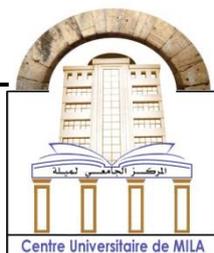


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N° Ref :.....

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 : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème :

**Dosage de Quelques Métabolites Secondaires et
l'Etude Biologique D'une Plante Médicinale**

Présenté par :

- Hafiane Rofida
- Benckekhchoukh Rayane
- Bourezak Esma

Devant le jury :

- Président : Dr. Bousbiaa Sabri
- Examinatrice : Dr. Menakh Mouna
- Promotrice : Dr. Merzouki Soraya

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

C'est avec plaisir que nous réservons cette page en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui nous aidé tout au long de ce travail.

Tout d'abord nous remercions ALLAH le tout puissant de la bonne santé, la puissance et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Madame Merzouki Soraya pour son aide, son conseil, les renseignements, la documentation et le soutien qu'elle n'a pas hésité à nous apporter, pour nous permettre de maintenir la bonne démarche du mémoire.

Nous remercions tous les membres de jury Dr. Bousbiaa Sabri pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire, et Dr. Menakh Mouna pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Les membres de CRBT surtout Hamed Hakoum, Houda Boulehal et Nassreddine Hadjaj.

Docteur Mirouh Habib, le directeur de laboratoire des analyses médicales Ferjiwa.

Tous les membres de la bibliothèque El Talib.

Nous tenons surtout à exprimer nos vifs remerciements à tous nos amis et collègues de la promotion de Biochimie Appliquée

De notre part, nous espérons que notre conduite et notre apprentissage ont laissé une bonne impression du département de la science de la nature et de la vie.

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes chers parents pour les encouragements, la tendresse, l'affection et le soutien durant mes études : vous étiez toujours là pour m'écouter, me sourire, me reconforter et m'encourager dans les moments de doute. Je souhaite que vous trouviez ici le fruit de vos sacrifices. Que ALLAH vous bénisse et vous accorde une longue vie

A mes chères sœurs Imane, Khaoula, Samah et son fils Ayham.

A mon cher frère Fares et mon beau-frère Yazid. Ainsi à toute la famille Bourezak et Hamzaoui.

J'adresse mon profond respect et ma profonde reconnaissance à monsieur Mehdi Elaichar pour son aide, que dieu vous bénisse

A Ouahiba Seraoui pour son soutien et son aide

A toutes mes amies

A tous ceux qui me sont chers

A tous ceux que j'aime.

Esma

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A l'homme, mon précieux offre du Dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon chère père Mourad.

A l'être le plus chère de ma vie, ma mère Saïda qui me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.

A mes frères (Idriss, Zaki, Hayder) et ma chère sœur Wiam que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A ma chère cousine Faten, son marie Karim et son adorable fils Owais. Merci pour être toujours pour moi.

A tous les membres de ma famille qui porte le nom de Hafiane.

Merci pour leurs amours et leur encouragement.

Rofaida

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère Meriem qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A l'homme de ma vie mon père Farid qui m'a enseigné le sens du devoir et de responsabilité

A mon cher frère Oussama et ma sœur mon idole Sarah qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail.

Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours je les souhaite tout le bonheur, santé et succès dans leur vie.

A mon très cher Hamza qui me donne de l'amour et de la vivacité. Je le souhaite une vie pleine de joie et réussite merci pour être toujours pour moi

A ma cousine Imen, ma tante Salima et à la mémoire de ma tante Malika paix a son âme

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès. A tous ce que j'aime

Rayane



Résumé

L'*Ocimum basilicum* L connue sous le nom vernaculaire « Lahbeq » de la famille des Lamiacées, largement utilisée en médecine traditionnelle algérienne. L'objectif de notre travail est le dosage de quelques métabolites secondaires et l'étude biologique d'une plante médicinale.

Nous avons tout d'abord procédé à l'extraction des métabolites secondaires par macération aqueuse et hydrométhanolique et la fraction liquide-liquide par utilisation des solvants à polarité croissante qui sont : Ether de pétrole, Chloroforme, Acétate d'éthyle et n-Butanol.

Le screening a mis en évidence la présence de métabolites secondaires, parmi lesquels, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les glycosides cardiaques, les tanins, les quinones libres, les saponines, les composés réducteurs et les mucilages. Les résultats de l'analyse par CCM ont révélé la présence des flavonoides.

In vitro, le dosage des alcaloïdes a été étudié suivi par les activités biologiques :

L'activité antioxydante a été évaluée par le test du radical libre DPPH, l'activité anticoagulante a été évaluée en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ) et l'activité antifongique a été effectuée par la souche *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, sur les extraits (chloroforme, n-butanol).

Mots clés : *Ocimum basilicum* L, screening phytochimique, métabolites secondaires, activité antioxydante, activité anticoagulante, activité antifongique.

Abstract

The *Ocimum Basilicum*.L known under the vernacular name “Lahbeq” of the family Lamiaceae, widely used in traditional Algerian medicine. The objective of our work is the determination of some secondary metabolites and the biological study of a medicinal plant.

We first proceeded to the extraction of secondary metabolites by aqueous and hydromethanolic maceration and the liquid-liquid fraction by using solvents of increasing polarity which are Petroleum ether, Chloroform, Ethyl acetat and n-Butanol.

The screening revealed the presence of secondary metabolites, among which, flavonoids, alkaloids, cardiac glycosides, tannins, free quinones, saponins, reducing compounds and mucilages. The results of TLC analysis revealed the presence of flavonoids.

In vitro, the alkaloids dosage was studied followed by the biological activities:

The antioxidant activity was evaluated by the DPPH free radical test, the Anticoagulant activity was evaluated using the cephalin-kaolin time (TCK) and prothrombin time (TQ) tests, the Antifungal activity was performed by the strain *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, on the extracts (chloroforme and n-butanol).

Keywords: *Ocimum Basilicum*.L, phytochemical screening, secondary metabolites, antioxidant activity, anticoagulant activity, antifungal activity.

ملخص

يعرف *Ocimum basilicum* L. بالاسم العامي الحبق من عائلة *Lamiaceae*، ويستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي الجزائري . الهدف من عملنا هو تحديد بعض المستقلبات الثانوية و الدراسة البيولوجية لنبات طبي .

