche des stérols

Dans un bécher, on ajoute au 5ml de l'extrait à analyser ; 5ml d'anhydride acétique puis 5ml de chloroforme ; à l'aide d'une pipette ajouter ensuite 1ml de l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré au fond de bécher sans agiter. Laisser reposer 20 min la formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols (**Trease et Evans, 1987**).

d) Recherche des coumarines

20g de la poudre a été macéré dans 40ml d'éthanol pendant 2 à 3 heures. Après macération et filtration, on ajoute au 5ml de filtrat ,5ml de KOH (10%), et 5ml d'HCl (10%). La précipitation rouge brune révèle la présence des coumarines (**Trease et Evans, 1987**).

e) Recherche des glycosides

Pour détecter ces molécules, un mélange constitué de 1ml de l'extrait brut avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling à été chauffé à 70°C dans un bain marie, un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

B) Identification des groupes chimiques à partir de l'extrait aqueux**a) Recherche des saponosides**

2g de la poudre de notre plante a été macéré avec 80 ml d'eau distillé pendant quelques minutes, suivi d'une filtration et agitation. L'apparition d'une mousse persistante dans le milieu prouve la présence des saponosides (**Figure 22**) (**Kalla, 2012**).

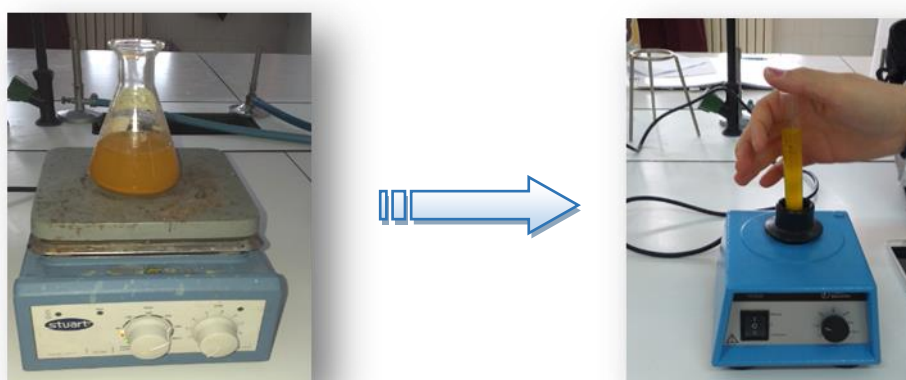


Figure 22 : Test des saponosides (Photo personnelle, 2019)

b) Recherche des anthocyanes

À 5 ml d'extrait aqueux on ajoute 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) puis 5 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH). Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes (**Mibindzou Mouellet, 2004**).

c) Recherche des tanins

1 ml de l'extrait d'alcool a été ajouté à 2 ml d'eau distillée et 2-3 gouttes de la solution de chlorure ferrique $FeCl_3$ 1 % permet de détecter la présence ou non de tanins.

L'apparition d'une couleur verte ou bleu-vert indique la présence de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (**Trease et al., 1987 ; Douhou et al., 2003**).

d) Recherche des stéroïdes

Dans un bécher, on introduit 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml de l'extrait, qui sont repris dans un tube à essai dans lequel sont ajoutés 0,5 ml de H_2SO_4 concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (**Harborne, 1998**).

C) Identification des groupes chimiques à partir de chloroforme**a) Recherche des Anthraquinones libres**

Pour ce faire, nous avons préparé un extrait chloroformique :

Extrait chloroformique : mélanger 1 g de la poudre avec 10 ml de chloroforme. Chauffer prudemment au bain-marie pendant 3 min après filtration à chaud, le volume est ensuite ajusté à 10 ml.

❖ Identification

On introduit dans un tube à essai 1 ml d'extrait chloroformique et 1 ml de NH₄OH dilué. La coloration plus ou moins rouge après agitation de la solution indique la présence d'anthraquinones libres (**Diallo, 2000**).

b) Recherche des quinones

2g de la poudre humectés par 2 ml de HCl + 20 ml de chloroforme pendant 3 Heures. Le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque. Une coloration rouge indique la présence des quinones (**Afaq et Malik, 2005**).

D) Identification des groupes chimiques à partir de l'extrait méthanolique**a) Recherche des terpénoïdes**

Dans un tube à essai, ajouté 2,5ml de l'extrait méthanolique, 0,4ml de chloroforme et 0,6ml de l'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase, indique la présence des terpénoïdes (**Trease et Evans, 1987**).

• Rendement de l'extrait brut

Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé via l'équation

$$R \% = (Me/Mv) \times 100$$

R % : Rendement en %.

Me: Masse de l'extrait après évaporation du solvant.

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

1.2.2. Analyse quantitative

1.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)

Le test de dosage des polyphénols totaux de notre travail a été réalisé au sein du laboratoire pédagogique du Centre Universitaire Abd elhafide Boussof Mila.

Pour le dosage des polyphénols totaux, deux extraits ont été utilisés (aqueux et méthanolique). Ce dosage a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par (Skerget et al., 2005).

A/ Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006 ; Ghazi et Sahraoui, 2005).

B/ Mode opératoire

Un volume de 500 μ l de l'extrait à différentes concentrations (extrait diluée $\frac{1}{2}$ et l'extrait brut) est ajouté à 2,5ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1/10) (1ml de réactif de Folin-Ciocalteu et 9ml d'eau distillé).

Après 15min, on ajoute 2ml de $NaCO_3$ (7,5%) ; puis on agite le mélange. Après une incubation à une température ambiante pendant 2 heures (Figure 23), l'absorbance est mesurée à 760nm contre un blanc qui constitué de réactif Folin-Ciocalteu et $NaCO_3$ (7,5%) (Skerget et al., 2005) (Figure 24).



Figure 23 : Matériel de dosage des polyphénols totaux (Photo personnelle, 2019)

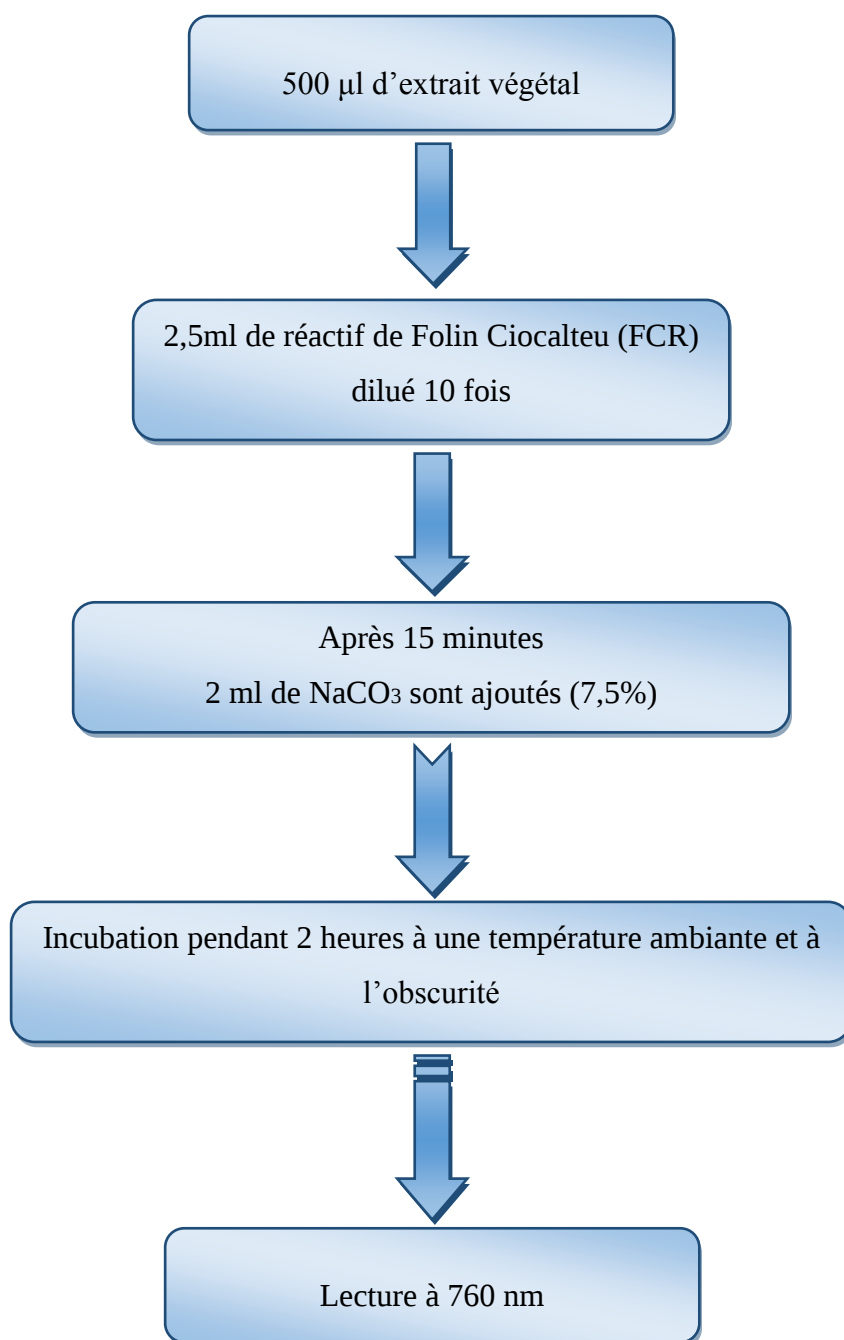


Figure 24 : Protocole de dosage des polyphénols totaux

La courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax$) est effectuée par l'acide gallique ; A partir d'une solution mère aqueuse préparée de l'acide gallique de concentration massique 0.75g/l, des solutions filles sont ainsi préparées à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 1g du poids sec de la plante en poudre.

1.2.3. Activités biologiques

1.2.3.1. Etude de l'activité anti-oxydante

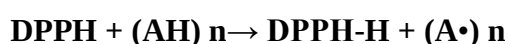
➤ Test de l'activité anti-radicalaire (DPPH)

A/ principe

La méthode au DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) est la méthode la plus utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante.

Le DPPH a un électron impair qui forme la couleur violette, conduisant à une longueur d'onde d'absorbance à 517 nm (**Bui Thanh et al., 2016**). Lorsque le DPPH réagit avec un antioxydant, perd sa couleur violette et devient de couleur jaune (**Lakshmi et al., 2014**). La réduction du radical par un donneur d'atome H (ROH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine jaune (DPPH-H) et au radical (A•).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphényle picrylhydrazine (jaune) (**Figure 25**). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

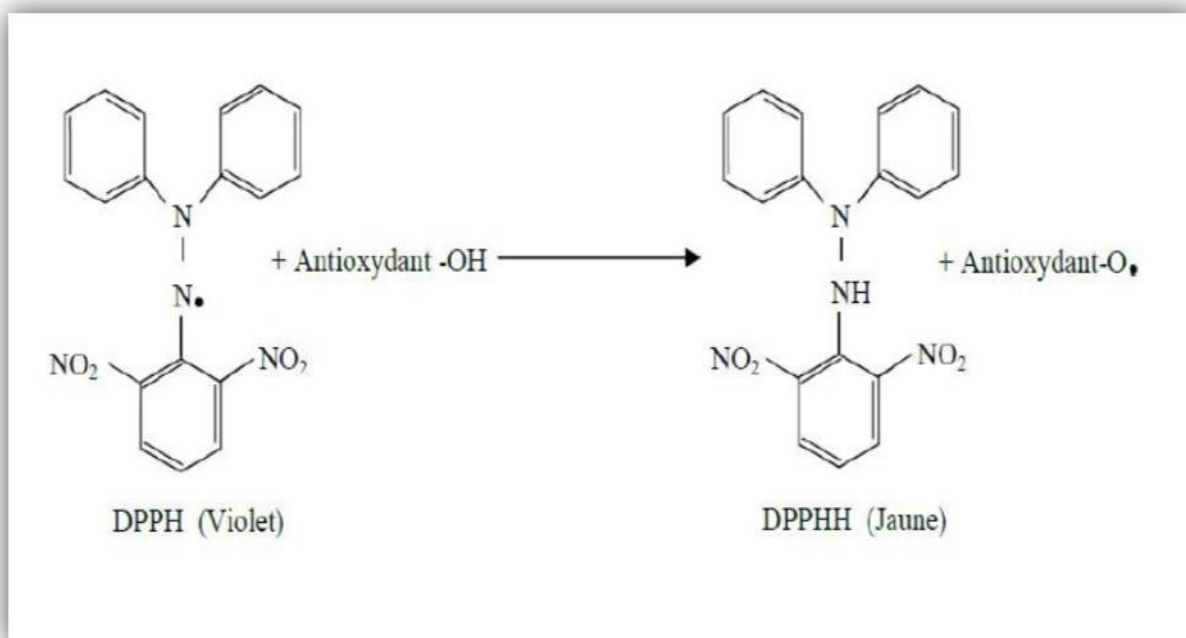


Figure 25 : Equation du radical DPPH transformé en DPPH (Talbi et al.,2015).

B/ Préparation de la solution DPPH

0.008g de DPPH ont été dissous dans 150ml de la solution méthanolique (105 ml méthanol + 45ml eau distillé) (**Figure 26**) ; la solution a été incubé pendant 24h sous agitation mécanique à l'obscurité.



Figure 26 : Préparation de la solution DPPH (Photo personnelle, 2019)

C/Mode opératoire

L'activité antioxydante de nos deux extraits méthanoliques et aqueux du *Curcuma longa* L.; et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évalué à l'aide d'un spectrophotomètre au sein du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Houari Boumedien à Chelghoum Laid.

Selon la méthode de **Ammar et al., (2009)**, on prépare des dilutions pour tous les extraits des polyphénols ; pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de milligramme par ml. Le test consiste à mélanger 1ml de la solution méthanolique du DPPH préparé avec (0.1, 0.2, 0.3 et 0.4 ml), de chaque extrait puis ; on ajuste le solvant (méthanol +eau distillé) jusqu'à 3 ml.

Dans des tubes à essai ; Trois gammes de dilution de ces extraits a été préparé et incubée à une température ambiante à l'abri de la lumière. La première est incubée pendant 30 min ; la deuxième pendant 45 min et l'autre pendant 60 min.

L'absorbance de chaque concentration est mesurée par rapport à un blanc constitué uniquement le méthanol et le DPPH, en utilisant un spectrophotomètre à 517nm (**Cristina et al., 2009**) (**figure 27**).

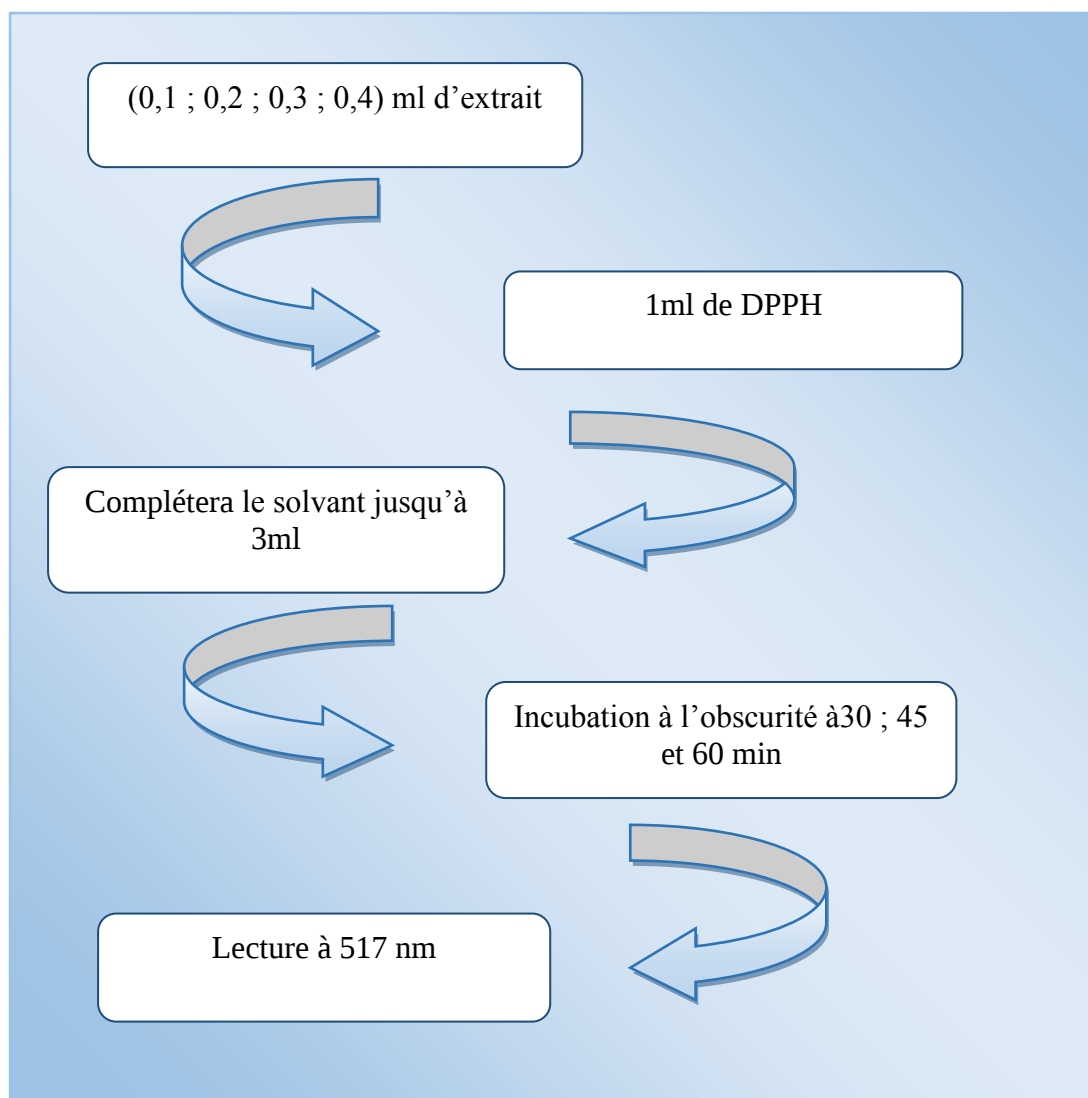


Figure 27 : Protocole d'évaluation de l'activité anti-oxydante

D/ Expression des résultats

La capacité de piégeage du radical libre est ensuite calculée à travers le pourcentage d'inhibition :

$$\text{Le pourcentage d'inhibition} = \{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}) / \text{Abs contrôle}\} \times 100$$

Abs contrôle : Absorbance de la solution DPPH

Abs test : Absorbance de l'extrait

E/ Calcul des EC₅₀ (IC₅₀) :

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC₅₀ qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC₅₀ sont calculées à partir de l'équation des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait testé et du standard utilisé dans l'étude (**Bouras et Houchi, 2013**).

1.2.3.2. Etude de l'activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des extraits de la plante étudiée et de leur principal constituant a été réalisée au sein du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Houari Boumedien à Chelghoum Laid.