لقد شرعنا أولا في استخراج المسقلبات الثانوية عن طريق النقع المائي الهيدروميثانولي و الجزء السائل-السائل باستخدام المذيبات ذات القطبية المتزايدة و هي الاثير البترولي و الكلوروفورم و ايثيل اسيتات و n- بيوتانول .

كشف الفحص عن وجود مستقلبات ثانوية من بينها الفلافونيد و اللقويدات و جليكوسيدات القلب و العفص و الكينون الحر الصابونين و المركبات المختزلة و الصمغ أظهرت نتائج تحليل TLC وجود مركبات الفلافونويد . في المحتر تم دراسة جرعة القلوبات متبوعة بالانشطة البيولوجية .

تم تقييم نشاط مضادات الاكسدة عن طريق اختبار الجذور الحرة DPPH ، و تم تقييم نشاط مضاد التخثر باستخدام اختبارات زمن السيفالين-الكولين (TCK) و وقت البروثرومبين (TQ) ، و تم اجراء النشاط المضاد للفطريات بواسطة سلالة *Fusarium oxysprum* f. sp *lycopersici* على المستخلصات (كلوروفورم و ن- بيوتانول) .

الكلمات المفتاحية :

حبق، الفحص الكيميائي النباتي، المستقلبات الثانوية، نشاط مضاد الاكسدة، نشاط مضاد التخثر، نشاط مضاد الفطريات.

Liste des abréviations

Abs :	Absorbance
AcOEt :	Acétate d'éthyle
AME :	acétate d'éthyl-méthanol-eau
BHA :	butylhydroxyanisole
BHT :	butylhydroxytoluène
BuOH :	N- butanol
C :	la concentration
C₁ :	la première concentration
C₂ :	la deuxième concentration
C₃ :	la troisième concentration.
CCM :	chromatographie sur couche mince
CH₂Cl₂ :	Dichlorométhane
CHCl₃	Chloroforme
CI₅₀ :	concentration inhibitrice à 50%
CMI :	concentration minimale inhibitrice.
CRBT :	centre de recherche en biotechnologie
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DPPH :	2 ,2-diphenyl -1-picryl hydrazyl
E.P:	Extrait de plante.
Endo :	endogène
Exo :	exogène
Ext :	extrait

FeCl₃ :	Chlorure ferrique
F.O. L.:	Fusarium oxysporum f.sp lycopersici.
H₂O :	Forme moléculaire de l'eau
H₂SO₄ :	Acide sulfurique
HCl:	Acide Chlorhydrique
HE :	huile essentielle.
HPLC :	la chromatographie liquide a haute performance
KI :	iodure de potassium
I₂ :	iodure
MeOH:	Méthanol
Na :	sodium
NaOH :	hydroxyde de sodium
NBA :	n-butanol-ammoniaque
NCCLS:	National Committee for clinical laboratory standards
NH₄OH :	Hydroxyde d'ammonium
nm :	nanomètre
O.:	<i>Ocimum</i>
<i>O. basilicum L :</i>	<i>Ocimum basilicum L</i>
PDA :	Potato, Dextrose,Agar
PG :	gallate propylée
PI :	pourcentage d'inhibition.
PPP :	plasma pauvre en plaquette.
R :	rendement
RF :	Rapport frontal

rpm :	rotation par minute
SM :	solution mère
T⁺ :	témoin positif
T⁻ :	témoin négatif.
TBHQ :	tétrabutylhydroquinone
TCK :	temps de céphaline kaolin
TI:	le taux d'inhibition.
Tm :	témoin
TP :	temps de prothrombine.
TQ :	temps de quick
UV :	Ultra-violet
µl :	Microlitre

Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE..... 1

PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE L'OCIMUM BASILICUM.L

1. Historique :	3
2. Présentation :	3
3. Taxonomie de l'espèce:	4
3.1. Nomenclature :	5
3.2. Répartition géographique :	5
3.3. Description botanique :	6
3.4. Variété :	8
3.5. Composition chimique :	9
3.6. Culture :	9
3.7. Ravageurs :	10
4. Utilisation traditionnelle :	10

CHAPITRE II : LES MÉTABOLITES SECONDAIRES

1. Introduction :	11
2. Biosynthèse des métabolites secondaires :	11
2.1. La voie de SHIKIMATE :	12
2.1.1. Formation du CHORISMATE :	12

2.1.2. Condensation du phosphoénolpyruvate et de l'érythrose-4-phosphate en DAHP	12
2.1.3. Conversion du DAHP en 3-déshydroquinone :	13
2.1.4. Conversion du 3-déshydroquinone en 3-déshydroshikimate puis en SHIKIMATE	13
2.1.5. Conversion du SHIKIMATE en 3-phosphoshikimate puis en 5-o-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate	14
2.1.6. Conversion du 5-énolpyruvyl-3-phosphoshikimate en chorismate	14
2.1.7. Conversion du CHORISMATE en acides aminés aromatiques	15
2.1.7.1. Formation du préphénate	15
2.1.7.2. Conversion du préphénate en phénylalanine	15
2.1.7.3. Conversion du préphénate en tyrosine	15
2.1.8. Conversion du CHORISMATE en tryptophane :	16
2.2. LA voie de MEVALONATE	16
3. Classification des métabolites secondaires :	17
3.1. Les composés phénoliques :	18
3.1.1. Acides phénoliques	19
3.1.1.1. Les Acides Benzoïques (Hydroxy benzoïques) :	20
3.1.1.2. Les acides cinnamique (Hydroxy cinnamique) :	20
3.1.1.3. Propriétés physicochimiques :	22
A/ Solubilité :	22
B/ Stabilité :	22
C/ Intérêt Pharmacologique :	22
3.2. Flavonoïdes :	22
3.2.1. Biosynthèses :	23
3.2.2. Classification :	24
3.2.2.1. Flavones :	25

3.2.2.2. Flavonols :.....	25
3.2.2.3. Flavanones et dihydroflavonols :.....	26
3.2.2.4. Flavan-3-ols,Flavan3,4-diols et anthocyanidols :.....	26
3.2.2.5. Chalcones et aures :	27
3.2.3. Distribution et localisation des flavonoïdes :	27
3.2.4. Activités biologiques des flavonoides	28
3.3. Les coumarines :.....	30
3.3.1. Répartition botanique et localisation :.....	31
3.3.2. Classification :.....	32
3.3.3. Intérêt pharmacologique de coumarines :.....	34
3.4. Les quinones :.....	35
3.4.1. Classification :.....	35
3.4.1.1. Le Benzoquinone ou quinone (C ₆ H ₄ O ₂) :.....	35
3.4.1.2. Le Naphtoquinone (C ₁₀ H ₆ O) :	36
3.4.1.3. L'antraquinone (C ₁₄ H ₈ O).....	36
3.5. Tanins :.....	37
3.5.1. Classification :.....	37
3.5.1.1. Les tanins condensés (pro-anthocyanidines) :	37
3.5.1.2. Tanins Hydrolysable :.....	38
3.5.2. Propriétés Biologique :.....	39
3.6. Les Anthocyanes :	40
3.7. Les alcaloïdes :.....	41
3.7.1. Distribution Alcaloïdes :.....	42
3.7.2. Classification :.....	43
3.7.3. Intérêt des alcaloïdes :	48
3.8. Les Terpénoïdes :	49

CHAPITRE III : DOSAGE DES ALCALOÏDES

1. Introduction :.....	51
2. Fonction des alcaloïdes :.....	52
3. Le dosage :	52
3.1. Technique de dosage des alcaloïdes :.....	53
3.1.1. Dosage volumétrique :.....	53
3.1.2. Dosage colorimétrique.....	54
3.1.3. Dosage spectrophotométrique :	55
3.1.4. Dosage pondéral :	56

CHAPITRE IV : ACTIVITES BIOLOGIQUES

1. Activité Antioxydante :.....	57
1.1. Définition d'un radical libre :.....	57
1.2. Les antioxydants :.....	57
1.2.1. Définition d'un antioxydant :	58
1.2.2. Classification des antioxydants :	58
1.2.2.1. Les antioxydants synthétiques :	58
1.2.2.2. Les antioxydants naturels :.....	59
a) Les vitamines:	60
b) Les éléments minéraux:	60
2. Étude de l'activité antifongique :.....	60
2.1. Définition de l'antifongique :	61
2.1.1. Comment agissent les antifongiques ?	62
2.1.2. Généralité sur le champignon étudié :.....	62
2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique :.....	62
2.2.1. Technique de macrométhode en milieu liquide :.....	62
2.2.2. Technique de macrodilution en milieu liquide :.....	63

3. L'activité anticoagulante :	64
3.1. Voie endogène :	64
3.2. Voie exogène :	65

PARTIE 2 : Étude expérimentale

CHAPITRE I : ÉTUDE QUANTITATIVE

1. Matériels et méthodes	67
1.1. Matériel végétal :	67
1.2. La macération	68
1.2.1. Préparation de l'extrait hydrométhanolique :	68
1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux :	70
1.3. Fraction liquide-liquide :	70
1.3.1. Mode Opérateur :	70
2. Résultats et discussion	72
2.1. Les extraits méthanolique et aqueux :	73
2.2. Discussion :	74

CHAPITRE II : ÉTUDE QUALITATIVE

1. Matériels et Méthodes :	76
1.1. Screening phytochimique	76
1.1.1. Détection des Quinones libres :	76
1.1.2. Détection des composés réducteurs :	76
1.1.3. Détection des glycosides cardiaques :	76
1.1.4. Détection des Tanins :	76
1.1.5. Détection des alcaloïdes :	77
1.1.6. Détection des Flavonoïdes :	77
1.1.7. Détection des Mucilages :	77
1.1.8. Détection des saponines :	77

1.1.9. Détection des Huiles essentielles :	78
1.2. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM) :	78
1.2.1. Principe :	78
1.2.2. Mode opératoire :	79
1.2.2.1. La préparation des éluants	79
2. Résultats et discussion	80
2.1. Screening phytochimique	80
2.2. Chromatographie	83
2.2.1. Résultats :	84
2.2.2. Discussion :	86

CHAPITRE III : DOSAGE DES ALCALOÏDES

1. Introduction :	87
2. Mode opératoire	87
3. Résultat et discussion :	90

CHAPITRE IV : LES ACTIVITES BIOLOGIQUES

1. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits :	91
1.1. Méthodes et matériels	91
1.1.1. Préparation de la solution de DPPH :	91
1.1.2. Préparation des solutions mères de concentration 5mg/ml :	92
1.1.3. Préparation des dilutions de l'extrait :	92
1.2. Mesures spectrophotométriques :	93
1.3. Résultats et discussion :	93
2. Activité antifongique de l'Ocimum basilicum	97
2.1. Matériel et méthode	97
2.1.1. Préparation des disques :	97
2.1.2. Préparation de milieu culture :	97

2.1.3. Préparation des concentrations	98
2.2. Résultats et discussions	99
3. Activité anticoagulante des extraits de l'Ocimum Basilic L.	101
3.1. Méthodes et matériels.....	102
3.1.1. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....	102
3.2. Résultats et discussion.....	105
CONCLUSION GENERALE.....	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	109

Liste des figures

Figure 01 : Ocimum Basilicum.L	4
Figure 02 : Classification hiérarchique	4
Figure 03 : Répartition géographique de la famille des Lamiacées dans le monde entier. ..	6
Figure 04 : Présentation d' <i>Ocimum basilicum</i> L.....	6
Figure 05 : Présentation morphologique des feuilles de basilic	7
Figure 06 : Les graines d'Ocimum Basilicum	7
Figure 07 : Les fleurs de l'Ocimum Basilicum	8
Figure 08 : la condensation du phosphopyruvate et l'érythrose-4-phosphate en DAHP ...	13
Figure 09 : Conversion du DAHP en 3-déshydroquinone.....	13
Figure 10 : Conversion du 3-déshydroquinone en 3-déshydroshikimate puis en SHIKIMATE	13
Figure 11 : Conversion du SHIKIMATE en 3-phosphoshikimate puis en 5-O-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate	14
Figure 12 : La formation de CHORISMATE.....	14
Figure 13 : Formation du préphénate	15
Figure 14 : Formation de phénylalanine.....	15
Figure 15 : formation de tyrosine	16
Figure 16 : Etape de la biosynthèse de tryptophane.....	16
Figure 17 : voie MEVALONATE.....	17
Figure 18 : Formule chimique brute d'une fonction phénol C ₆ H ₅ OH.....	19
Figure 19 : Voies simplifiées de biosynthèse AS benzoïque Acide 2-hydroxylase BA ₂ H, ICS isochorismate synthase, IPL isochorismate pyruvate lyase, PAL phénylalanine ammoniac lyase, SA Acide salicylique	20
Figure 20 : structure plane de l'acide cinnamique	21
Figure 21 : la voie de la biosynthèse de l'acide cinnamique.....	21
Figure 22 : Squelette de base des flavonoïdes	23