Cette activité a été évalué in vitro vis-à-vis des deux voies de la coagulation (la voie endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de deux tests chronométrique globaux, le test de temps de céphalin-kaolin (TCK) et le test de temps de Quick (TQ).

A/ Préparation du pool plasmatique :

Le pool plasmatique déplaquettés est un mélange de plasmas déplaquettés des 10 volontaires sains adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux et comparables.

Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes (**Figure 28**). Le mélange de ces plasmas (plasma standard) est conservé à basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation (**Athukorala et al., 2007**)

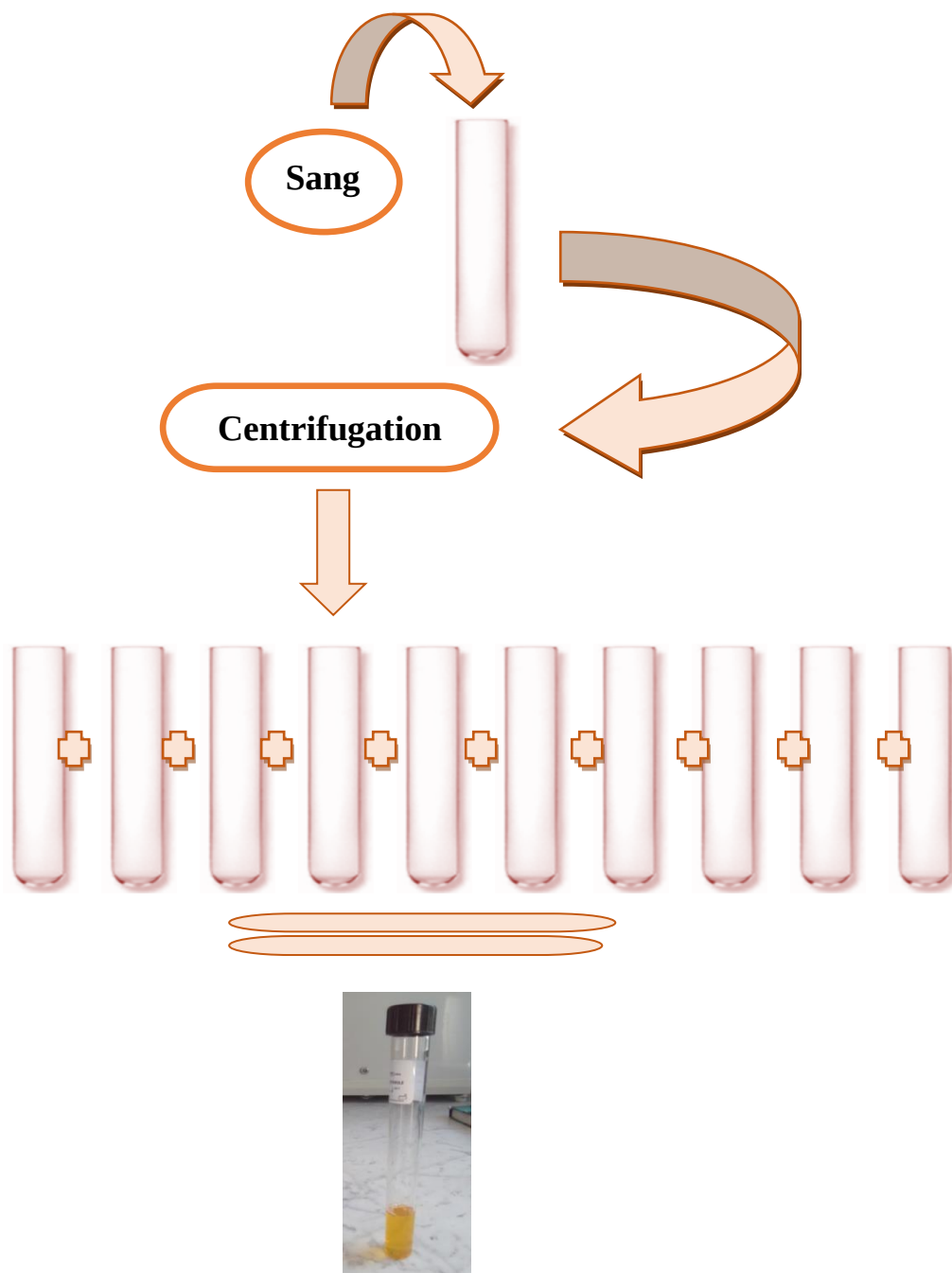


Figure 28 : Etapes de préparation d'un pool de plasma

B/ Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

B.1. Principe

L'évaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été réalisée en utilisant le test du temps de céphaline-Kaolin (TCK), un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs plasmatiques de la voie endogène (intrinsèque) de la coagulation (Caquet, 2004 ; Caen J et *al.*, 1975).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 C° d'un plasma déplaquettés et citraté mis en présence de phospholipides (la céphaline) substitut du facteur 3 plaquettaire (F3P) d'un activateur du système contact (Prékalikriène, Kininogène de haut poids moléculaire et le facteur XII) qui est généralement le Kaolin et de calcium comme un facteur déclenchant (Caquet, 2004).

B.2. Mode opératoire

L'activité des extraits et de certains de leurs composés est établie sur 100 µl de ce plasma qui est mélangé avec différents volumes de ces solutions (10, 20, 30 µl) préparées à une concentration donnée. Après 15 min. d'incubation à 37°C, 100 µl de céphaline-kaolin est additionné au mélange qui est réincubé durant exactement 3 min sous agitation à 37°C. Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre par ajout de 100 µl de chlorure de calcium (0,025M) préchauffé (**Figure 29**) et (**Figure 30**) (Wang et al ., 2010).



Figure 29 : Réactifs préparés pour l'évaluation de TCK (Photo personnelle, 2019)

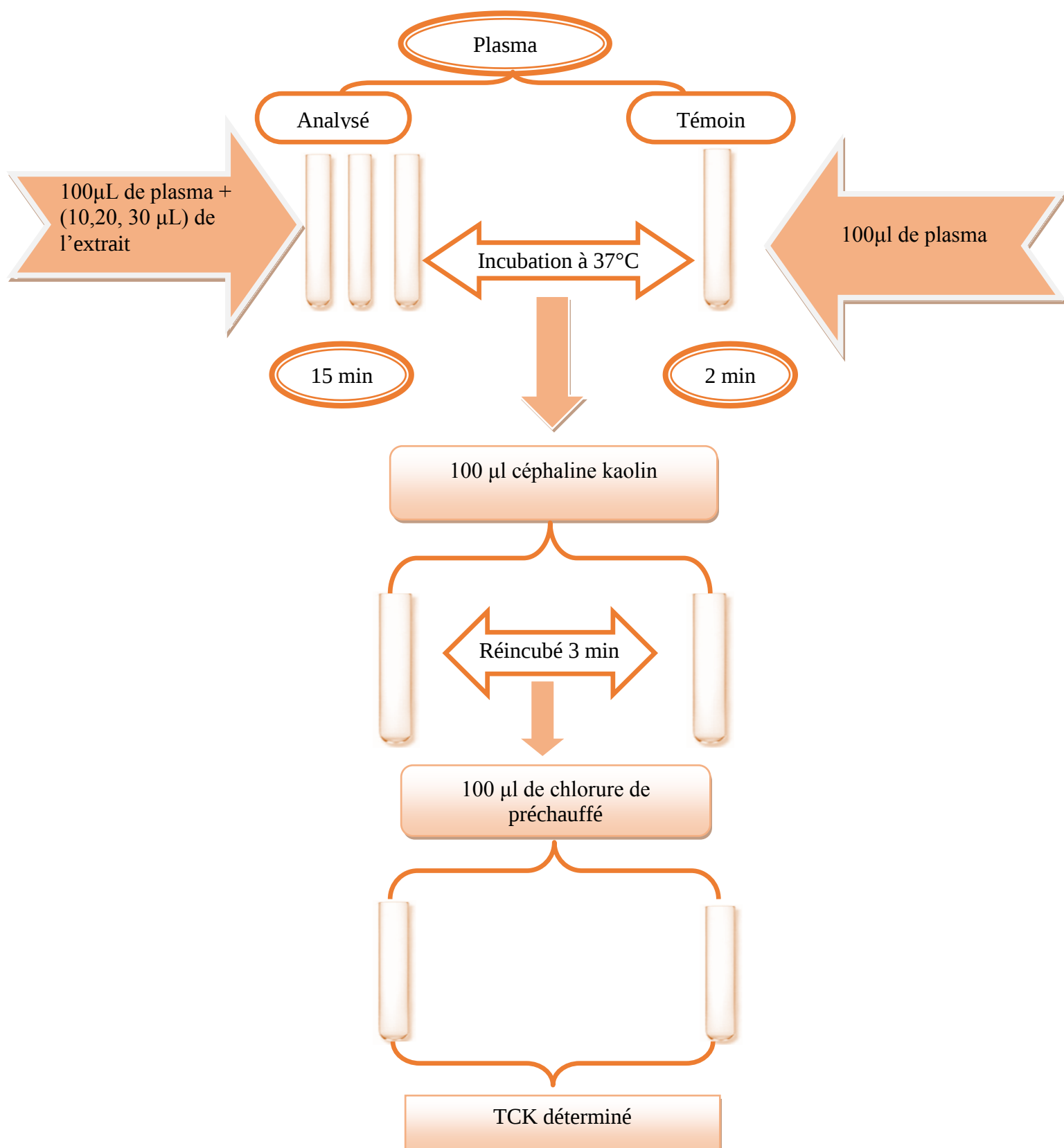


Figure 30: Etapes vis-à-vis de la voie endogène (TCK)

C/ Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène (TQ)**C.1. Principe**

L'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation a été évaluée en utilisant un test de coagulation appelé le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP) qui permet d'une exploration globale des facteurs de la voie exogène de la coagulation (La proconvertine VII, la prothrombine II, la proaccélélerine V, le facteur stuart X, et aussi le fibrinogène) (**Caquet, 2004**).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37°C d'un plasma pauvre en plaquettes en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Les facteurs de la voie exogène donc sont activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré (**Athukorala et al., 2007**).

C.2.Mode opératoire

L'effet des extraits sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon le protocole décrit par **Wang et ses collaborateurs**. Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré.

100 µl de plasma pauvre en plaquettes préchauffé durant 2 min à 37°C est mélangé avec différents volumes des extraits et de certains de leurs composés (10, 20, 30 µl), préparées à une concentration donnée. Après 15 min d'incubation à 37°C, 200 µl de thromboplastine calcique (préchauffée au moins 15 minutes à 37°C) est additionné au mélange et le temps de la coagulation est alors enregistré à l'aide d'un coagulomètre (**Figure 31**) et (**Figure 32**), (**Wang et al ., 2010**).



Figure 31 : Matériel préparé pour l'évaluation de TQ (Photo personnelle, 2019)

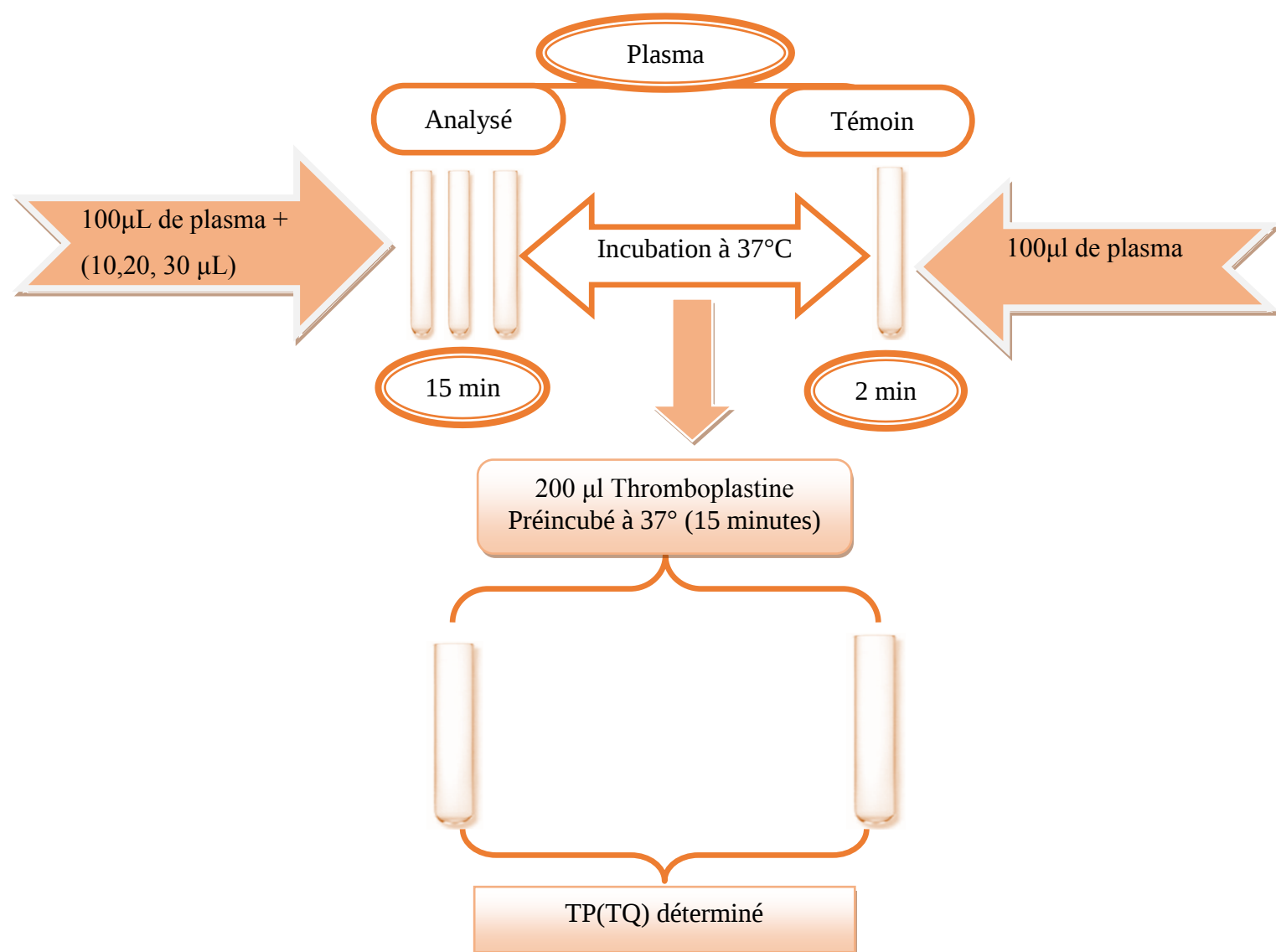


Figure 32: Etapes vis-à-vis de la voie exogène (TQ)

1.2.4. Analyse statistique

Des analyses statistiques descriptives, multidimensionnelles et décisionnelles ont été réalisées avec le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 22.

Pour chacun des paramètres étudiés, nous avons procédé à une analyse descriptive (moyenne, Ecart- type....)

Pour tester l'effet de ces paramètres sur l'activité antioxydante des trois extraits étudiée, on a procédé à une analyse de variance à trois facteurs ; le seuil de signification retenu est $P \leq 0.05$, la comparaison des moyennes a été effectuée par le test LSD.



Résultats et discussion



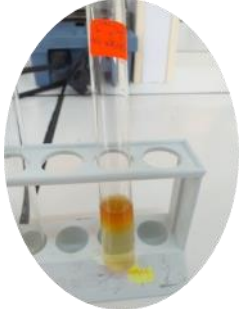
1. Analyse qualitative

1.1. Résultats

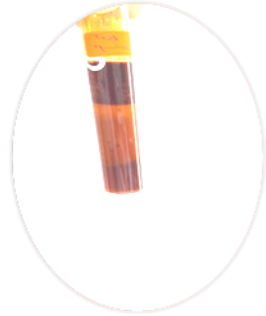
L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des plantes sélectionnées pour cette étude a permis de mettre en évidence la présence de quelques constituants chimiques. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité ou encore un changement de couleur spécifique. Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la plante étudiée sont récapitulés dans le tableau 6 :

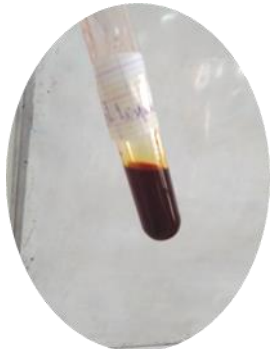
Tableau 06 : Résultats d'analyse phytochimique des métabolites primaires et secondaires

Test phytochimique	Résultat	Description des résultats	Photo
métabolites primaires			
Test des protéines	+++	- La présence des protéines est prouvée par l'apparition de la coloration violette .	
Test des lipides	+++	- La coloration violette signifie la présence des lipides dans le <i>Curcuma longa</i>	

métabolites secondaires			
Test des flavonoïdes	+	- La coloration jaune obtenue, confirme l'existence des flavonoïdes dans cette plante.	
Test des alcaloïdes	-	- Il n'y a pas de formation d'un précipité brun, ce qui confirme l'appauvrissement de <i>curcuma longa</i> en alcaloïdes.	
Test des stérols	-	- Le résultat obtenu montre que le <i>C longa</i> ne contient pas des stérols, ce résultat est fondé par l'absence de l'anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et l'absence de la coloration violette de la couche surnageant.	
Test des coumarines	-	- Les coumarines sont absents dans l'extrait de curcuma ; ce test est témoigné par l'absence d'une précipitation rouge brune.	

Test des glycosides	+++	- La Formation d'un précipité rouge brique, indique la présence des glycosides dans les extraits de <i>C longa</i> avec une quantité importante.	
Test des saponosides	±	- L'apparition d'une mousse persistante avec une hauteur de 0,4cm confirme la présence des saponines dans le curcuma, mais avec une faible quantité.	
Test des anthocyanes	+	- Ce test est révélé positif dans le milieu acide et négatif dans le milieu basique, cela nous a permis de déduire qu'il existe une faible quantité d'anthocyane.	Milieu basique  Milieu acide 

Test des tanins	—	- Le test des tanins, nous a donné un résultat positif, indiqué par l'apparition d'une coloration marron qui vire au verte.	
Test des stéroïdes	±	- L'apparition d'une coloration violette claire, vire au marron ; indique la présence des stéroïdes dans notre plante mais avec des faibles quantités.	
Test Anthraquinones libres	+++	-La coloration rouge foncée, indique la présence des anthraquinones libre dans l'extrait de <i>C longa</i> .	
Test des quinones	+++	-L'apparition de La coloration rouge confirme la richesse de <i>C longa</i> en quinones.	

Test des terpenoïdes	—	- L'absence d'un anneau marron-rouge à l'interphase, indique que le <i>C longa</i> ne contient pas des terpenoïdes.	
----------------------	---	---	---

+++ = importante quantité ; + = petite quantité ; ± = Trace; - = absence

1.2. Discussion

Après l'utilisation du criblage phytochimique pour l'acquisition des métabolites existants dans le *curcuma longa*, on a trouvé que :

Le *curcuma longa* riche en protéines, ce résultat s'accorde avec celui de **(Bhardwaj et al., 2011)**, contrairement à ce qui est obtenu par **(Sawant R et Godghate A, 2013)** et par **(Williamson G et Manach C, 2005)**.