Figure 23 : Biosynthèse des flavonoïdes	23
Figure 24 : Structure des différentes classes des flavonoïdes	24
Figure 25 : Squelette de base des flavone	25
Figure 26 : Squelette de base des Flavonols.....	25
Figure 27 : A / Squelette de base des flavanones. B / Squelette de base des dihydroflavonols.....	26
Figure 28 : Squelette de base des : A / flavan-3 –ols, B/ flavan-3,4-diols et C/anthocyanidol.....	27
Figure 29 : squelette de base des : A/ chalcones et B/aurone.....	27
Figure 30 : Structure de base des coumarines	30
Figure 31 : réaction de cyclisation de l'acide cis cinnamique oxygéné en C2.....	30
Figure 32 : schéma générale de la biogenèse de coumarine.....	31
Figure 33 : structure de : A/ Psoralène, B/ Bergaptène et C/ Angélicine.....	33
Figure 34 : structure de : A/ Xanthylétine et B/ Séseline	34
Figure 35 : Structure d'une molécule de quinone.....	35
Figure 36 : Structure de Benzoquinone	36
Figure 37 : Structure de base la Naphtoquinone	36
Figure 38 : structure chimique des anthraquinones	36
Figure 39 : Structure des tanins condensés et leur monomère	38
Figure 40 : Structure de : A/ D-Glucose et B/ Acide Gallique.....	38
Figure 41 : structure penta-o-galloyl-D-glucose,	39
Figure 42 : structure typique d'anthocyane	41
Figure 43 : Structure chimique d'un Terpénoïdes, l'Iridoïde.	49
Figure 44 : La structure de : A/ Solanine et B/ Nicotine	52
Figure 45 : Technique de dosage volumétrique	54
Figure 46 : Technique de dosage colorimétrique.	54
Figure 47 : Dosage par spectrophotométrie.....	55

Figure 48 : Quelques antioxydants synthétiques.....	59
Figure 49 : La cascade de la coagulation dans la voie endogène et la voie exogène	66
Figure 50 : La plante <i>Ocimum Basilicum.L</i>	67
Figure 51 : Localisation géographique de la zone de récolte	67
Figure 52 : A / Plante fraîche, B / Poudre fine de la plante (<i>Ocimum Basilicum.L</i>)	68
Figure 53 : Etapes d'extraction de la plante <i>O. Basilicum.L</i> par macération.....	69
Figure 54 : Protocole d'extraction liquide-liquide de l' <i>Ocimum basilicum L</i>	71
Figure 55 : L'extraction liquide-liquide de l'extrait brut.	72
Figure 56 : Les quatres phases dissout dans le méthanol	72
Figure 57 : Histogramme des rendements d'extrait brut.....	73
Figure 58 : Diagramme circulaire des rendements des fractions.	75
Figure 59 : Schémas d'une plaque CCM.....	79
Figure 60 : résultat des tests : A / quinones libres, B /composés réducteurs, C / glucosides cardiaques, D / tanins, E / alcaloïdes, F /flavonoïdes, G /mucilages, H / saponines.	81
Figure 61 : résultats des plaques CCM prise après la révélation à lumière UV (A / 254nm et B / 365nm) des quatres extraits de gauche à droite : éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol.....	83
Figure 62 : L'appareil de soxhlet.....	88
Figure 63 : Extraction des alcaloïdes totaux de l' <i>Ocimum Basilicum L</i>	89
Figure 64 : Réduction du radical libre DPPH.....	91
Figure 65 : préparation du DPPH (photo originale).	92
Figure 66 : Courbe d'étalonnage de la phase d'Ether de pétrole	94
Figure 67 : Courbe d'étalonnage de la phase de Chloroforme	94
Figure 68 : Courbe d'étalonnage de la phase d'Acétate.....	95
Figure 69 : courbe d'étalonnage de la phase du n-Butanol	96
Figure 70 : La préparation des disques.....	97

Figure 71 : la zone d'inhibition de l'extrait n-Butanol de chaque concentration testée par la souche <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> ([C ¹], [C ²], [C ³]).	99
Figure 72 : la zone d'inhibition de l'extrait chloroformique de chaque concentration testée par la souche <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> ([C ¹], [C ²], [C ³]).	99
Figure 73 : prélèvement de sang.....	102
Figure 74 : résultats du sang après centrifugation et la récupération du plasma.	102
Figure 75 : la formation du caillot.....	105
Figure 76 : Histogramme du temps de formation des caillots de l'extrait hydrométhanolique	106
Figure 77 : Histogramme du temps de formation des caillots de l'extrait aqueux.....	106

Liste des tableaux

Tableau 01 : Hiérarchie taxonomique d'O. Basilicum	5
Tableau 02 : principales classes de composés phénoliques	18
Tableau 03 : Cas des coumarines substituées par des groupements hydroxyle et méthoxyle	32
Tableau 04 : Cas des coumarines substituées par un hétéroside (glucosyl).....	32
Tableau 05 : Cas des coumarines substituées par des chaînes isopréniques en C5, C10 (monoterpènes) ou plus rarement C15 (sesquiterpènes).	33
Tableau 06 : Les alcaloïdes vrais	43
Tableau 07 : Les proto-alcaloïdes.	47
Tableau 08 : Les pseudo-alcaloïdes.	47
Tableau 09 : Le rendement de l'extrait brut.....	73
Tableau 10 : Les rendements, couleur et aspect des différentes fractions.	74
Tableau 11 : Résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans l'extrait aqueux et l'extrait hydrométhanolique de <i>L'Ocimum basilicum L.</i>	82
Tableau 12 : les différents spot et valeurs de Rf des plaques CCM effectuée.	84
Tableau 12 : la masse et rendement obtenus.	90
Tableau 14 : les différentes concentrations de produit.....	93
Tableau 15 : L'absorbance des concentrations de la phase Ether de pétrole	93
Tableau 16 : L'absorbance des concentrations de la phase Chloroforme	94
Tableau 17 : L'absorbance des concentrations de la phase Acétate	95
Tableau 18 : L'absorbance des concentrations de la phase n-Butanol.....	95
Tableau 19 : les CI ₅₀ des différents extraits	96
Tableau 20 : les concentrations des extraits (chloroforme et n-butanol)	98
Tableau 21 : la moyenne de T ⁺ et T ⁻	100

Tableau 22 : Les moyennes d'inhibitions des extraits n-butanol et le chloroforme	100
Tableau 23 : Taux d'inhibition des extraits n-butanol et chloroforme.....	101
Tableau 24 : Le temps de formation des caillots de l'extrait hydrométhanolique (voie endogène).....	105
Tableau 25 : Le temps de formation des caillots de l'extrait aqueux (vois endogène) ...	105
Tableau 26 : Le temps de formation des caillots de l'extrait hydrométhanolique (voie exogène).....	105
Tableau 27 : Le temps de formation des caillots de l'extrait aqueux (voie exogène).....	106



INTRODUCTION GENERALE

Les plantes sont des ressources naturelles végétales, consommées pour leurs propriétés médicinales et nutritives. Actuellement, les recherches scientifiques s'intéressent à ce type de plantes. Celles-ci ont pu marquer leur rôle important dans le développement social, et ce par l'augmentation de la rentabilité économique et la réduction de la pauvreté grâce à leur utilisation à la fois vaste et diversifiée (**Farnsworth *et al.*, 1986**).

Les majeurs végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires (**Jeun *et al.*, 2005**). Parmi ces composés on retrouve : les alcaloïdes, les substances phénoliques, les coumarines, les tannins, les flavonoïdes et les terpènes. Les polyphénols en particulier, sont largement utilisés en thérapeutique comme antioxydants, antifongiques, anti coagulantes, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, et antibactérienne (**Marc *et al.*, 2001**). Pour cette raison, environ 80% de la population utilisent les plantes médicinales pour traiter la majorité des maladies (**Agisho *et al.*, 2014**), et au moins 25% des médicaments modernes contiennent un ou plusieurs principes actifs d'origine végétale (**Benarba *et al.*, 2015**).

Le genre *Ocimum* appartenant aux Lamiaceae comprend des herbes et des arbustes annuels et pérennes originaires des régions tropicales et subtropicales d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Sud (**Darrah, 1988**). La taxonomie de l'*Ocimum* est complexe en raison de l'hybridation interspécifique et de la polyploïdie des espèces du genre. (**Pushpangadan et Bradu., 1995**) ont reconnu plus de 150 espèces. Cependant, (**Paton *et al.*, 1999**) ont proposé qu'*Ocimum* ne compte que 65 espèces et que les autres attributions soient considérées comme des synonymes. Parmi les espèces du genre, *Ocimum basilicum* L. (le basilic) est la principale culture d'huile essentielle dans le monde et cultivée commercialement dans de nombreux pays. Le basilic est utilisé comme herbe médicinale dans les traitements médicaux tels que les maux de tête, la toux, la diarrhée, les vers et les dysfonctionnements rénaux.

La famille de Lamiacée représente une source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant, il contient plusieurs genres, parmi elles l'*Ocimum*. L'*Ocimum basilicum* L classé parmi les plantes les plus utilisées en Algérie (**Reguig, 2011**), il est utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies (crampes d'estomac, de diarrhées, d'angines, etc...) mais également dans l'industrie des arômes alimentaires (**Ngom *et al.*, 2014**).

L'objectif de notre travail est le dosage de quelques métaboliques secondaires et l'étude biologique d'une plante médicinale l'Ocimum Basilicum.L.

Ce travail est subdivisé en deux parties :

Partie 01 : la synthèse bibliographique contient quatre chapitres :

- * Le premier chapitre représente des généralités sur la plante Ocimum Basilicum. L.
- * Le deuxième chapitre consiste à un profil sur les métabolites secondaires.
- * Le troisième chapitre concerne le dosage des alcaloïdes.
- * Le quatrième chapitre représente les activités biologiques.

Partie 02 : L'étude expérimentale, renferme aussi quatre chapitres :

- * Le premier chapitre présente l'extraction par macération et la fraction liquide-liquide.
- * Le deuxième chapitre présente les tests phytochimiques et l'analyse par CCM.
- * Le troisième chapitre présente le dosage des alcaloïdes.
- * Le quatrième chapitre présente les activités biologiques : activité antioxydante, activité antifongique et activité anticoagulante.

Enfin on terminera ce travail par une conclusion générale et perspective.



PARTIE 1 :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I :
PRESENTATION GENERALE DE
L'OCIMUM BASILICUM.L

1. Historique :

L'histoire de l'utilisation du basilic comme médicament remonte à l'époque de Dioscoride, qui le mentionne dans l'un des plus anciens livres sur les plantes médicinales, **De Materia Medica**, comme un puissant antidote pour les piqûres de scorpion. Plusieurs croyances sont attribuées à l'utilisation historique du basilic, les Européens le considéraient comme funèbre et en rêvaient comme malchanceux rêver de lui porte malheur, alors qu'en Italie les femmes le portent dans les cheveux et les jeunes en collent un ressort au-dessus de l'oreille quand ils vont faire la cour. En Inde, les hindous ne croyaient qu'une feuille de basilic enterrée avec eux leur servait de passeport pour le paradis.

Au début de 1600, les Anglais l'utilisaient dans leur nourriture et dans les portes pour éloigner les parasites indésirables, comme les mouches, ainsi que les mauvais esprits. (**Ali A et al., 2012**).

2. Présentation :

Le nom de basilic est dérivé du mot grec, basileus, qui signifie « royal » en raison du parfum royal de cette herbe (**Qing et al., 2016**). Le basilic (également connu sous le nom de basilic doux) est une herbe aromatique, épicée annuelle (**Ali-Dalille, 2010**).

L'Ocimum basilicum est connu sous différents noms dans différentes langues à travers le monde. En anglais, il est connu comme Basil, Common Basil ou Sweet Basil tandis qu'en hindi et en bengali il est appelé Babui Tulsi. La plante est connue sous le nom de Badrooj, Hebak en arabe, Nasabo ou Sabje en gujrati et Jangli Tulsi en ourdou. Tohrakurasani et Okimon sont les noms attribués à la plante en persan et en unani langues (**Ali A et al., 2012**).