Le *C longa* contient des lipides, ces résultats d'analyses phytochimiques s'accordent avec ceux qu'ils ont trouvés par **(Chattopadhyay et al., 2004)** et **(Jansen et al., 2005)**.

Pour les tests effectués à partir d'un extrait éthanolique Les résultats des alcaloïdes et des stérols montrent que : le *curcuma longa* est dépourvu de ces composés phénoliques et contient des flavonoïdes. En effet ces résultats sont complètement similaires aux ceux obtenus par **(Sawant R et Godghate A., 2013)**, **(Chairman et al., 2015)** et par **(Nilanjana et al., 2013)**. Les résultats des tests réalisés par **(Chairman et al., 2015)** et **(Nilanjana et al., 2013)** à partir de l'extrait aqueux et méthanolique ; ont montré que les rhizomes de la plante *C longa* contiennent des flavonoïdes et des alcaloïdes.

D'après nos résultats ; les rhizomes de *curcuma* ne contiennent pas des coumarines ; ce qui est identique au résultat trouvé par **(Sawant R et Godghate A, 2013)**.

La présence des glycosides au niveau de *curcuma longa* avec une importante quantité est affirmée par **(Swadhini P et al., 2011)**, ce qui soutient notre résultat.

Le *curcuma longa* renferme aussi les tanins et les saponosides, nos résultats s'accordent avec ceux obtenus par **(Saxena Jyoti et al., 2012)**, **(Nilanjana et al., 2013)**, **(Chairman et al., 2015)** et par **(Swadhini P et al., 2011)**.

Encourageant notre recherche, **(Swadhini P et al., 2011)** ont montré aussi que le *curcuma longa* porte des anthocyanes et anthraquinones.

Il y a un pourcentage superficiel des stéroïdes dans le *curcuma longa*, ce résultat presque sémélaire de (Saxena Jyoti et al., 2012), (Sawant R et Godghate A, 2013), (Idvetri AS et al., 2011) et (Chairman et al., 2015), mais ces derniers ont approuvés l'absence de ces métabolites lorsqu'il ont utilisés l'extrait éthanolique de *curcuma*.

Les quinones sont présentées fortement dans notre plante, ce qui est fondé par (Senthilmurugan et al., 2013) et par (Rajeshwari S et Jyoti S., 2012).

Les terpénoïdes sont absents dans notre plante, ce résultat est identique à celui trouvé par (Nilanjana et al., 2013)

2. Rendement en extraits bruts

➤ Résultat

L'extraction des composés phénoliques du *Curcuma long* L. a été faite par macération dans des solvants à polarité croissante (Méthanol – Eau). Le rendement de ces extraits (méthanolique et aqueux) a été déterminé par rapport à la poudre sèche initiale. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 33.

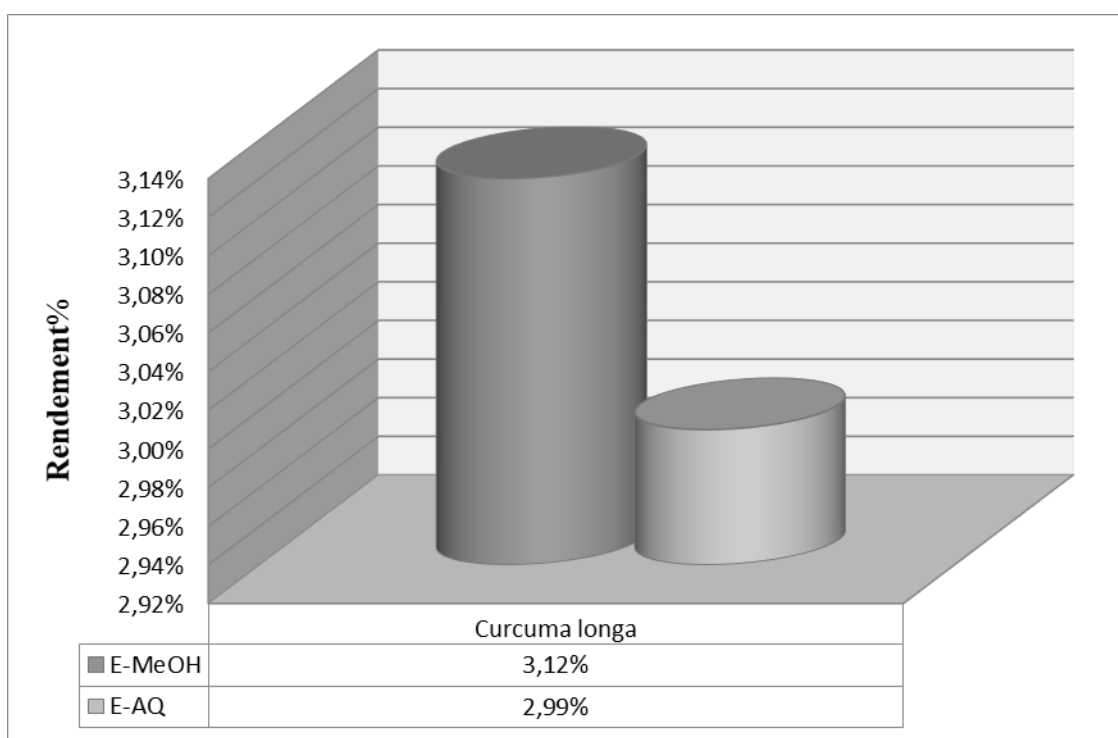


Figure 33 : Rendement des extraits bruts

D'après les résultats obtenus nous avons enregistré des rendements de **3,12** et **2,99** % pour les deux extraits méthanolique et aqueux respectivement.

3. Analyse quantitative

3.1. Dosage des polyphénols totaux

L'analyse quantitative des composés phénoliques a été réalisée par la méthode décrite dans le chapitre précédent. La teneur en phénols totaux de chaque extrait du *Curcuma longa* a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligramme équivalent en acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g) ; en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**Figure 34**).

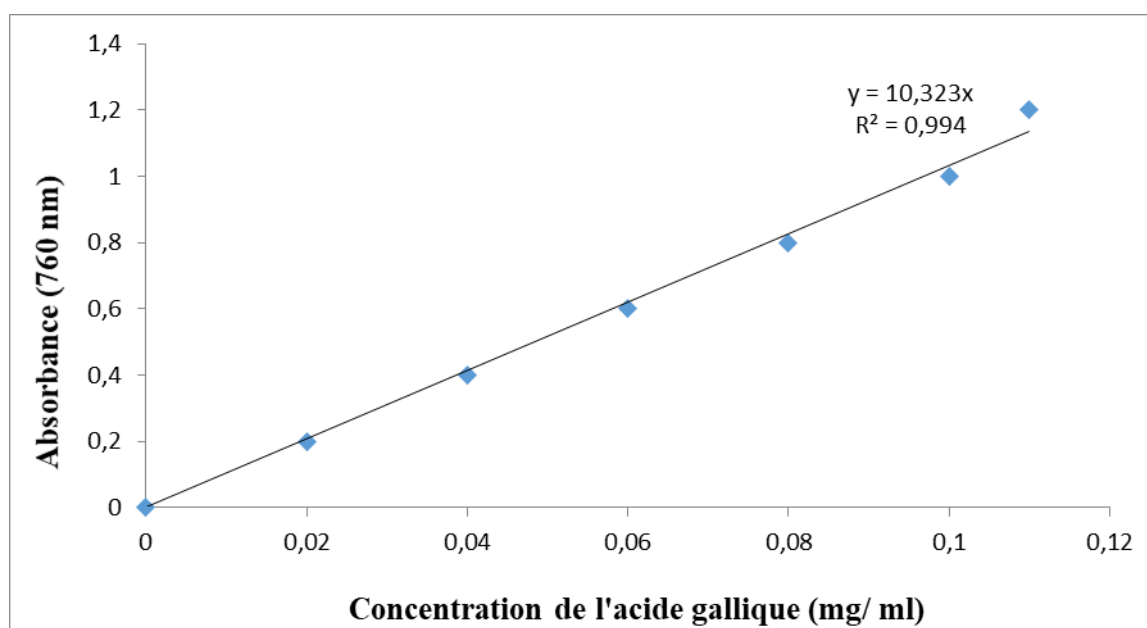


Figure 34 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

3.1.1. Interprétation des résultats

À partir des résultats représentés dans la figure 35, nous constatons que l'espèce *Curcuma longa* ; semble riche en polyphénols dans l'extrait méthanolique en comparaison avec l'extrait aqueux qui a donné des faibles rendements.

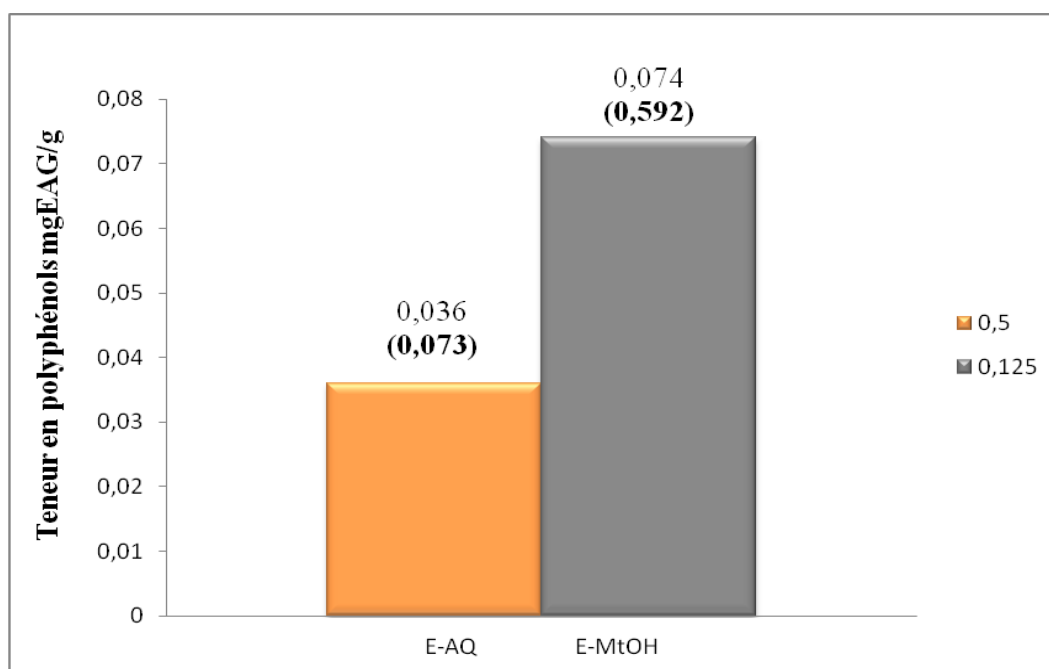


Figure 35 : Teneur en polyphénols totaux pour *C longa*

- **Extrait méthanolique**

La valeur de la teneur enregistrée dans la dilution 1/8 est de **0,074 mgEAG/g**; ce qui traduit une teneur en polyphénols totaux de **(0,592 ± 0,005 mgEAG/g)** équivalent de **59,2%**.

- **Extrait aqueux**

La dilution 1/2 de l'extrait du *C longa* a enregistré une teneur en polyphénols avec une valeur moyenne de **0,036 mgEAG/g**; ce que veut dire une teneur en polyphénols totaux de **(0,073 ± 0,006 mgEAG/g)** équivalent de **7,3%**.

3.1.2. Discussion

Le rendement d'extraction de *Curcuma longa* L. se diffèrent d'une étude à l'autre. En effet il est difficile de comparer la valeur de notre rendement avec d'autres études, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques de la plante, l'origine géographique, conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi des conditions dans les quelles l'extraction a été effectuée (nature de solvant et la méthode d'extraction...) (**Lee et al., 2003**).

Pour le dosage quantitatif des composés phénoliques, nous avons noté une teneur très élevée en polyphénols de l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait aqueux.

La richesse des extraits alcooliques en composés phénoliques est due à l'efficacité de méthanol dans l'extraction des principes actifs comme il a été mentionné par **Araújo et Leon,**

(2010) et Julie *et al.*, (2009), Que la curcumine est soluble dans l'éthanol mais insoluble dans l'eau.

Pour l'extrait aqueux ; Nos résultats de la teneur en polyphénols est proche (**7,3 mgEAG/g**) au ceux trouvés par (Menaar hayat, 2016) **7,48 mgEAG/g** ; et supérieur aux résultats de (Turki et Gudda, 2012) et (Achour et Keddar, 2017) qui ont montré que le *C longa* possède un contenu en polyphénols de (**4,14 mgEAG/g, et 32,12µg EAG/mgMS**) respectivement. Mais nos résultats restent faible comparativement aux ceux trouvé par Seggani et Boukehil, 2017 qui ont enregistré une teneur en polyphénols de l'ordre de **18.125 mg EAQ/g**.

Pour l'extrait méthanolique ; nos résultats sont révélés inférieurs (**59,2 mgEAG/g**) au ceux réalisés par Menaa hayat, 2016 qui a montré que l'extrait alcoolique (éthanol) est purement plus riche en polyphénols avec une teneur de **105.92 mgEAG/g**.

La différence en résultats de la teneur en polyphénols peut être s'expliquer par un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques température élevée exposition solaire, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage sécheresse, salinité) (Podsedek, 2007), aussi certaines études récentes ont montré que la teneur en composés phénoliques changent de façon considérables d'une espèce à une autre et à l'intérieur de la même espèce (Ksouri *et al.*,2009).

4. Activités biologique

4.1. Résultats de l'activité antioxydante

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits obtenus; différentes méthodes chimiques sont utilisées; parmi eux: le test de DPPH (2,2-diphenyle-1-picrylhydrazyle). Le principe de cette dernière repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

Les résultats obtenus pour la méthode DPPH sont exprimés en termes de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC₅₀)

L'évaluation de pouvoir antioxydant des extraits de ces plantes et du standard est effectuée avec trois temps et quatre dilutions.

➤ Analyse des effets des paramètres étudiés sur l'AAO :

Les valeurs de l'activité antioxydante des extraits de l'espèce étudiée et du standard sont représentées dans le tableau 07 :

Tableau 07 : Effet des paramètres étudiés sur l'AAO des extraits de *C longa* et de standard

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Signification
Extrait	50092,211	2	25046,105	6558,847	0,000 **
Temps	53,327	2	26,664	6,982	0,002*
Dilution	506,970	3	168,990	44,254	0,000 **
Extrait * Temps	11,952	4	2,988	,782	0,540 ^{ns}
Extrait * Dilution	12920,667	6	2153,444	563,925	0,000 **
Temps * Dilution	32,842	6	5,474	1,433	0,214 ^{ns}
Extrait * Temps * Dilution	121,297	12	10,108	2,647	0,005*

** La corrélation est hautement significative au niveau ($P \leq 0.01$)

* La corrélation est significative au niveau ($P \leq 0.05$)

^{ns} La corrélation est non significative au niveau ($P > 0.05$)

❖ Effet extrait sur l'AAO

L'effet extrait sur les résultats relatifs à l'AAO est représenté dans le tableau 08 :

Tableau 08 : Effet extrait sur l'AAO

		AAO			
		Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
Extrait	EM	48,60 ^a	12,62	29,77	67,44
	EAQ	41,73 ^b	14,95	15,38	61,38
	ASC	90,46 ^c	3,87	81,76	95,88

D'après les résultats représentés dans le tableau ci dessus on enregistre des différences hautement significatives entre le *C longa* et le standard. On note que l'ASC présente une AAO plus élevé avec une valeur moyenne de 90,40 suivi par *C longa* qui présente une AAO

moins importante que celle de l'ASC avec des valeurs moyennes de 48,60 et de 41,73 des extraits méthanolique et aqueux respectivement.

❖ Effet dilution sur l'AAO

Les résultats de l'effet de la dilution sur l'AAO sont représentés dans le tableau 09 :

Tableau 09 : Effet dilution sur l'AAO.

		AAO			
		Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
Dilution	0,1ml	61,16 ^a	26,12	29,77	95,88
	0,2ml	62,85 ^b	21,87	43,72	95,69
	0,3ml	60,14 ^c	21,97	35,69	92,16
	0,4ml	56,91 ^d	28,27	15,38	88,04

Les résultats liés à ce paramètre montrent des différences hautement significatives entre les quatre dilutions, la dilution 0.2ml enregistre la plus grande AAO avec une valeur moyenne de 62,85 par rapport aux autres dilutions. La dilution 0.1ml présente une AAO avec une valeur moyenne de 61,16. Alors que les dilutions 0.3ml et 0.4ml enregistre une AAO avec des valeurs moyenne de 60,14 et de 56,91 respectivement.

❖ Effet temps sur l'AAO

Pour l'effet du temps sur l'AAO ; les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau10.

Tableau 10 : Effet temps sur l'AAO

		AAO			
		Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
Temps	30min	59,72 ^a	24,39	20,15	95,88
	45min	59,81 ^a	24,50	17,85	93,73
	60min	61,26 ^c	25,15	15,38	95,88

Les résultats obtenus montrent que l'AAO la plus élevée est enregistrée dans le temps 60min avec une valeur moyenne de 61,26. Dans le temps 45min, l'AAO enregistre une valeur moyenne de 59,81 Alors que l'AAO la plus faible est enregistrée dans le temps 30min avec une valeur moyenne de 59,72.

❖ Effet interaction extrait /temps

L'effet interaction extrait /temps est représenté dans le tableau 11

Tableau 11: Effet interaction extrait /temps

				AAO			
				Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
Extrait	EM	Temps	30min	47,75 ^a	13,03	30,00	66,98
			45min	48,62 ^b	12,89	29,77	67,20
			60min	49,44 ^c	13,01	30,93	67,44
	EAQ	Temps	30min	41,65 ^a	14,16	20,15	61,38
			45min	41,11 ^a	15,55	17,85	60,92
			60min	42,42 ^b	16,37	15,38	58,62
	ASC	Temps	30min	89,77 ^a	4,93	81,76	95,88
			45min	89,71 ^a	2,89	84,51	93,73
			60min	91,91 ^b	3,39	86,86	95,88

Pour l'effet interaction extrait /temps. L'analyse de la variance montre que le standard (ASC) et les extraits du *C longa* ont donné une forte AAO dans le temps 60min.

L'ASC présente une valeur moyenne de 91,91. Tandis que les deux extraits de *C longa* (méthanolique et aqueux) présentent des valeurs moyenne de 49,44 et de 42,42 respectivement (**tableau 11**).

❖ Effet interaction extrait /dilution

Les résultats relatifs au paramètre interaction (extrait/dilution) pour l'espèce étudiée sont récapitulés dans le **tableau (12)** où il ressort que l'extrait méthanolique de *C longa* présente une importante valeur de l'AAO avec la dilution 0.4ml avec une moyenne de 66,17.