Figure 01 : *Ocimum Basilicum.L* (Photo originale)

3. Taxonomie de l'espèce:

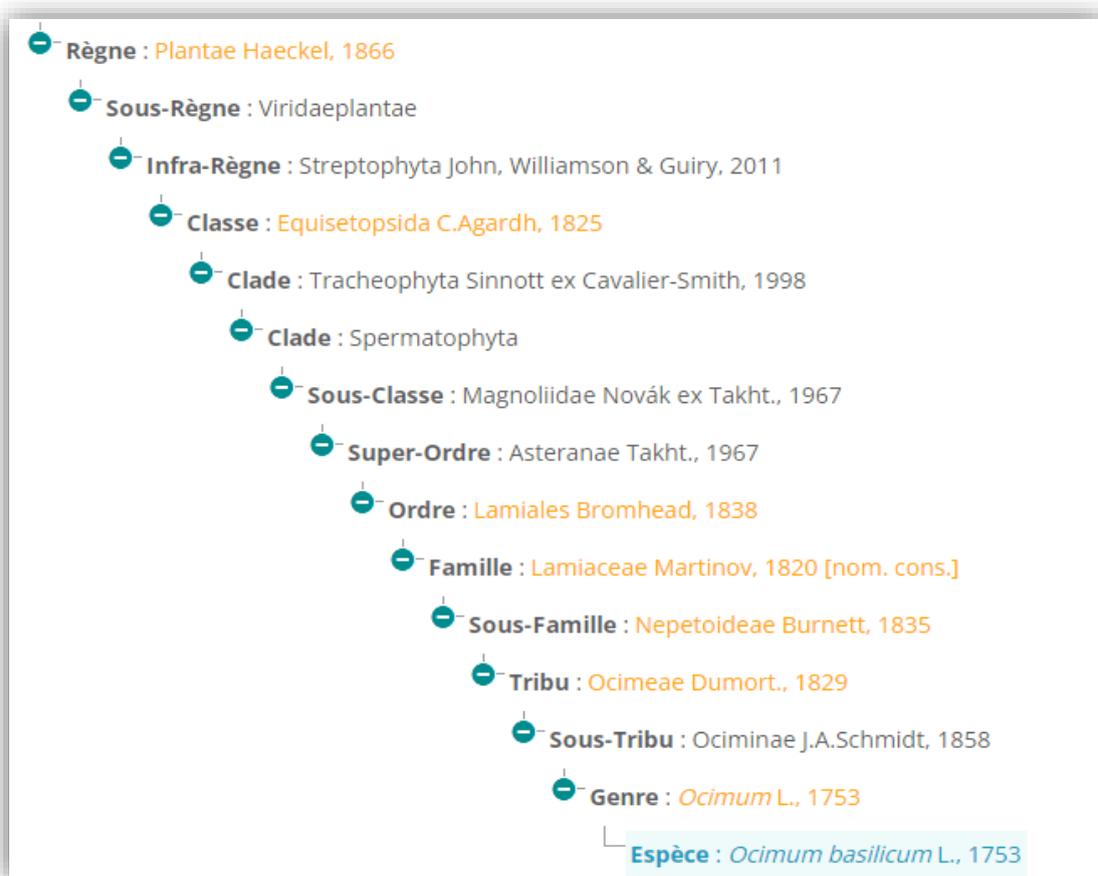


Figure 02 : Classification hiérarchique (Inventaire National du Patrimoine Naturel)

Le tableau suivant représente la classification taxonomique de cette plante.

**Tableau 01 : Hiérarchie taxonomique d'O. Basilicum
(Balakrishnan Purushothaman. *et al.* 2018)**

Règne	Plante
Phylum	Magnoliophyte
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Ocimum
Espèce	Basilicum

3.1. Nomenclature :

Le basilic possède plusieurs noms et synonymes sont attribués dans la littérature :

- **Noms scientifique:** *Ocimum basilicum*L.
- **Synonymes:** *Ocimum basilicum* var. *glabratum* Benth, *majus* Benth.
- **Noms vernaculaires:** Lahbeq, habeq, hamahim, hebeq elailaa (Aït-Youcef,2006).
- **Autres noms :** Basilic, basiliccommun, basilic officinal, basilic des jardins, boranger des savetiers herbe royale, basilic romain, grand basilic (Delille, 2007), herbe aux sauces, pistou ou pesto son équivalent italien (Chalchat *et al.*, 2008).

3.2. Répartition géographique :

Le basilic est une plante originaire d'Inde et d'Asie tropicale et pousse maintenant à l'état sauvage dans les régions tropicales et subtropicales ; et trouvé en Afrique et Amérique du Sud (Khan *et al.*, 2015). Il est cultivé commercialement dans de nombreux pays chauds (en climat méditerranéen) et tempérés du monde entier, y compris la France, la Hongrie, la Grèce et d'autres pays d'Europe du Sud, l'Égypte, le Maroc et l'Indonésie. Il est

également cultivé dans plusieurs états américains, notamment en Arizona, au Nouveau-Mexique et en Caroline du Nord, ainsi qu'en Californie (**Pushpangadan et George, 2012**).

L'extraction de son huile essentielle s'effectue dans la plupart des régions tempérées chaudes du monde comme par exemple en Inde, en Bulgarie, au Pakistan (**Hiltunen et Holm, 1999**). Et les pays du Maghreb, en particulier en Algérie, au Maroc, en Tunisie et en Egypte.

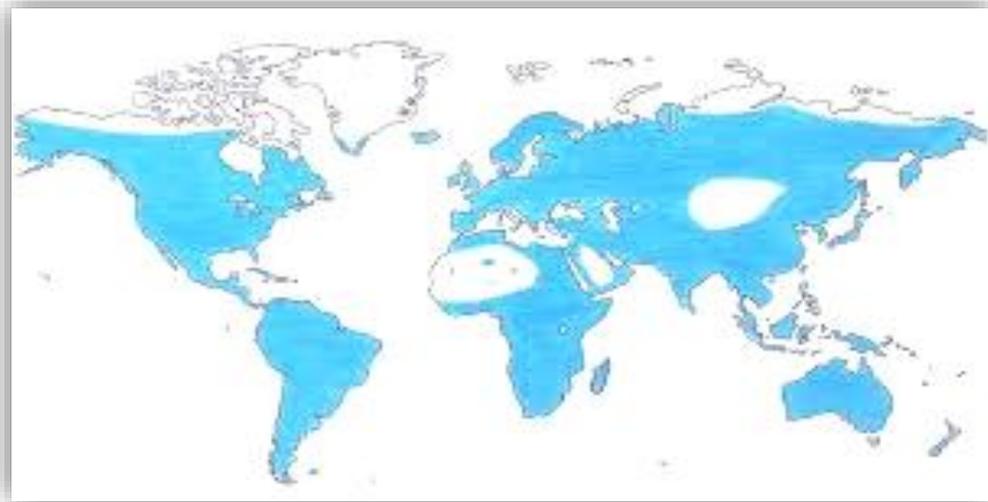


Figure 03 : Répartition géographique de la famille des Lamiacées dans le monde entier.

(**Frezza et al, 2019**)

3.3. Description botanique :

- **La tige** : est quadrangulaire, pouvant atteindre jusqu'à 50 à 60 cm d'hauteur.



Figure 04 : Présentation d'*Ocimum basilicum L* (**Pousset, 2004**).

Les feuilles : sont nombreuses, opposées pétiolées de forme ovale, Elles sont longues de 2 à 5 cm, entières ou dentées et ciliées sur les bords, de couleur verte pale a vert foncé (Aït-Youcef, 2006).



Figure 05 : Présentation morphologique des feuilles de basilic
(<https://www.istockphoto.com/>)

- **Le système racinaire** : est du type pivotant (Arabici et Bayram, 2004).
- **Les graines** : petites (fines), oblongues et marron foncé, la durée de germinative de cette graine est de huit ans (Riaz, 1999).



Figure 06 : Les graines d'*Ocimum Basilicum*
(<http://amoseeds.COM2022.>)

- **L'inflorescence** : est en long épis de fleurs groupées en glomérules.
- **Les fleurs** : sont petites et regroupées en épis à l'extrémité de ses rameaux en verticilles très le long de l'axe. Elles sont de couleur crème, blanche, rose ou violacée selon la variété.

Chaque verticille, comprend 4 à 6 fleurs portées par de court pédoncules et 1 ou 2 bractées. L'ensemble a l'allure d'un épi qui peut atteindre 10 à 15 cm de long. Ses fleurs, assez petites, sont très irrégulières. Elles comprennent :

- Le calice composé de cinq (05) pétales soudés (d'où le terme gamopétale) : un grand sépale supérieur et 4 petites dents pointues en-dessous.
- La corolle est constituée d'un tube qui se divise vers le haut en deux lèvres distinctes, d'où le nom de Labiée donné à la famille : une inférieure entière est formée d'un seul concave, et une supérieure organisée autour de quatre (04) dents régulières.
- L'androcée est à quatre étamines à long filet attachées à la partie inférieure de la corolle.
- Le gynécée ressemble à quatre petits mamelons au milieu de la fleur, ce sont les 4 loges de l'ovaire, entre ces loges part un long style qui porte un tige mate fourchu (**Arabici et Bayram,2004**).



Figure 07 : Les fleurs de l'*Ocimum Basilicum*

(<http://yzadora.eklablog.com/ocimum-basilicum-a125587072>)

3.4. Variété :

Les différentes variétés de basilic se distinguent par leur couleur, leur forme, leur taille et leur parfum. Selon (**Mackee HS, 1994**), les plus cultivées sont :

Ocimum basilicum var. *album*.

Ocimum basilicum var. *anisatum*.

Ocimum basilicum var. *densiflorum*.

Ocimum basilicum var. *difforme*.

Ocimum basilicum var. *glabratum*.

Ocimum basilicum var. *majus*.

Ocimum basilicum var. *minimum*.

Ocimum basilicum var. *pilosum*.

Ocimum basilicum var. *purpurascens*.

3.5. Composition chimique :

Les graines de basilic contiennent des polysaccharides, du mucilage et de l'huile fixe qui se compose de l'acide linoléique (50%), acide linoléique (22%), acide oléique (15%), ainsi que 8% d'acides gras insaturés (**Malik et al., 1989**). Les feuilles de basilic contiennent également environ 5% de tanins, l'acide oléanolique (0,17%) et d'une petite quantité d'acide ursolique, protéines (14%), de glucides (61%), ainsi et des concentrations relativement élevées de vitamine (A, B1, B2, C et E) et l'acide rosmarinique.

L'O. Basilicum L contient les huiles essentielles à des compositions différentes selon le chémo type, l'origine et la période de récolte. Ainsi on pourrait retrouver dans les huiles essentielles cinéole, linalool, eugénol, méthylchavicol et estragol (**Ouibrahim, 2015**) et des métabolites secondaires (**Boggia, 2015**) tels que les flavonoïdes (0,6 à 1,1%) comme le quercétine et kaempférol, qui considéré comme un antioxydant (**Kwee et Niemeyer, 2011**).

3.6. Culture :

Le basilic étant une plante cultivée dans les pays tempérés. Sa culture exige un climat chaud et ensoleillé, un sol irrigable, riche en matières organiques, son multi application se fait par semis au printemps, vers Mars-Avril. En climat tempéré, il faut le faire en serre ou dans des pots maintenus à une température de l'ordre de 20°C. La germination se produit au

bout de 4 à 7 jours. Le repiquage en pleine terre peut se faire lorsque le sol est suffisamment réchauffé. Le basilic a besoin d'un pH de 5 à 8 et d'une température plus de 15°C et une exposition abritée et cinq heures d'ensoleillement quotidien (Schauenberge, 2006 ; Bezanger *et al.*, 1990).

3.7. Ravageurs :

Les cultures de basilic sont est sensible à divers agents pathogènes (Garibaldi *et al.*, 1997). Parmi les maladies les plus importantes sont la fusariose causée par *Fusarium oxysporum* ; la moisissure grise causée par *Botrytis cinerea* ; la moisissure blanche causée par *Sclerotinia sclerotiorum* (Elad *et al.*, 2015); et ces dernières années *Peronospora belbahrii*, l'agent causal du mildiou.

Lors de la préparation de la pépinière, la fonte des semis peut également se produire et endommager le plant ; elle est causée par *Pythium insidiosum*.

Un autre ravageur qui affecte les cultures de basilic est l'aile de dentelle causée par *Cochlochi labullita*. Les feuilles se recourbent d'abord, puis la plante entière se dessèche.

Le basilic est sensible à l'oïdium (*Oidium* spp.), À la brûlure des semis (*Rhizoctonia solani*) et à la pourriture des racines (*Rhizoctonia bataticola*) (Shasany *et Kole*, 2018).