Cependant l'ASC et l'extrait aqueux présentent les valeurs les plus importantes avec la dilution 0.1 ml par une valeur moyenne de 93,94 et de 58,02 respectivement.

Tableau 12 : L'effet interaction extrait /dilution

				AAO			
				Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
Extrait	EM	Dilution	0,1ml	31,53 ^a	1,45	29,77	33,72
			0,2ml	45,86 ^b	1,41	43,72	47,21
			0,3ml	50,85 ^c	1,31	48,84	53,26
			0,4ml	66,17 ^d	1,12	64,42	67,44
	EAQ	Dilution	0,1ml	58,02 ^a	2,25	55,08	61,38
			0,2ml	49,66 ^b	2,04	46,46	52,15
			0,3ml	39,88 ^c	4,78	35,69	50,77
			0,4ml	19,36 ^d	3,21	15,38	26,92
	ASC	Dilution	0,1ml	93,94 ^a	1,46	91,57	95,88
			0,2ml	93,03 ^a	1,72	90,39	95,69
			0,3ml	89,70 ^b	1,56	86,86	92,16
			0,4ml	85,18 ^c	2,21	81,76	88,04

❖ Effet interaction temps /dilution

L'effet interaction temps/dilution est représenté dans le tableau 13.

Tableau 13: Effet interaction temps /dilution

				AAO			
				Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
Temps	30min	Dilution	0,1ml	61,24 ^a	27,84	30,00	95,88
			0,2ml	62,17 ^b	23,14	43,72	93,73
			0,3ml	58,62 ^c	23,44	35,69	90,20
			0,4ml	56,87 ^d	26,86	20,15	83,53
	45min	Dilution	0,1ml	60,70 ^a	26,46	29,77	93,73
			0,2ml	62,21 ^b	21,88	43,95	91,96
			0,3ml	59,68 ^c	22,99	38,15	91,18
			0,4ml	56,66 ^d	29,98	17,85	86,47
	60min	Dilution	0,1ml	61,55 ^a	27,23	30,93	95,88
			0,2ml	64,16 ^b	23,17	44,88	95,69
			0,3ml	62,12 ^c	21,98	36,15	92,16
			0,4ml	57,20 ^d	31,27	15,38	88,04

Les résultats de l'effet interaction temps /dilution montrent que l'AAO la plus importante est enregistré dans le temps 60min avec la dilution 0.2ml avec une moyenne de 64,16.

❖ **Effet interaction extrait / temps /dilution**

Les résultats de ce paramètre sont illustrés dans le **tableau 03 (Annexe 05)**

D'après les résultats obtenus, l'extrait de l'ASC et les deux extraits (méthanolique et aqueux) du *C longa* ; possèdent une forte AAO dans le temps 60 min avec la dilution 0,2 ml.

Tandis que l'extrait méthanolique du *C longa* possède une AAO importante dans le temps 60 min avec la dilution 0,4 ml avec une valeur de 66,98.

Cependant l'extrait aqueux a enregistré une meilleure AAO dans le temps 30min avec la dilution 0,1 ml par une valeur de 58,61.

➤ **Calcul des EC50 (IC50%)**

L'activité antiradicalaire des extraits de la plante étudiée est déterminée par leur capacité à réduire le radical libre DPPH exprimée en pourcentage d'inhibition.

Les valeurs des IC50 et par conséquent des pourcentages d'inhibition ont été calculés en vue de déterminer les concentrations qui réduisent 50% des radicaux libres. Une valeur faible d'IC50 (valeur élevée de pourcentages d'inhibition) indique une activité antioxydante forte.

À partir des courbes des équations des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés ($y=ax+b$) (Annexe) ; nous pouvons déterminer pour chaque extrait la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical libre DPPH ou IC50.

$y = 50\%$ (pourcentage de réduction de DPPH).

$x = IC50$ (la concentration en extrait et de l'acide ascorbique).

A) Extrait méthanolique

Les valeurs des concentrations efficaces d'IC50, et le pourcentage d'inhibition de notre extrait sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : La concentration inhibitrice (IC50) de l'extrait méthanolique de *C longa* et de l'ASC qui inhibent 50 % du Radical DPPH

	EC50%	
	EM de <i>C longa</i>	ASC
30 min	0,282	0,187
45 min	0,278	0,185
60 min	0,273	0,177

Les résultats obtenus, montrent que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante moins importante par rapport à celle du standard (ASC).

Dans le temps 30 min, l'extrait de *C longa* possède une activité antiradicalaire avec un IC50% d'ordre de **0.282 mg/ml**, alors que l'acide ascorbique présente une faible IC50% (**0.187 mg /ml**) donc une activité antiradicalaire plus importante.

Dans le temps 45 min, la concentration inhibitrice de *C longa* (**0.278 mg /ml**) s'avère supérieur à celle de l'acide ascorbique (**0.185 mg /ml**).

Dans le temps 60 min, l'acide ascorbique présente la plus faible EC50% avec une valeur de **0.177 mg /ml**, Alors que le *C longa* présente une concentration inhibitrice d'ordre de **0.273 mg /ml** ; ce qui traduit une AAO moins importante.

B) Extrait aqueux

Les valeurs des IC50 trouvées pour l'extrait aqueux testé et le standard sont représentées dans le tableau 15 :

Tableau 15 : La concentration inhibitrice (IC50) d'extrait aqueux de *C longa* et de l'ASC qui inhibent 50 % du Radical DPPH

	EC50%	
	EAQ de <i>C longa</i>	ASC
30 min	0,420	0,171
45 min	0,435	0,169
60 min	0,415	0,165

D'après les résultats enregistrés dans les trois temps, nous remarquons que l'EC50 de l'acide ascorbique est plus inférieure à celle de *C longa*.

Dans le temps 30 min, l'acide ascorbique présente une activité antioxydante avec un EC50% de **0.171 mg /ml**. Alors que *C longa* a enregistré une EC50% d'ordre de **0.420 mg /ml**.

Dans le temps 45 min, l'acide ascorbique enregistre une EC50% minimale avec une valeur de **0.169 mg /ml**. Tandis que *C longa* présente une EC50% avec une valeur d'ordre de **0.435 mg /ml**.

Dans le temps 60 min, l'acide ascorbique reste toujours capable d'exercer un effet antioxydant important avec une EC50% de **0.165 mg /ml**. Contrairement au *C longa* donne une EC50% d'ordre de **0.415 mg /ml**.

4.1.1. Discussion

La présence des composés phénoliques dans nos extraits suggère la capacité de cette plante à jouer un rôle majeur en tant qu'agent antioxydant (**Bruneton, 1993**).

L'évaluation de l'activité antiradicalaire des rhizomes de *C.longa* a été réalisée par la technique du piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus du pouvoir antioxydant du *C longa* et le standard montrent que l'extrait méthanolique a une AAO inférieure à celle de l'ASC (**65,42% et 82,61%**) respectivement. Ces résultats ne s'accordent pas avec ceux obtenus par **Seggani et Boukehil, (2017)** qui ont montré que le *C longa* a une AAO supérieure à celle de l'ASC d'ordre de **58% et 45%** respectivement.

Par contre **Achour et Keddar, (2017)**, ont montré que l'extrait de *C longa* possède une AAO moins importante à celle de l'ASC, et cela s'accorde avec nos résultats.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait méthanolique de *C. longa* présent la meilleure activité antiradicalaire avec une IC50 de **0,273 mg/ml**. Mais cette activité reste faible par rapport à celle de l'acide ascorbique IC50 d'ordre de **0,177 mg/ml**.

Une étude réalisée par **Seggani et Boukehil, (2017)** montre que l'extrait aqueux brut de *C longa* possède une IC50% de **86.4 µg /ml (0,864 mg/ml)**, ces résultats sont supérieurs au ceux obtenus dans notre étude (**0,420mg/ml**). Cependant leurs résultats de IC50 de l'acide ascorbique (**110 µg /ml (0. 11mg/ml)**) se révélés inférieur au ceux obtenus dans notre étude (**0,171 mg/ ml**).

Achour et Keddar, (2017) ont enregistrés une IC50 inférieur à que nous avons obtenus dans notre étude avec un ordre de **0,38 mg/ml**.

Nos résultats d'IC50 de l'extrait méthanolique (**0.273 mg/ml**) sont proche au ceux obtenus par **Mériem Boutamani, (2013) 22,59 mg/l (0.225 mg/ml)**

A souligner, que l'activité antioxydante du *Curcuma longa* varie d'une façon remarquable en changeant les solvants utilisés pour préparer les extraits ainsi que les concentrations.

L'analyse de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation positive entre la teneur de nos extraits en polyphénols totaux et ces activités antioxydantes.

Pour l'extrait méthanolique ; une teneur importante en polyphénols est probablement responsable de leurs pouvoir antioxydants modérés, en raison de leur capacité de réduire et décolorer le DPPH (**Talbi et al., 2015**).

4.2. Activité anticoagulante

Le pouvoir anticoagulant des polyphénols du *Curcuma longa* et de leurs principaux constituants a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TCK et le TQ respectivement.

4.2.1. Résultat

a) Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

Les résultats de l'activité anticoagulante obtenus (**Figure 36**) révèlent que les deux extraits méthanoliques et aqueux des rhizomes du *Curcuma longa* possèdent une activité anticoagulante dose dépendante.

Un temps de coagulation (TCK) allongé par rapport à un témoin de TCK de 39 S, le TCK normal est compris entre 30 et 40 S selon le réactif.

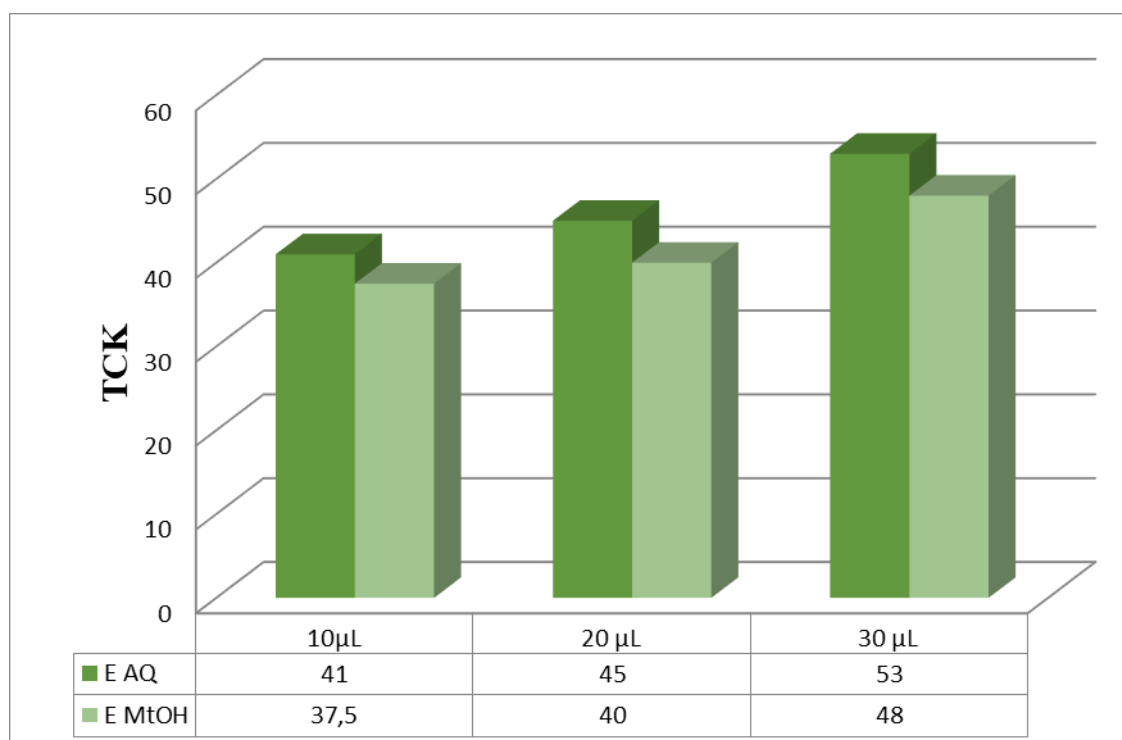


Figure 36 : Capacité anticoagulante des extraits méthanoliques et aqueux de *C longa* vis-à-vis de la voie endogène.

Les extraits dosés montrent des temps de coagulation différents. L'observation générale de l'histogramme révèle que les extraits aqueux exercent des TCK relativement plus importants que les extraits méthanolique.

Les différents volumes (10, 20, 30µL) des extraits méthanoliques et aqueux de *C longa* montrent que le volume 10µL présente une activité anticoagulante avec un TCK de 41S par un allongement de 2 S pour l'extrait aqueux et un TCK de 37,5S avec un allongement de 1.5S pour l'extrait méthanolique (**Figure 36**).

Par ailleurs, le volume 20µL capable d'exercer un effet anticoagulant sur la voie endogène de la coagulation, estimé par un TCK de 45 S par un allongement de 6 S pour l'extrait aqueux et un TCK de 40 S par un allongement de 1 S pour l'extrait méthanolique (**Figure 36**).

Finalement, le volume 30µL a une capacité anticoagulante estimée par un TCK de 53S par allongement de 14 S pour l'extrait aqueux et un TCK de 48 S par un allongement de 9S pour l'extrait méthanolique (**Figure 36**).

b) Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

Le TQ normal est compris entre 12 et 14 secondes selon les réactifs utilisés (Caquet R, 2004) et un allongement par rapport au contrôle négatif traduit une activité anticoagulante du matériel testé vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation. Un temps de coagulation (TQ ou TP) allongé par rapport à un témoin a un TQ de 12,5S.

Dans un premier temps, des extraits méthanolique et aqueux à des volumes différents (10, 20, 30 μ L) de *C longa* sont incubées avec le plasma durant certains temps (15 min) à fin de déterminer le temps d'incubation optimal pour obtenir une activité anticoagulante élevée (figure 37).

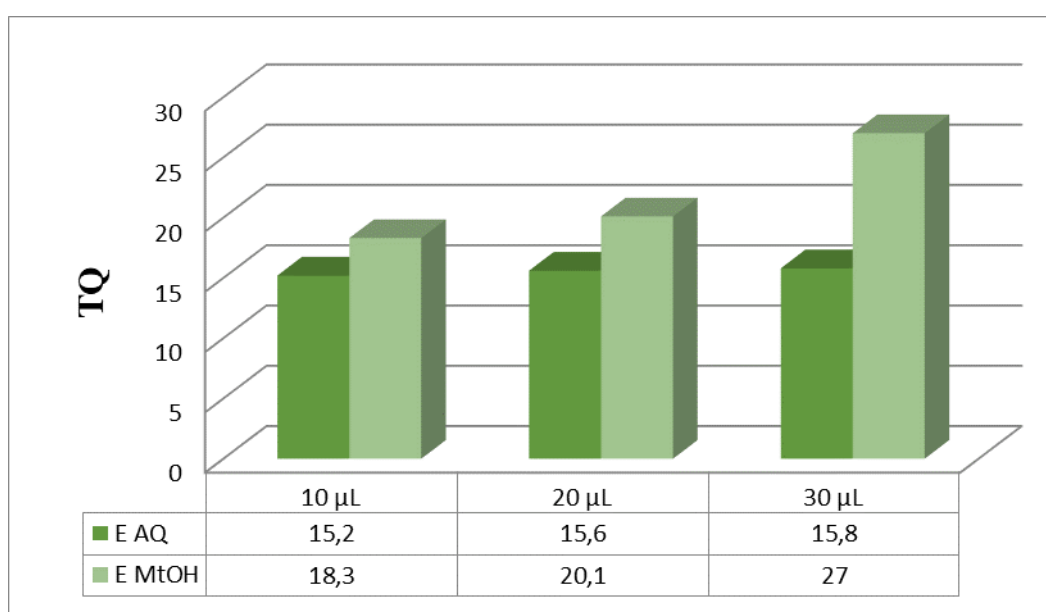


Figure37 : Capacité anticoagulante des extraits méthanoliques et aqueux de *C longa* vis-à-vis de la voie exogène.

Le volume 10 μ L des extraits aqueux et méthanoliques de *C longa* capable d'allonger le temps de quick avec des valeurs d'ordre de (2,7S et 5.8S) avec un TQ de 15,2S et de 18,3S respectivement.

Cependant, le volume 20 μ L des extraits aqueux et méthanoliques de *C longa* a une activité anticoagulante estimée par un TQ de 15,6 S par un allongement de 3,1S, et un TQ de 20 ,1 S par un allongement de 7,6 S respectivement (**Figure 37**).

Enfin, le volume 30 μ L possède un effet anticoagulant vis-à-vis de la voie exogène avec des TQ de 15.8S avec un allongement de 3.3 S pour l'extrait aqueux et un TQ de 27 S avec un allongement de 14.5 S pour l'extrait méthanolique (**Figure 37**).

4.2.2. Discussion

Globalement, l'évaluation de la capacité anticoagulante des extraits méthanolique et aqueux de *Curcuma longa* établi par les deux tests chronométriques d'exploration de la coagulation ; le TCK et le TQ démontre que ces extraits exercent une activité anticoagulante vis-à-vis les deux voies de la coagulation.

Nos résultats s'accordent au ceux de (**Kim et al., 2012**), qui ont trouvé que le Curcuma empêche l'agrégation plaquettaire et la formation des caillots, ce qui aide et stimule la circulation sanguine, comme ils signalent également que la curcumine (composé principale de polyphénols) prolonge significativement le PTT (temps de céphaline activé) et le TP et inhibe les activités de thrombine et de facteur FX (**Kim et al.,2012**).

Menaa hayat (2016) travaillant sur les activités anticoagulantes et phagocytaires de quelques épices (Curcuma, Gingembre et Poivre noir) a démontré que l'espèce *Curcuma Longa* n'exerce qu'une faible activité anticoagulante vis-à-vis des deux voies de la coagulation. Ce qui ne s'accorde pas au nos résultats

À propos de gingembre qui est une espèce de même famille du *C longa*, elle a été démontrée qu'il peut inhiber l'agrégation plaquettaire, et diminuer la production in vitro du thromboxane par les plaquettes. **Verma et al., (1993)**, Ont trouvé également que le gingembre peut diminuer l'agrégation des plaquettes, ce qui confirme nos résultats obtenus. Par contre ; (**Lumb, 1993**), n'a trouvé aucun effet de gingembre sur la numération plaquettaire, ni sur l'agrégation des plaquettes, ni sur le temps de saignements (signifie, le temps qui s'écoule entre la création d'une blessure et l'arrêt du saignement).



Conclusion et perspectives



Conclusion et perspectives

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et est devenue aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs.

Dans le cadre de la valorisation des polyphénols des rhizomes du *Curcuma longa* à travers l'étude de leurs effets préventifs contre le stress oxydant et les complications cliniques des maladies thrombotiques.

Le screening phytochimique effectué, nous a permis de mettre en évidence la richesse de notre plante en lipides, protéines, flavonoïdes, anthraquinone libre et le sucre réducteur. Elle est dépourvue des terpénoïdes, coumarines, stérols et alcaloïdes.

En outre, les résultats de la quantification des polyphénols totaux ont révélé que :

- L'extrait méthanolique présente la teneur la plus élevée en polyphénols totaux d'ordre de **(59,2 ± 0,005 mgEAG/g)** tandis que la teneur la plus faible est enregistrée avec l'extrait aqueux avec une valeur de **(7,3± 0,006 mgEAG/g)**.

L'évaluation de la capacité antioxydante a été déterminée en utilisant le test du DPPH qui a permis d'établir que ces extraits possèdent un pouvoir raisonnable de piéger ce radical avec des IC₅₀.

Les valeurs EC₅₀ du test DPPH ont montré que l'extrait méthanolique possède une activité réductrice du radical plus élevée que l'extrait aqueux.

La comparaison entre les résultats de l'AAO de l'espèce étudiée (*C longa*) et le standard (ASC), montre que ce dernier donne une AAO très élevée à celle de l'espèce étudiée (*C longa*).

D'une manière générale les polyphénols de *C longa* possèdent des propriétés antioxydantes remarquables et cette activité n'est pas attribuée seulement aux composés phénoliques, mais aussi à l'effet synergique des composés non phénoliques.

L'activité anticoagulante de nos extraits a été évaluée in vitro en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ). L'étude de l'effet des extraits sur l'allongement du temps de coagulation des deux voies a permis d'asseoir que ces extraits exercent une activité anticoagulante vis-à-vis les deux voies de la coagulation.

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires approfondies à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée de ces polyphénols par d'autres techniques telles que la GC/SM ou l'HPLC/MS. Les activités antioxydante et anticoagulante doivent être évaluées dans d'autres systèmes *in vitro* (cellulaires et enzymatiques) comme *in vivo* afin de mieux cerner les interactions moléculaires de ces phénols vis-à-vis de leurs cibles.



Références bibliographique

A

- **Abou Zeid, H. (2000).** Les huiles essentielles, Cairo Ed Adar el Arabia. P.256.
- **Afaq, F. et Malik, A. (2005).** Pomegranate Fruit Extract Modulates UV-B-mediated Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinases and Activation of Nuclear Factor Kappa B in Normal Human Epidermal keratinocytes. *Photochemistry and photobiology*, 81 (1): 38-45.
- **AFNOR. (2000):** Association Française de Normalisation, Huiles essentielles. Monographie relatives aux huiles. 6^{ième} édition. AFNOR, Paris.
- **Ajjan, R. et Grant, P.J. (2006).** Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis*, 186, p240–259.
- **Aighewi .B.A., Akoroda. M., et Asiedu.R.(1998).** Preliminary studies of seed yam production from minisetts with different thicknesses of cortex parenchyma in white yam (*Dioscorea rotundata*). 6th Symposium of the ISTRC-AB, Lilongwe (Malawi), 22-28 Oct.
- **Allen, KG., Banthorpe, D V., et Charlwood BV. (1977).** *Photochemistry* 16:79- 83
- **Al-Mamary, M., Al-Meer, A., et Al-Haboui, M. (2002) .** Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*. 22: 1041-1047.
- **Amandine Plaziat-Decourcelle. (2009).** Les anticoagulants: mise au point en 2009. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré - NANCY 1, faculté de pharmacie.
- **Ammar, R.B., Bhour, W., Sghaier ,M.B., Boubaker ,J., Skandrani ,I., Neffati, A., Bouhlel, I., Kilani, S., Mariotte ,A. M., Chekir-Ghedira, L., Dijoux-Franca ,M.G.D., et Ghedira ,K.(2009).** Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chem.* 116: 258-264.
- **Anderson, C.M., Halleberg ,A., et Hogberg ,T.(1996).** Advances in the development of Pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res.* 28, pp 65-180.
- **Antwerpen P-V. (2006).** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myeloperoxydase /peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de Doctorat .Université libre de Bruxelles. pp 122
- **Armouche H.(2007).** El Aachab fi kiteb. Damas, Syrie. 4^{ème} ed Dar El Nafais,

Références bibliographique

- **Athukorala .Y., Lee .KW., Kim .SK., et Jeon. YJ.** (2007) Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*. 98: 1711–1716.
- **Aurousseau. B. (2002).** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. INRA. Prod. Anim. 15: 67-82.
- **Ayad R., (2008).** Recherche et dtermination structural des métabolites secondaires de l'espèce zygophyllum cornutum. Mémoire magister en chimie organique. Université Mentounri Costantine pp 35-47.
- **AFNOR. (2000).** Association Française de Normalisation, Huiles essentielles essentielles, Tom2, Monographie relatives aux huiles.6^{ième} édition. AFNOR, Paris.

B

- **Boullard B.** (2001). Dictionnaire des plantes médicinales du monde. Paris, Estem.p.174.
- **Benslama A.** (2016). Substances d'origine végétale. Université Mohamed Khider-Biskra.
- **Bamforth.C.W.** (2000). Perceptions of beer foam. *J. Inst. Brew*, 106: 229-38.
- **Bessas.A., Benmoussa.L., Kerarma.M.,** (2007). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie.
- **Bruneton J.** (1999). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. Paris. 3^{ème} édition, Lavoisier Techniques & Documentation.
- **Bakkali .F., Averbeck .S.,Averbeck. D., et Idaomar.M.**(2008) Biological effects of essential oils--a review. *Food and Chemical Toxicology*. Feb., 46(2):446-75.
- **Benchaar .C., Calsamiglia .S., Chaves. A.V., Fraser .G.R., Colombatto. D., McAllister. T.A. et al. (2008).** Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*., 145: 209–228.
- **Bruneton .J.** (2009) .Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Tec et Doc. Lavoisier 4^{ème} édition, Paris.
- **Belbache H.,** (2003).Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de Centaurea Parviflora Desf. Mémoire de magister en chimie organique. Université Mentouri Costantine. Pp 16-20.

Références bibliographique

- **Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, Lavoisier, 623p.
- **Barouki .R.(2006)** .Stress oxydant et vieillissement. Médecine/Sciences ; 22: 266-72.
- **Babior B-M., Lambeth J-D., Nauseef W.(2002)** The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 397 pp 342-344.
- **Bonnefond-Rousselot D., Peynet J., Beaudeau J.L., Terond P., Legrand A. et Delattre J. (2002)** .Stress oxydant, fonction vasculaires et athérosclérose. Nutrition clinique et métabolisme.16: 260-267.
- **Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. Glyco. Science & Nutrition. 4(6):7p.
- **Bédane C. (2008).** Photodermatologie : Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie. Edition Wolters Kluwer France, p 20.
- **Blandine G. (2006).** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherim adpressum* et *Ononis anfastissimma*. Thèse de doctorat. Université de Constantine.
- **Batty P., Smith G.(2010).** Anticoagulation. Surgery, vol. 28 (6), 243-247.
- **Boizot,N.et Charpentier,J.P. (2006)** . Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, INRA.p 79-82.
- **Bui Thanh, T., Vu Duc, L., Nguyen Thanh, H. et Nguyen Tien, V. (2016).** In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of isolated compounds of ethanol extract from *Sanchezia speciosa* Leonard's leaves. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*
- **Bouras. F.,Houchi.A.(2013).**Etude de L'activité Antioxydante de La Plantes *Rumex Vesicarius* L. Mémoire Master Académique, P28.

C

- **Caen .J., Lrrieu. MJ.,et Samama .M. (1975).** L'hémostase : méthodes d'exploration et diagnostic pratique (2ème Ed), Expansion Scientifique Française (Paris)., Pp : 15-20.
- **Caquet R. (2004).** 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation (9ème Ed), Masson (Paris)., pp :388-389.

Références bibliographique

- **Cristina .P., Ilonka .S.,et Bartek.T.**(2009).Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, Revue de génie industriel, 4, 25-39.
- **Colvin. B.T.** (2004): Physiology of haemostasis.VoxSanguinis., 87(1): 43-46.
- **Caen. J., Lrrieu.M.J.,et Samama.M.**(1975):L'hémostase : méthodes d'exploration et diagnostic pratique (2éme éd), Expansion Scientifique Française (Paris), p15-20.
- **Calsamiglia .S., Busquet .M., Cardozo .P.W., Castillejos. L.,et Ferret .A.**(2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science. 90: 2580–2595.
- **Cavin A.,** (1999). Investigation phytochimique de trios plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: Tinos poracispa (Menispermacées), Merremia emarginata (Convolvulacées) et Oropea enneanda (Annonacées). Thèse de doctorat Lausanne, p 241.
- **Cheriti .A., Rouissat. A., Sekkoum .K. et Balansard. G.**(1995). "Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El Bayadh (Algérie)". Fitoterapia. Vol. 66(6) : 525-538.
- **Chairman K; Jayamala M ;Vijila Christy R and Ranjit Singh Aja.,** (2015)..Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *curcuma longa* .Natural Dye. Phytochemistry 16:79 83
- **Cuendet M.,**(1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : *Bartsia alpina* (Scrophulariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) *Campanula barbata* (Campanulaceae).Thèse de doctorat .Université de Lausanne, p 24.
- **Cuendet M.,** (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : *Bartsia alpina* (Scrophulariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) *Campanula barbata* (Campanulaceae). Thèse de doctorat. Université de Lausanne, p 24.
- **Carole G.,** (1971). *Curcuma longa* L(Zingibéracées).Thèse pour le diplôme d'etat de docteur en pharmacie.Université de Limoges,Faculté de pharmacie.Pp 101-104 ..

D

- **Delaveau .P.** (1987). Les épices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Paris. Albin Michel. 130-136.

Références bibliographique

- **Dohare, P. et Garg, U.** (2008). Neuroprotective efficacy and therapeutic window of curcuma oil: in rat embolic stroke model. *BMC Complement Altern Med.*; 8:55.
- **Durvelle .J.P.** (1930). Fabrication des essences et des parfums, Ed : Librairie centrale des sciences ; Desforge, Girardo & Cie, Paris.
- **Droillard, M.J. et Paulin, A.** (1990). Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol.*, 94 (3), 1187-1192.
- **Delattre. J., Beaudoux .J.L., et Bonnefont-Rousselot. D.** (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405p.
- **Djebaili S., (1984).** Steppe algérienne, phytosociologie et écologie. Office des publications universitaires (OPU), Alger, 182 p.
- **Diallo D., (2000).** Ethno pharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Azaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetic* (Meliaceae). Thèse de doctorat de recherche, Faculté des sciences de l'université de Lausanne Suisse.

F

- **Favier A., (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*; 108-115.
- **Falanga.A., Schieppati. F., et Russo.D., (2015).** Cancer Tissue Procoagulant Mechanisms and the Hypercoagulable State of Patients with Cancer. *Semin Thromb Hemost*; 41: 756-764.

J

- **Jacques, B .et André, R** (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219- 220-223- 225.
- **Jansen. P.C.M., Grubben.G.J.H., et Cardon. D.** (2005). Ressources végétales de l'Afrique tropicale 3. Colorants et tanins. Wageningen, Pays-Bas: PROTA, 238p.
- **James .JS.** (1996). Curcumin: clinical trial finds no antiviral effect. *AIDS Treat News.*, 1–2.

H

- **Hemingway.R.W.**(1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New - York.
- **Hadi M.,** (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques.Thèse pour obtenir le titre de docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur, Domaine: Pharmacochimie, Université Strasbourg I, pp155.
- **Halenge. J,**(2007). Le stress oxydant. p628.
- **Halliwell .B,** (2006). Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4.Clarendon Press. Oxford.
- **Hirsh. J., Dalen. JE., Poller.L., Deykin .D.,** (2001). Oral Anticoagulants: Mechanism of Action Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range. *CHEST*; 119:8S–21S.
- **Harborne .J.B,** (1998).Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB). 203-214.
- **Hocine Farah Meriem., & Gorine Mohammed Amine.,** (2017). Évaluation de l'exposition au plomb et cadmium et impact sur quelques paramètres du statut oxydant/ antioxydant chez les ouvriers exposes aux fumées de soudage. Mémoire de Master. Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen. Faculté des Sciences de la Nature, Vie, Terre et Univers.

I

- **Itokawa. H., Shi .Q., Akiyama. T., Morris-Natschke. S., et Lee. K.H.,** (2008). Recent advances in the investigation of curcuminoids.
- **Igor Passi L.B.,** (2002). Etude des activités biologique de *Fagara zanthoxyloïdes* Lam (Rutaceae). Thèse doctorat en pharmacie, Bamako, p 133.

G

- **Gravot, A.** (2008). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1-L2.

- **Ghazi F., et Sahraoui S.,** (2005). Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia. Mémoire d'ingénieur en agronomie, El Harrach.
- **Ghedira .K.** (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. Vol 3(4) ; pp 162-169.
- **Ghestem A, Seguin E, Paris M et Orecchioni A.M :** 2001- Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, -Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris.
- **Girotti –Chanu C.,** (2006). Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *mirotea de bilis*. thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon, pp 136.
- **Gonzalez A.G et Estevez-Braun A.,** (1997). Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, 14 : 465-475.
- **Gueye P-M.** Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-erythrocytaire sur le globule rouge .Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur Strosbourg. 2007, pp 247.
- **Gurib-Fakim. A.** (2006). Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine. Med. Plan.*, 27:1-93.

K

- **Kansole M.M.R.,** (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un Diplôme (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
- **Karou. D., Dicko. M. H., Simporé. J., Yameogo. S., Sanon.S., et Traore. A.S.** (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106: 119-133.
- **Koechlin-Ramonatxo.C.** (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 20 : 165–177.
- **Kortchinsky.T., Vigue .B., et Samama. C.** (2013). Antagonisation des héparines et des nouveaux anticoagulants. *Reversal for heparins and new anticoagulant treatments*, 37- 49.

- **Kim DC Ku SK, et Bae JS.,** (2012). Anticoagulant activitie of curcumin and its derivative. BMB Rep; 45(4): 221-226. PMID: 22531131

L

- **Lemjelled Lamiaa.,** (2015). Etude phytochimique et évaluation de différentes activités des extraits de *Pimpinella anisum*. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.
- **Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V., Biro, L.** (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biol. Szegedientsis*, 1-4: 119-125.
- **Lakshmi. G., Smitha. N., Ammu.S.V., Priya, C.L. et Bhaskara Rao, K.V.**
- **Lee J., Koo N. et Min D.B.,** (2006). Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3 (1): 21-33.
- **Loomis, D. Croteau, R.** (1980). Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds). *The Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function* No. 4. p 364-410. Academic Press, San Francisco.
- **Lemaoui A.,** (2011). Activités antioxydants et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*. L Algérienne. Université Ferhate Abbase – SETIF. Faculté des Science de la Nature et de la Vie.

M

- **Muanda. FN.** (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité. Lavoisier 4ème édition, Paris.
- **Maldonado M.,** (2012). *Peumus boldus* M. De la botanique à la thérapeutique. Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état. Université Joseph Fourier, faculté de pharmacie de Grenoble. P 16-19.
- **Marfak A.,** (2003) Radiolyse Gamma des Flavonoides. Etude de Leur Reactivite avec les Radicaux issus des Alcools : Formation de Depsides. Docteur de l'universite de limoges Spécialité : Biophysique, Universite de Limoges, Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé, Faculté de Pharmacie, , pp220.
- **Memelink J., Verpoort R., et Kigine J. W.,** (2001). Organisation of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism.

Références bibliographique

- **Menea H.**, (2015) .Activités anticoagulante et phagocytaire de quelques épices (curcuma, gingembre et poivre noir).Mémoire de master académique. Université Kasdi,Merbah.OUARGLA.Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
- **Mibindzou Mouellet A.**, (2004). Screening phtochimique de deux espèces de plantes : *Crotalia retusa L* (papilionaceae) et *Hallea ciliata* Aubrev & Pellegrer. (rubiaceae) récoltées au Gabon, thèse de doctorat, Mali, 58 p.
- **Middleton E et Drzewiecki G.**, (1993) .Ascorbic acid protects against flavonoidoxidation: A possible mechanism of augmented flavonoid effects (Abstract). JAllergy Clin Immunol 91:301
- **Moffarts. B., Kirschvink.N., Pincemail. J., et Lekeux .P.** (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. Animale. Médecine. Vétérinaire. 149: 1-9.

N

- **Nilanjana Deb., Purba Majumd., Ajoy Kumar Ghosh.**, (2013). Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of the Rhizomes of *curcuma longa* Linn.

P

- **Pench L.**, (2015). Peut-on prendre le risque hémorragique par le biais d'un interrogatoire médical ? Thèse de doctorat en chirurgie dentaire, Université Toulouse III, Faculté de chirurgie dentaire, p 111.
- **Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Pagliaro P.** Cardioprotection: A radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1787: 781–793.
- **Penso G.**, (1986).Les plantes médicinales dans l'art et l'histoire. Paris. Roger Da Costa.
- **Perry M-C.**, (2008). Evaluation de la curcumine comme agent anti-cancéreux dans le traitement des tumeurs cérébrales. Mémoire : Chimie : Montréal : 2008.)
- **Pincemail J. et Defraigne J.O.** (2004) . Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène, Symposium « antioxydant et alimentation » institut Danone. 23/10/2004.
- **Pincemail J., Defraigne J.O. and Limet R.** (2001) .Vitamines, acides gras et prévention des maladies cardiovasculaires. Medi Sphère. 130.

Références bibliographique

- **Plaziat-Decoucel A.**, (2009). Les anticoagulants. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Henry Poincaré – Nancy 1, Faculté de pharmacie, P 123.
- **Pandey KB et Rizvi SI.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res.*, 28, pp 65-180.
- **Paris, M. et Hurabielle, M.** (1981) .Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson p.339

R

- **Raffaele De Caterina¹; Steen Husted; Lars Wallentin; Felicita Andreotti; Harald Arnesen; Fedor Bachmann; Colin Baigent; Kurt Huber; Jørgen Jespersen; Steen Dalby Kristensen Gregory Y. H. Lip; João Morais; Lars Hvilsted Rasmussen; Agneta Siegbahn; Freek W. A. Verheugt; Jeffrey I. Weitz.** (2013). General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants. 109: 569–579.
- **Revel T, et Doghmi K.**, (2004). physiologie de l'hémostase EMC-Dentisterie I 71 - 81.
- **Reynal, B. et Multon, J.** (2009). Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Paris: Éd. Tec & Doc.
- **Ribéreau-Garyon.P.** 1968 : Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod Paris, p 254.
- **Roberts CK and Sindhu KK.**, (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. Life Sciences; 84: 705–712.

S

- **Schved JF.**, (2008). Hémophilie: physiopathologie et bases moléculaires.
- **Segnou Fatakun C.A, Akoroda, et MHahn S.**, (1992). "Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata*)". *Euphytica*. 64 (3):197.
- **Seifried .HE., Anderson. DE., Fisher. EI., et Milner. JA.** (2007) A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*;
- **Shahide N.**, (2016). Valeurs thérapeutique de curcuma. Laboratoire phytomisan France.

- Sangwan. N.S., Farooqi .A.H.A., Shabih .F.,et Sangwan .R.S.(2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. 34: 3–21
- Sijelmassi A., (2003). "Les plantes médicinales du maroc", Ed. Le Fenec, Casablanca, Maroc

T

- Thomas M., (2011). "Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*)". Thèse de doctorat. Université d'Orléans.
- Thomas O.P., (2009). Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Université Nice Sophia Antipolis. (1): 38-45.
- Talbi.H., Boumaza. A., El-mostafa.K., Talbi. J. et Hilali. A. (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Journal of Materials and Environmental Science*, 6 (4) : 1111-1117.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. and Polissiou M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90; 333-340.
- Thérond .P., Bonnefont-Rousselot . D., Davit-Spraul.A., Conti.M.,et Legrand, A. (2000). Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 3(5):373-84.
- Trease E. et Evans W.C., (1987). Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13th ed.

V

- Vansant G. (2004) .Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone. Verlaine-Metz, Metz, 239 p.
- Vermerris W. (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer. Dordrecht. ISBN-1001-4020-5163-8 (HB).
- Vogler, A.E.,et Siedlecki, A.C. (2009):Contact activation of blood-plasma.

W

- **Wang J., Wang F., Zhang Z.,et Shi X.,** (2009). Synthesized different derivatives of low molecular Fucoidan extracted from Laminaria japonica and their potential antioxidant activity in vitro. Int j boil Macromol; 44(5): 379-84.
- **Wun C.** (2003). Safty and antiinflammatory activity of curcumin. Compoment Med Res. 131; 682-91.

Sites web:

[i]. National Institute for Health. (2012). National Center for Complementary and Alternative Medicine, [en ligne], adresse URL: <http://nccam.nih.gov/>

[ii]. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Curcuma>, Consulté le 19 juillet 2009.

[iii]. <https://www.jardineriaon.com/como-cultivar-curcuma.html>, Consulté le 4 janvier 2017.



Annexes



Annexe 01 : Matériel de laboratoire

➤ **Appareillage :**

Nom	Photo
Balance	
Etuve	
Rotavapeur	
Plaque chauffante agitatrice	

Agitateur mécanique	
Plaque chauffante	
Spectrophotomètre	
Bain marie	

Coagulomètre	
vortex	
Balance de précision	
Centrifugeuse	

➤ **Matériel et Verreries :**

Flacons ; béchers ; erlenmeyers ; entonnoirs ; tubes à essai ; Papier filtre ; barreau magnétique; spatules ; pipettes ; Portoirs ; verres de montre, micros pipettes, boîtes de Pétri en verre, boîtes de Pétri en plastique, pipettes graduées, parafilme, papier aluminium.

➤ **Produits chimique et réactifs :**

Méthanol ; Ethanol ; Ether de pétrole; Acide gallique ; Folin Ciocalteu ; Iodure de potassium ; Iode ; Acide chlorhydrique (HCL) ; Hydroxyde d'ammonium ; Ether di-éthylique ; Alcool chlorhydrique ; Copeaux de magnésium ; Alcool iso-amylque ; Chlorure ferrique (FECL3) ; liqueur de Fehling ; KOH ; NAOH ; NH4OH ; H2SO4 ; NH4OH ; Anhydride acétique ; Chloroforme ; Carbonate de sodium ; DPPH, Céphaline kaolin, Chlorure de calcium, Thromboplastine calcique.

➤ **Réactifs utilisés pour le screening phytochimique :**

• **Réactif de Wagner :**

Iodure de potassium.....2 g
Iode.....1,27 g
Eau distillée.....100 ml

• **HCL (10%)**

4.15 ml (HCL 37%) —————→ 50ml d'eau distille

• **KOH (10%)**

5.6g —————→ 100 ml d'eau distille

• **FeCl₃ (1%)**

1.62g —————→ 100 ml d'eau distille

• **FeCl₃ (2%)**

3.24g —————→ 100 ml d'eau distille

Annexe 02 : AAO

Tableau 01 : Absorbance des extraits de l'ASC dans les temps (30, 45, et 60 min)

Acide ascorbique							
		Dilution	1ère	2ème	3ème	moyennes	ECARTYPEP
Extrait Méthanolique	30 min	0.1 ml	0,097	0,103	0,108	0,10266667	0,00449691
		0.2 ml	0,093	0,090	0,089	0,09066667	0,00169967
		0.3 ml	0,065	0,051	0,055	0,057	0,00588784
		0.4 ml	0,048	0,043	0,038	0,043	0,00408248
	45 min	0.1 ml	0,095	0,099	0,100	0,098	0,00216025
		0.2 ml	0,090	0,087	0,081	0,086	0,00374166
		0.3 ml	0,055	0,048	0,065	0,056	0,00697615
		0.4 ml	0,043	0,040	0,039	0,04066667	0,00169967
	60 min	0.1 ml	0,088	0,092	0,091	0,09033333	0,00169967
		0.2 ml	0,084	0,088	0,085	0,08566667	0,00169967
		0.3 ml	0,039	0,032	0,043	0,038	0,00454606
		0.4 ml	0,032	0,028	0,025	0,02833333	0,00286744
Extrait Aqueux	30 min	0.1 ml	0,021	0,029	0,033	0,02766667	0,00498888
		0.2 ml	0,032	0,037	0,039	0,036	0,00294392
		0.3 ml	0,050	0,052	0,067	0,05633333	0,00758654
		0.4 ml	0,084	0,089	0,093	0,08866667	0,00368179
	45 min	0.1 ml	0,032	0,040	0,043	0,03833333	0,0046428
		0.2 ml	0,044	0,041	0,049	0,04466667	0,00329983
		0.3 ml	0,045	0,059	0,056	0,05333333	0,00601849
		0.4 ml	0,079	0,073	0,069	0,07366667	0,00410961
	60 min	0.1 ml	0,031	0,028	0,021	0,02666667	0,00418994
		0.2 ml	0,026	0,022	0,030	0,026	0,00326599
		0.3 ml	0,040	0,055	0,049	0,048	0,00616441
		0.4 ml	0,067	0,061	0,065	0,06433333	0,00249444

Tableau 02: Absorbance des extraits du *C longa* dans les temps (30, 45, et 60 min)

<i>Curcuma longa.L</i>							
		Dilution	1ère	2ème	3ème	moyennes	ECARTYPEP
Extrait Métanolique	30 min	0.1 ml	0,300	0,295	0,301	0,29866667	0,00262467
		0.2 ml	0,235	0,242	0,229	0,23533333	0,00531246
		0.3 ml	0,217	0,211	0,220	0,216	0,00374166
		0.4 ml	0,151	0,153	0,142	0,14866667	0,00478423
	45 min	0.1 ml	0,302	0,286	0,293	0,29366667	0,00654896
		0.2 ml	0,227	0,241	0,229	0,23233333	0,00618241
		0.3 ml	0,215	0,209	0,212	0,212	0,00244949
		0.4 ml	0,147	0,149	0,141	0,14566667	0,00339935
	60 min	0.1 ml	0,291	0,285	0,297	0,291	0,00489898
		0.2 ml	0,228	0,237	0,227	0,23066667	0,00449691
		0.3 ml	0,210	0,201	0,207	0,206	0,00374166
		0.4 ml	0,145	0,141	0,140	0,142	0,00216025
Extrait Aqueux	30 min	0.1 ml	0,289	0,267	0,251	0,269	0,01557776
		0.2 ml	0,328	0,335	0,345	0,336	0,00697615
		0.3 ml	0,398	0,410	0,418	0,40866667	0,00821922
		0.4 ml	0,475	0,516	0,519	0,50333333	0,02007209
	45 min	0.1 ml	0,292	0,275	0,254	0,27366667	0,01554206
		0.2 ml	0,320	0,318	0,348	0,32866667	0,01369509
		0.3 ml	0,402	0,394	0,397	0,39766667	0,00329983
		0.4 ml	0,527	0,532	0,544	0,53433333	0,00713364
	60 min	0.1 ml	0,287	0,272	0,269	0,276	0,00787401
		0.2 ml	0,311	0,313	0,327	0,317	0,00711805
		0.3 ml	0,415	0,320	0,355	0,36333333	0,03922867
		0.4 ml	0,529	0,535	0,550	0,538	0,00883176

Annexe 03: Les pourcentages d'inhibitions

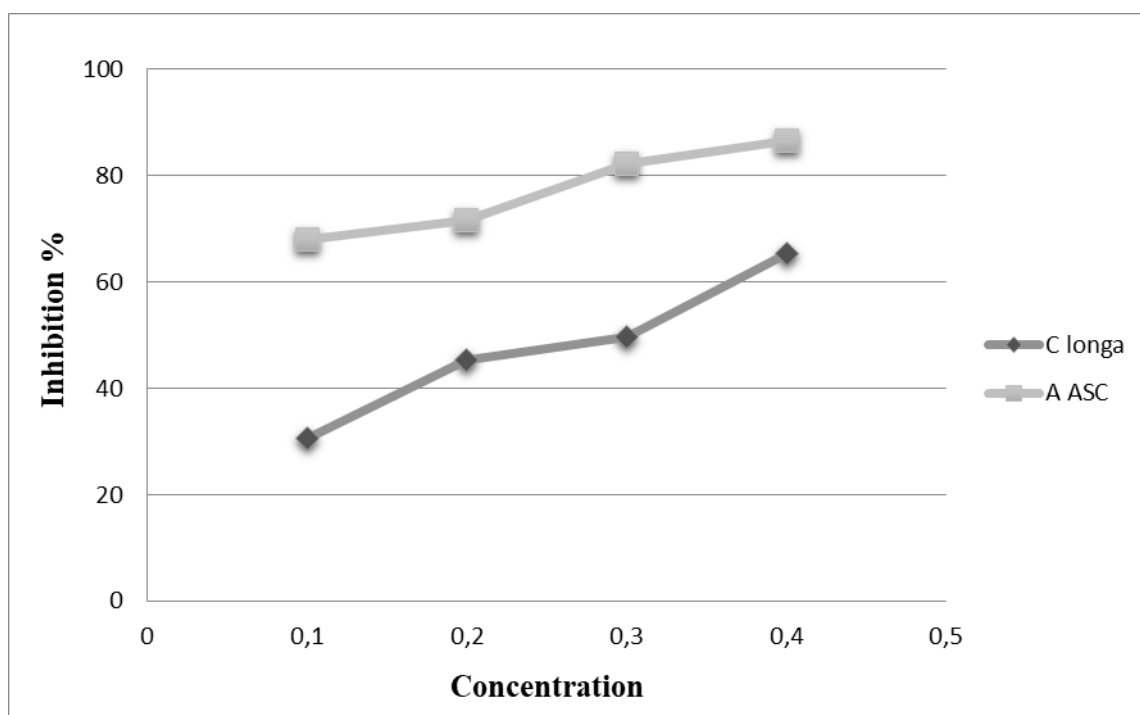


Figure 01: Activité anti oxydante de l'extrait méthanolique de *C longa* et de l'acide ascorbique (30 min).

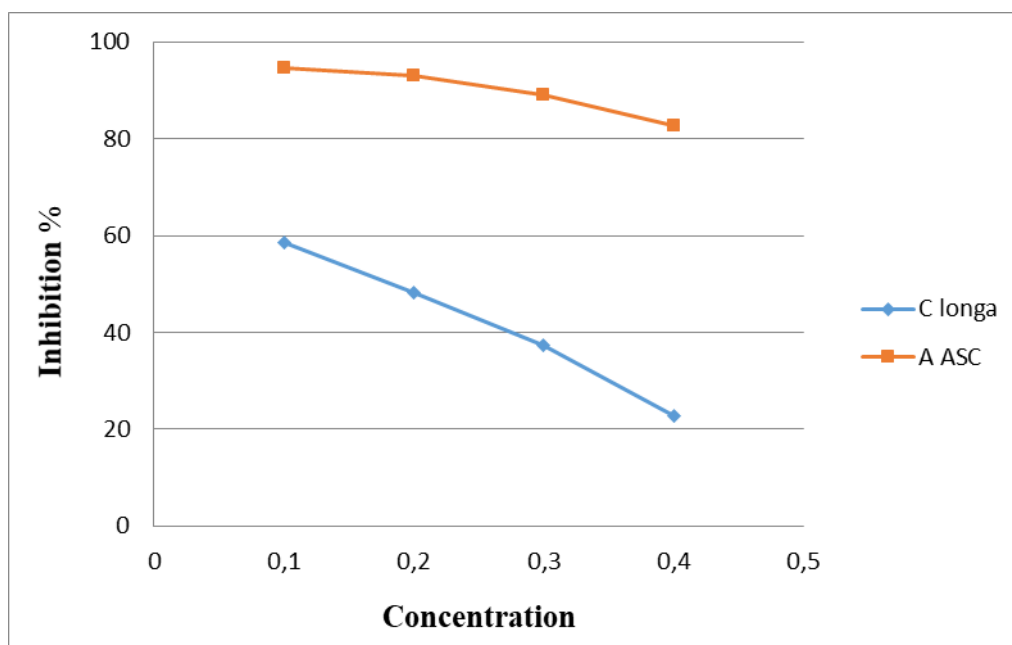


Figure 02: Activité anti oxydante de l'extrait aqueux de *C longa* et de l'acide ascorbique (30 min).

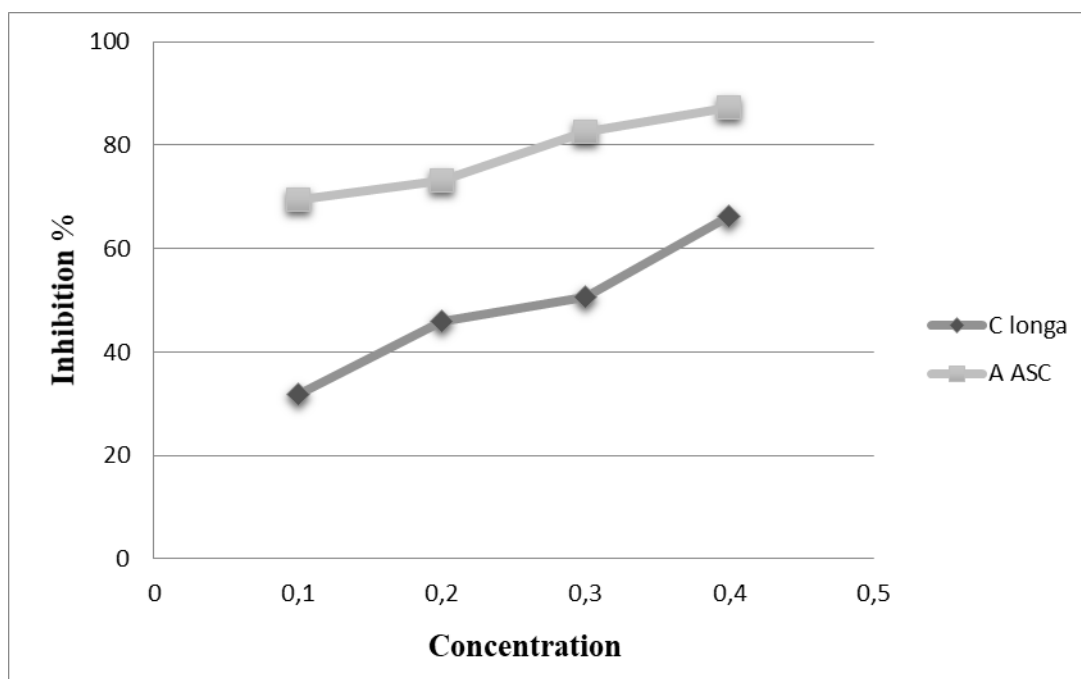


Figure 03: Activité anti oxydante de l'extrait méthanolique de *C longa* et de l'acide ascorbique (45 min).

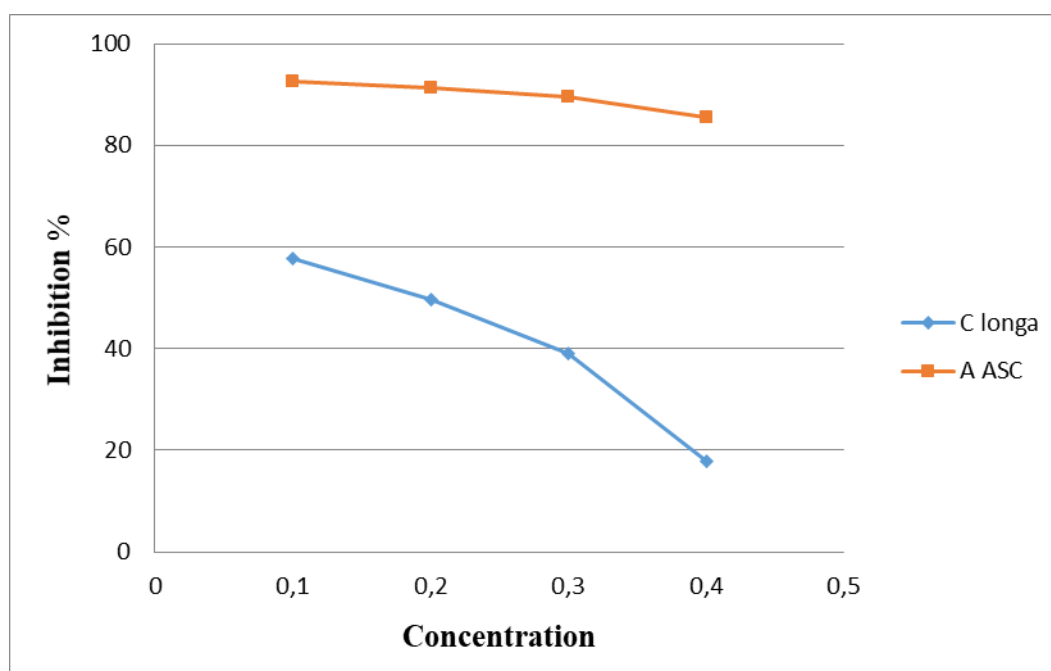


Figure 04: Activité anti oxydante de l'extrait aqueux de *C longa* et de l'acide ascorbique (45 min).

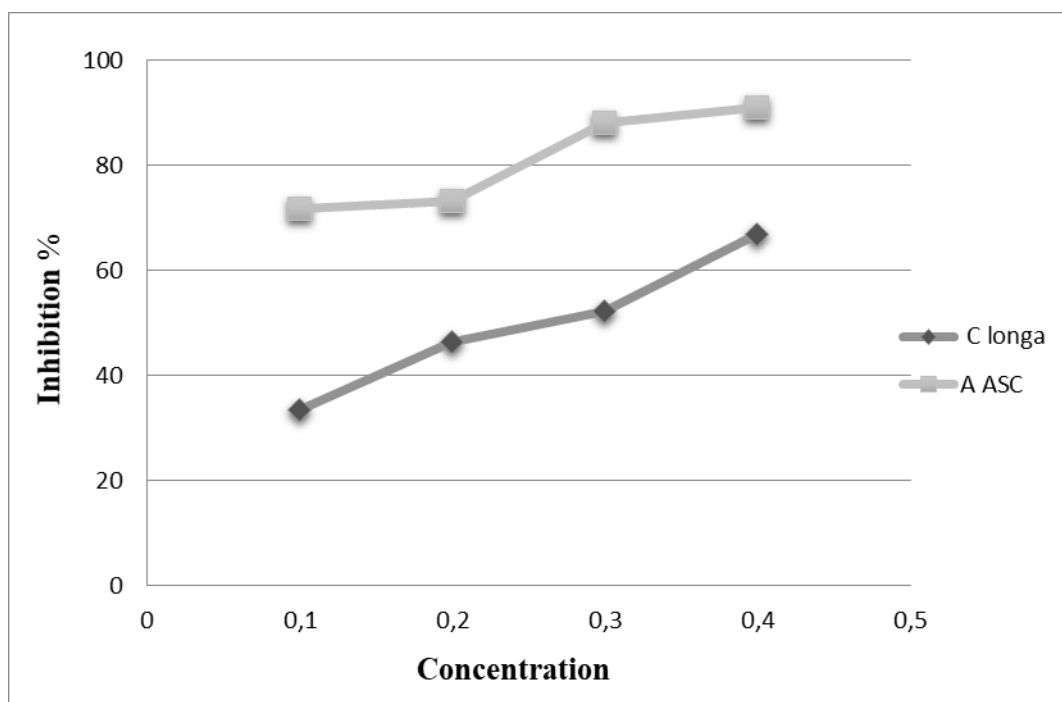


Figure 05: Activité anti oxydante de l'extrait méthanolique de *C longa* et de l'acide ascorbique (60 min).

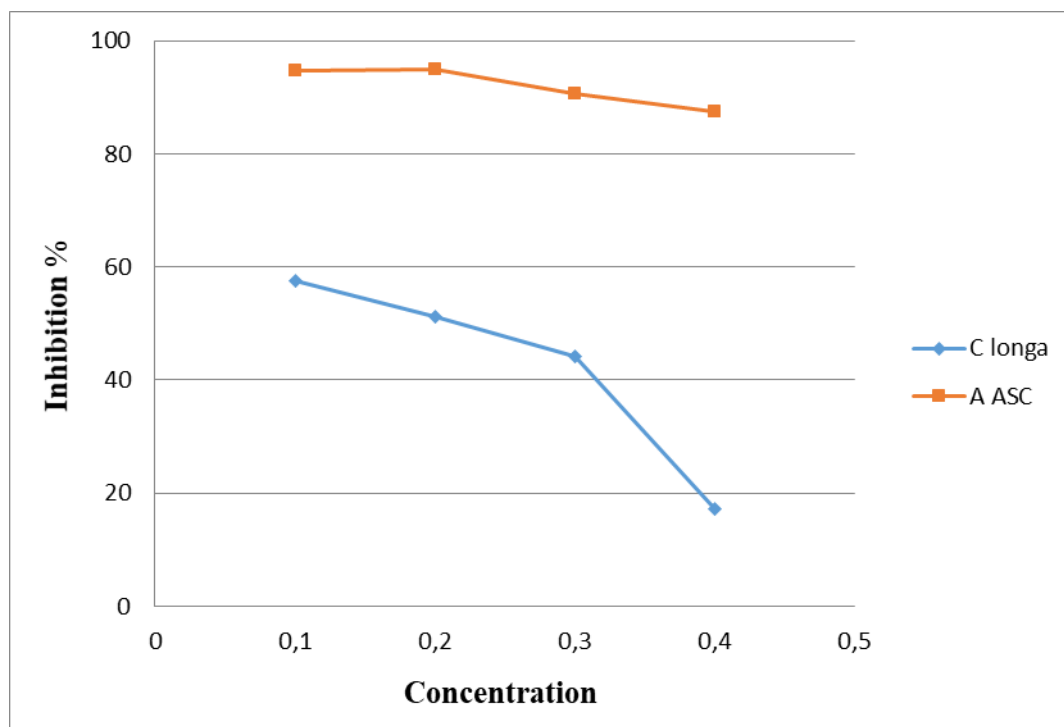


Figure 06: Activité anti oxydante de l'extrait aqueux de *C longa* et de l'acide ascorbique (60 min).

Annexe 04: EC50%

➤ Extrait méthanolique

30min :

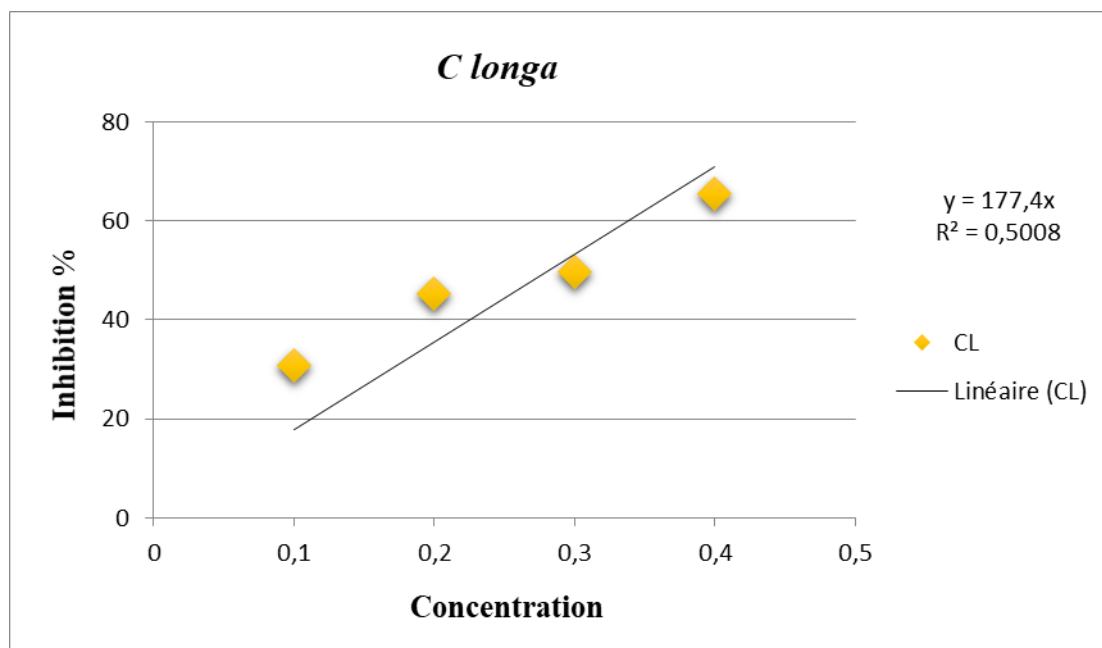


Figure 01 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *C longa*.

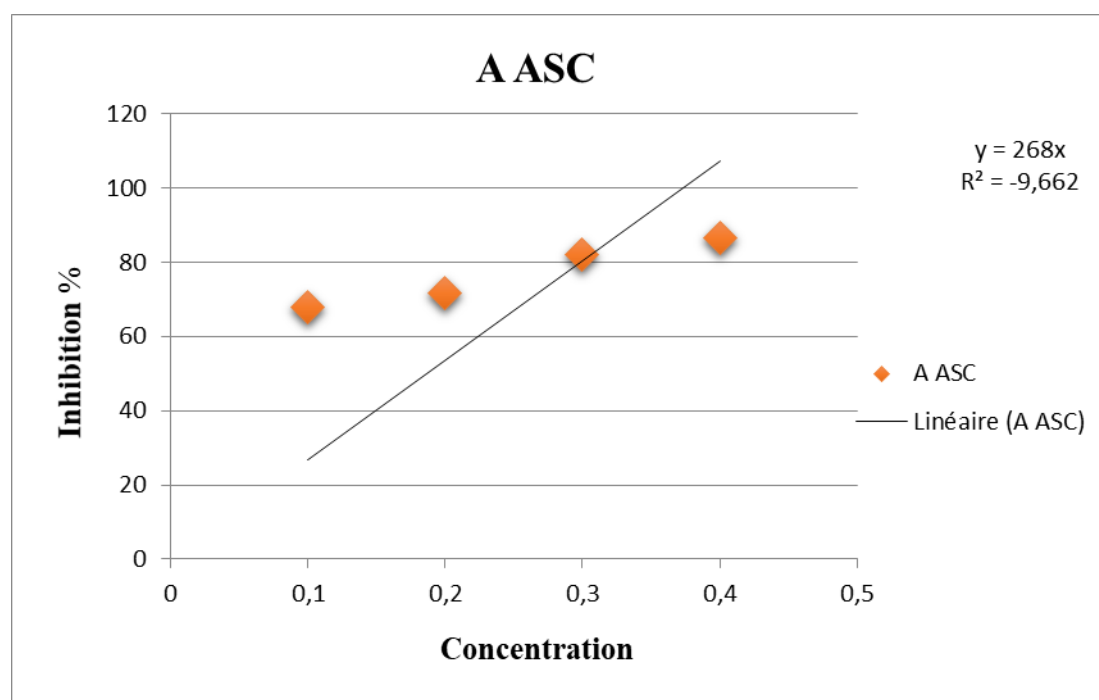


Figure 02 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de l'ASC.

45 min :

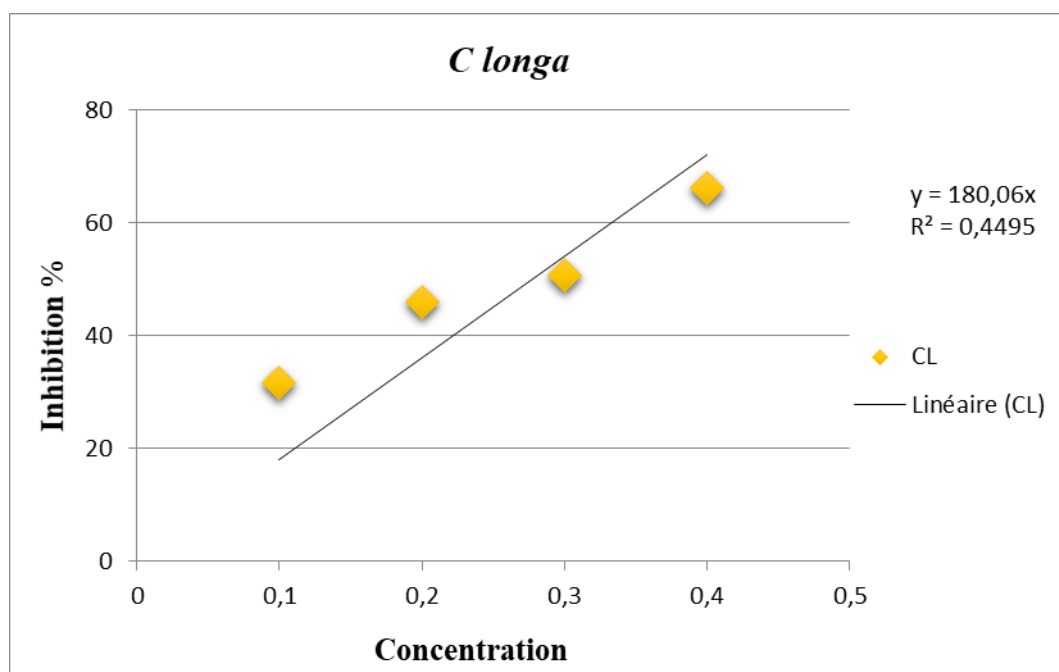


Figure 03 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *C longa*.

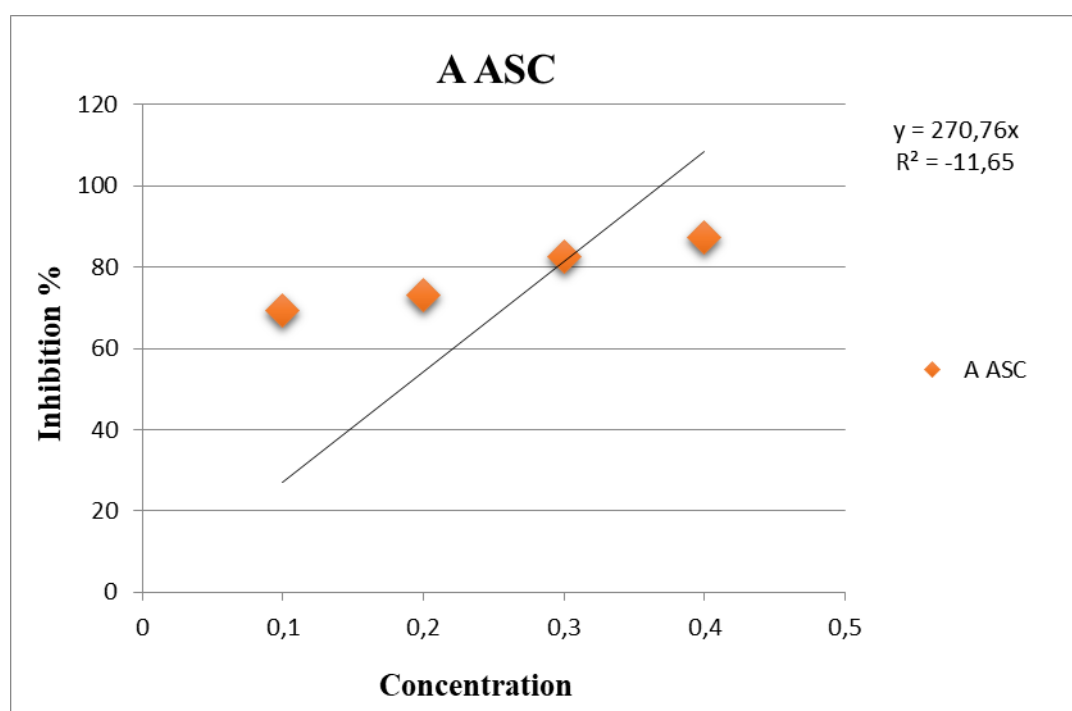


Figure 04 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de l'ASC.

60 min :

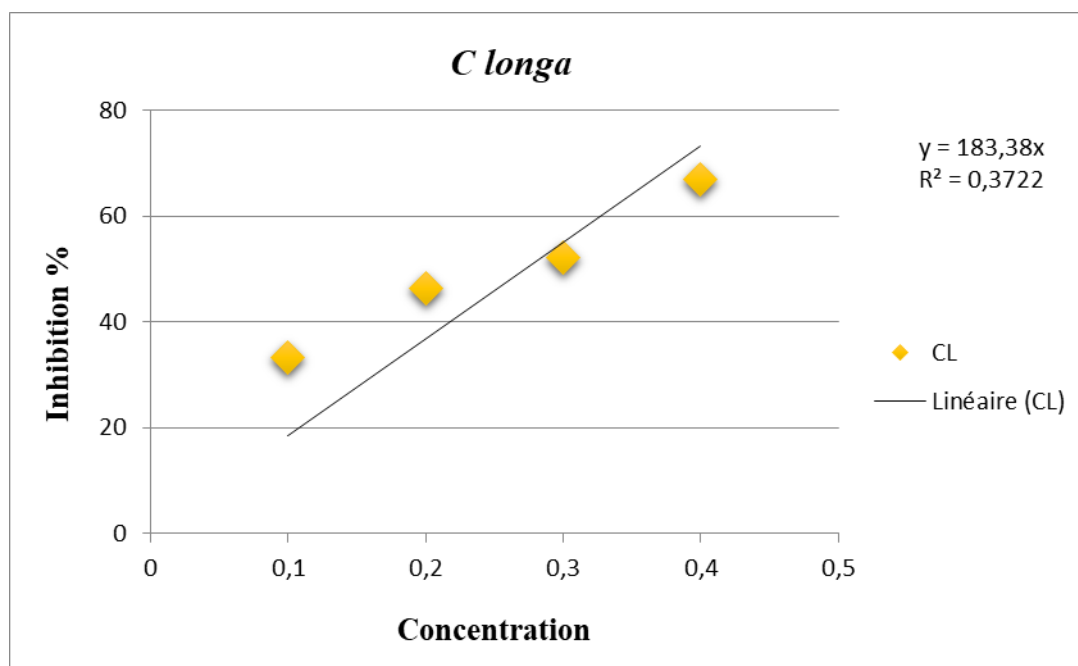


Figure 05 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *C longa*.

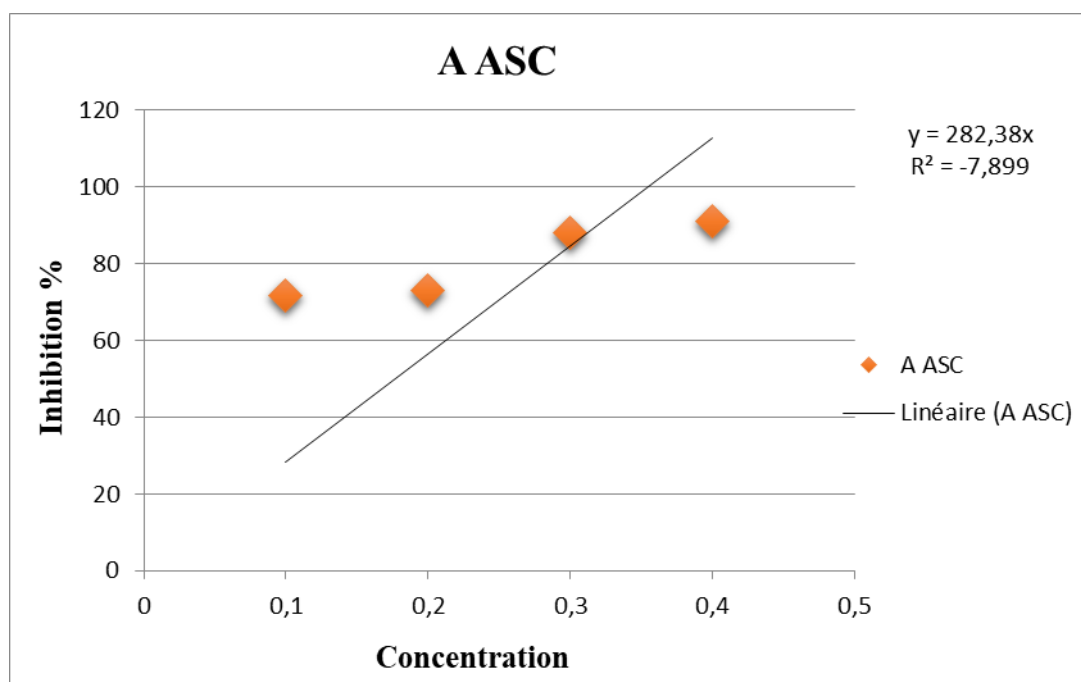


Figure 06 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de l'ASC.

Extrait aqueux :

30 min :

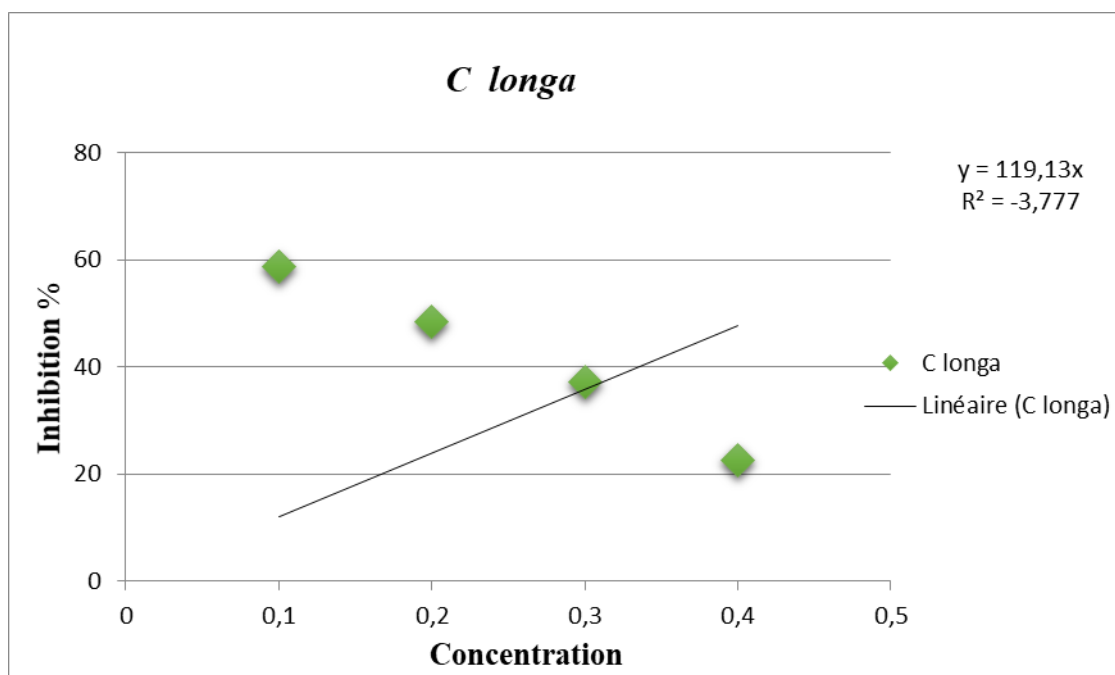


Figure 07 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux de *C longa*.

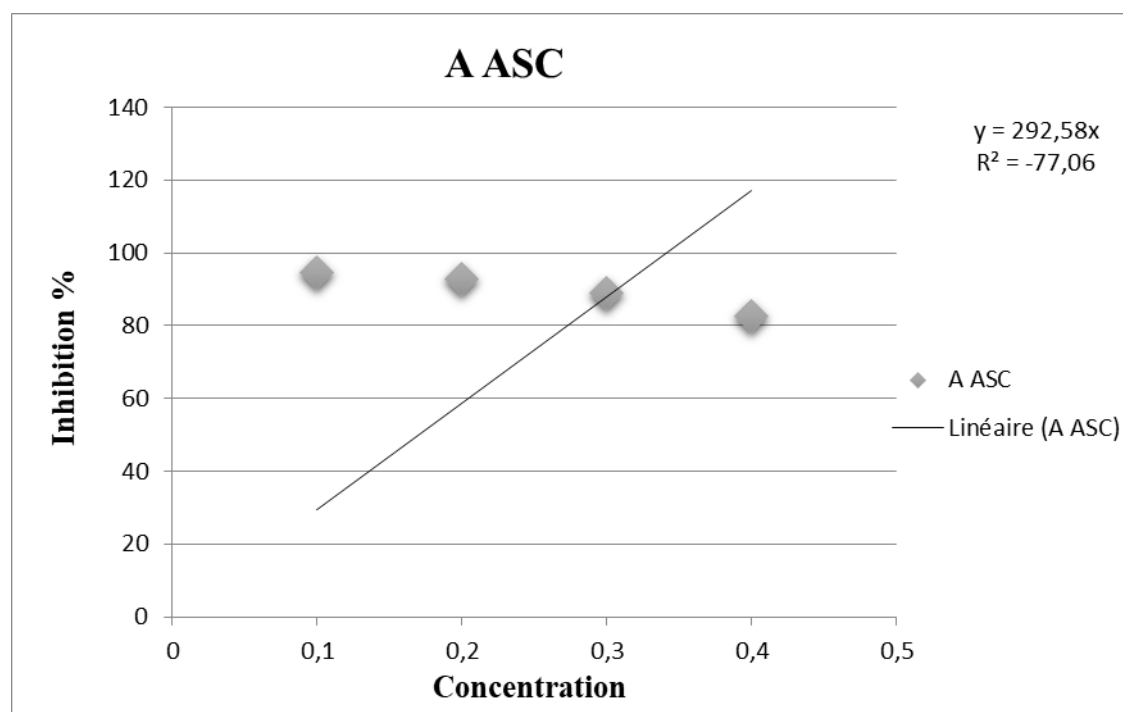


Figure 08 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux de l'ASC.

45 min :

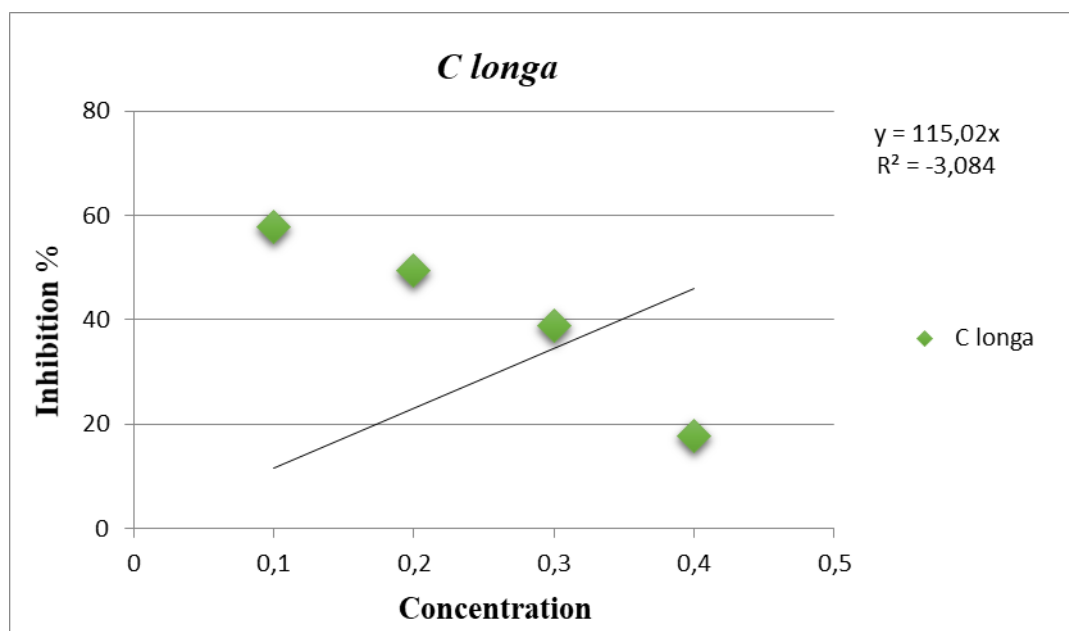


Figure 09 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux de *C longa*.

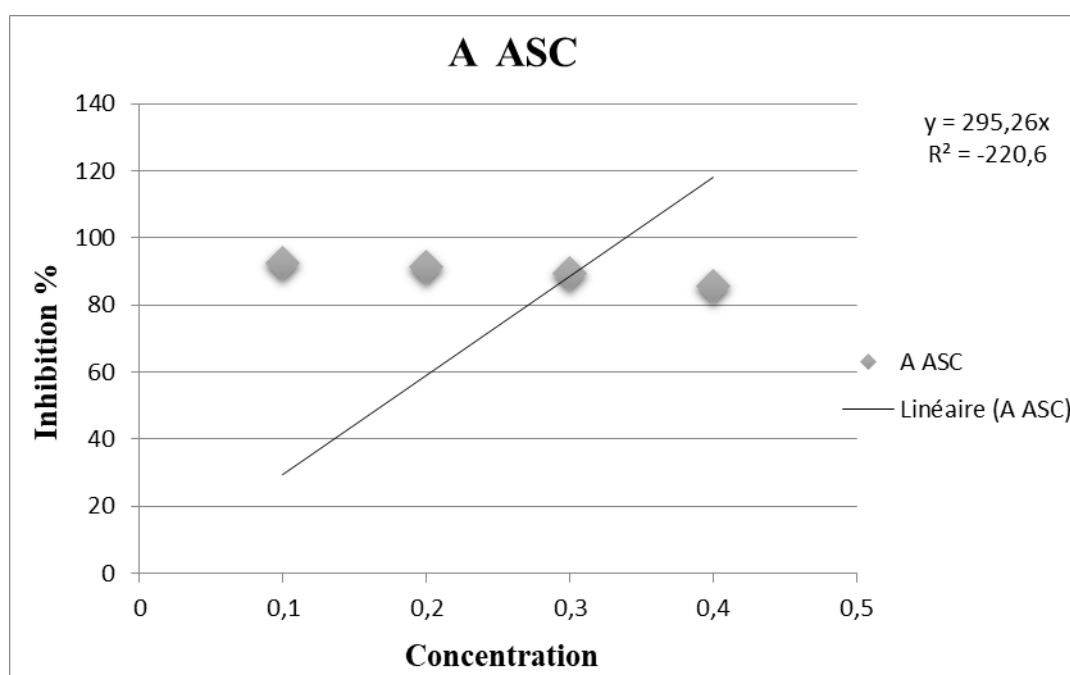


Figure 10 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux de l'ASC.

60 min :

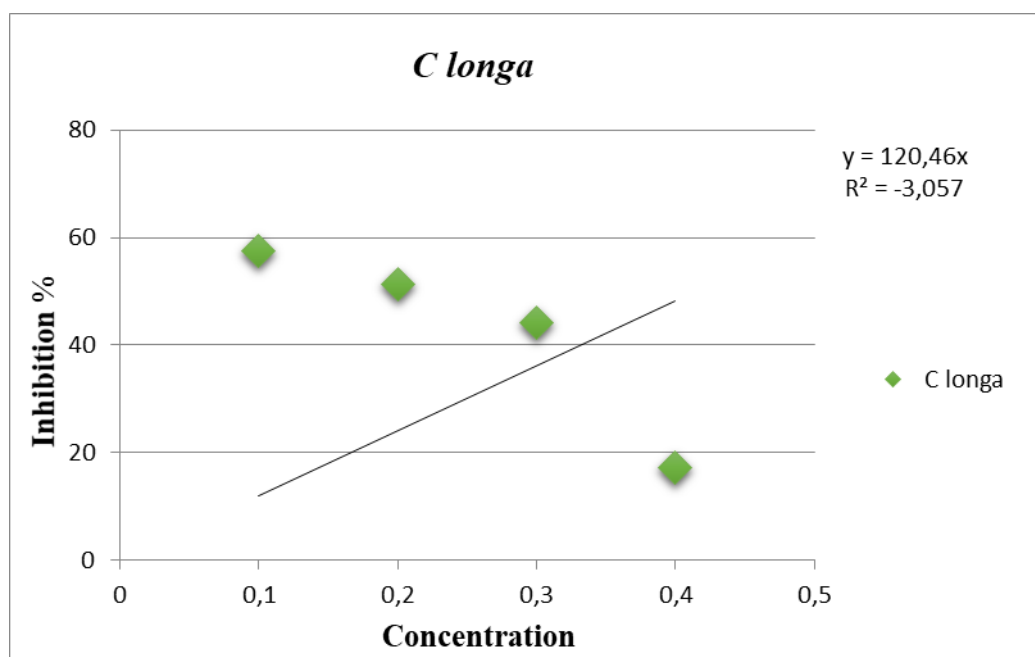


Figure 11 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux de *C longa*.

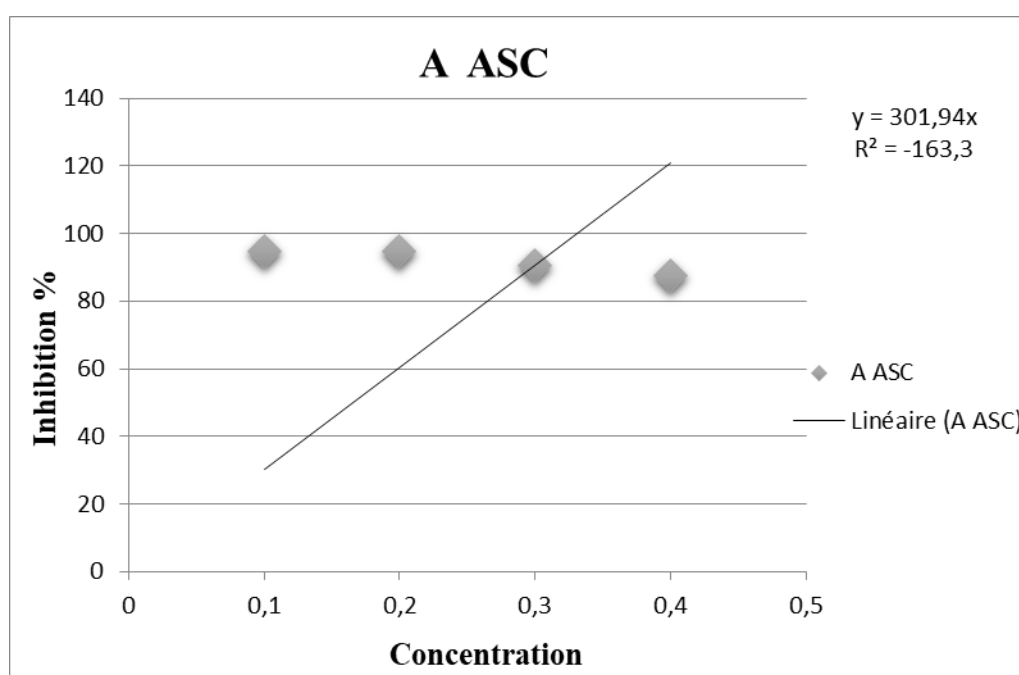


Figure 12 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux de l'ASC.

Annexe 05 : Analyse statistique d'AAO

Tableau 03 : Effet interaction extrait /temps /dilution

Tableau03: Effet interaction extrait/temps/dilution

						AAO			
						Moyenne	Ecart type	Minimum	Maximum
Extrait	EM	Temps	30min	Dilution	0,1ml	30,54	0,75	30,00	31,40
					0,2ml	45,27	1,51	43,72	46,74
					0,3ml	49,77	1,06	48,84	50,93
					0,4ml	65,43	1,36	64,42	66,98
			45min	Dilution	0,1ml	31,71	1,86	29,77	33,49
					0,2ml	45,97	1,76	43,95	47,21
					0,3ml	50,69	0,70	50,00	51,39
					0,4ml	66,12	0,96	65,35	67,20
			60min	Dilution	0,1ml	32,33	1,40	30,93	33,72
					0,2ml	46,36	1,28	44,88	47,21
					0,3ml	52,09	1,07	51,16	53,26
					0,4ml	66,98	0,61	66,28	67,44
	EAQ	Temps	30min	Dilution	0,1ml	58,61	2,93	55,54	61,38
					0,2ml	48,31	1,32	46,92	49,54
					0,3ml	37,13	1,55	35,69	38,77
					0,4ml	22,56	3,78	20,15	26,92
			45min	Dilution	0,1ml	57,90	2,93	55,08	60,92
					0,2ml	49,44	2,58	46,46	51,08
					0,3ml	38,82	0,62	38,15	39,38
					0,4ml	18,31	0,55	17,85	18,92
			60min	Dilution	0,1ml	57,55	1,49	55,85	58,62
					0,2ml	51,23	1,34	49,69	52,15
					0,3ml	43,69	7,32	36,15	50,77
					0,4ml	17,23	1,66	15,38	18,61
	ASC	Temps	30min	Dilution	0,1ml	94,57	1,20	93,53	95,88
					0,2ml	92,94	0,71	92,35	93,73
					0,3ml	88,95	1,82	86,86	90,20
					0,4ml	82,61	0,89	81,76	83,53
			45min	Dilution	0,1ml	92,49	1,12	91,57	93,73
					0,2ml	91,24	0,79	90,39	91,96
					0,3ml	89,54	1,45	88,43	91,18
					0,4ml	85,56	,99	84,51	86,47
			60min	Dilution	0,1ml	94,77	1,01	93,92	95,88
					0,2ml	94,90	0,79	94,12	95,69
					0,3ml	90,59	1,48	89,22	92,16
					0,4ml	87,38	0,60	86,86	88,04

Année universitaire : 2018 - 2019

**Présenté par : DEBBACHE Khawla
GUENNICH Abir**

Thème :

Evaluation de l'activité antioxydante et anticoagulante des polyphénols du *Curcuma longa* L.

**Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie
Végétale**

Résumé

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car ; en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies.

Le but de cette étude est de réaliser une caractérisation biochimique, ainsi que d'évaluer les activités antioxydante et anticoagulante des extraits des parties souterraines du *Curcuma longa* L. utilisé en médecine traditionnelle. Le broyat a été soumis à une extraction et fractionnement pour avoir 3 extraits : méthanolique, éthanolique et aqueux.

Les tests de screening phytochimique réalisés sur l'espèce étudiée donnent une idée générale sur les métabolites secondaire qu'elle contienne.

L'estimation quantitative par la méthode colorimétrique des polyphénols totaux auxquels a attribuée les diverses activités biologiques ; a montré que les extraits (méthanolique et aqueux) sont riches en ces composés, mais en quantités différentes (**0,592 et 0,073 mgEAG/g**) respectivement.

L'évaluation de pouvoir antioxydant qui a été réalisé *in vitro* en utilisant la méthode de piégeage de radicale libre DPPH ; a indiqué que l'extrait méthanolique a montré une bonne efficacité antioxydante par rapport à l'extrait aqueux (**65,42% et 22,62%**) respectivement.

L'évaluation de l'activité anticoagulante a été également réalisée *in vitro* en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ).

Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence de ces polyphénols ; indiquent qu'ils exercent une activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation, mais cette activité est plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène.

Mots clés: *Curcuma longa* L. , screening phytochimique, polyphénols, activité antioxydante, activité anticoagulante.

Laboratoires de recherche : Laboratoire du Centre Universitaire Abd elhafide Boussouf. Mila ; Laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Houari Boumedien à Chelghoum-Laid.

Jury d'évaluation :

Président du jury : HARRICHE Ouahiba
Examineur : TALHI Fahima
Rapporteur : BOUKERIA Sabah

Date de soutenance : 11 /07/2019