4. Utilisation traditionnelle :

En Turquie, *Ocimum basilicum* est utilisé en médecine populaire et en médecine traditionnelle ouïgoure pour prévenir et traiter les diabètes et les troubles cardiovasculaires. En médecine indienne Siddha, il est utilisé pour traiter les boutons sur le visage. Traditionnellement, le basilic est utilisé pour traiter les maux de tête, la toux, la diarrhée et les dysfonctionnements rénaux. Il est également utilisé en externe pour traiter les piqûres d'insectes, les morsures de serpent et les infections cutanées. En Bulgarie, elle est utilisée comme médecine populaire pour le traitement des courbatures. En Espagne, elle est utilisée comme sédatif. (Balakrishnan Purushothaman *et al.*, 2018).



CHAPITRE II :
LES METABOLITES
SECONDAIRES

1. 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 : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre qui sont les métabolites secondaires (**Kansole, 2009**).

Chez les plantes, il existe un métabolisme secondaire, c'est une exclusivité du monde végétal. Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très dispersés et très différents selon les espèces (**Cuendet, 1999**).

Les métabolites secondaires ne sont pas vitaux pour l'organisme (c'est à dire non directement impliqué dans les processus vitaux de bases mais jouent nécessairement un rôle important de par la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production. Ils ont des rôles écologiques (allomone, phéromone...). Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (**Thomas, 2009**), et aussi dans la protection des plantes contre ravageurs et pathogènes. 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, 2008**).

2. Biosynthèse des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires résultent généralement de trois voies de biosynthèse : la voie de SHIKIMATE la voie de MEVALONATE DU PYRUVATE (**Verpoorte et Alferman, 2000**).

2.1. La voie de SHIKIMATE :

La voie de SHIKIMATE ou voie de L'ACIDE SHIKIMIQUE, est une voie métabolique aboutissant à la biosynthèse de certains acides aminés aromatiques (comme tyrosine et phénylalanine). Elle est présente chez des bactéries, des mycètes, des algues, des protistes et des plantes, mais est absente chez les animaux. Pour cette raison, les acides aminés produits par ces réactions sont dits *essentiels* chez les animaux, c'est-à-dire que ces derniers doivent se les procurer à partir de leur alimentation car ils ne peuvent les produire eux-mêmes par leur métabolisme.

Il s'agit d'une série de réactions convertissant le phosphoénolpyruvate et l'érythrose-4-phosphate en chorismate, précurseur commun d'acides aminés aromatiques tels que le phénylalanine, le tryptophane et le tyrosine. Si les grandes lignes de cette voie métabolique sont communes aux organismes qui l'utilisent, chacun d'entre eux le met en œuvre d'une manière qui lui est propre, de sorte qu'il en existe de nombreuses variantes (Metzler, 2003).

2.1.1. Formation du CHORISMATE :

On retient généralement sept enzymes structurantes pour la voie du SHIKIMATE chez *Escherichia coli*:

- EC 2.5.1.54 : DAHP synthase ;
- EC 4.2.3.4 : 3-déshydroquinone synthase ;
- EC 4.2.1.10 : 3-déshydroquinone déshydratase ;
- EC 1.1.1.25 shikimate désydrégénase ;
- EC 2.7.1.71 : shikimate kinase ;
- EC 2.5.1.19 : EPSP synthase ;
- EC 4.2.3.5 : chorismate synthase.

2.1.2. Condensation du phosphoénolpyruvate et de l'érythrose-4-phosphate en DAHP

La voie du SHIKIMATE commence par la condensation du phosphoénolpyruvate avec l'érythrose-4-phosphate sous l'action d'une 3-désoxy-7-phosphoheptulonate synthase (DAHP synthase) pour former du 3-désoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate avec élimination d'une molécule de phosphate.

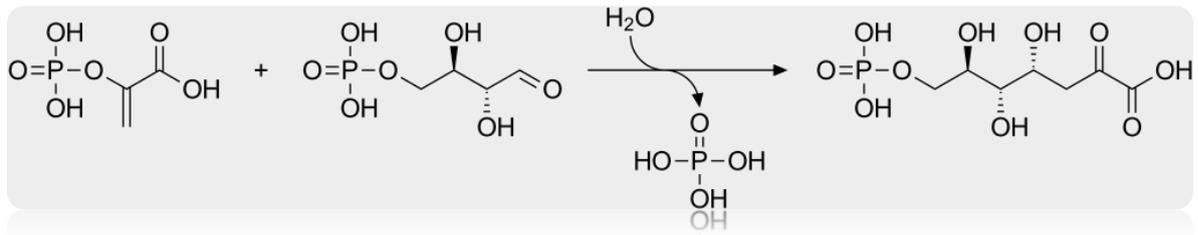


Figure 08 : la condensation du phosphopyruvate et l'érythrose-4-phosphate en DAHP

2.1.3. Conversion du DAHP en 3-déshydroquinone :

Le DAHP est déphosphorylé par la 3-déshydroquinone synthase pour former du 3-déshydroquinone.

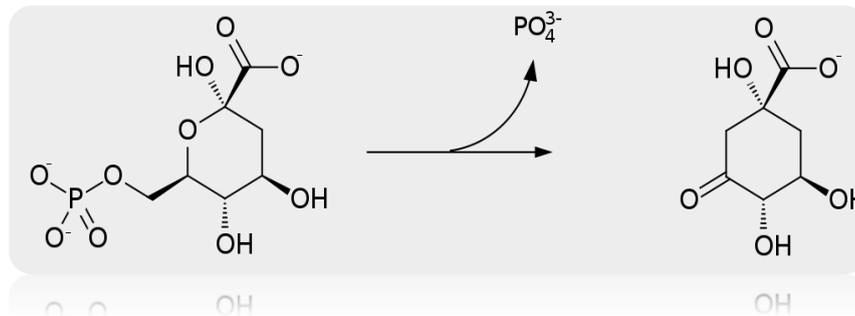


Figure 09 : Conversion du DAHP en 3-déshydroquinone

2.1.4. Conversion du 3-déshydroquinone en 3-déshydroshikimate puis en SHIKIMATE

Le 3-déshydroquinone est déshydraté par la 3-déshydroquinone déshydratase pour donner du 3-déshydroshikimate, qui est ensuite réduit en SHIKIMATE par du NADPH sous l'action d'une SHIKIMATE déshydrogénase.

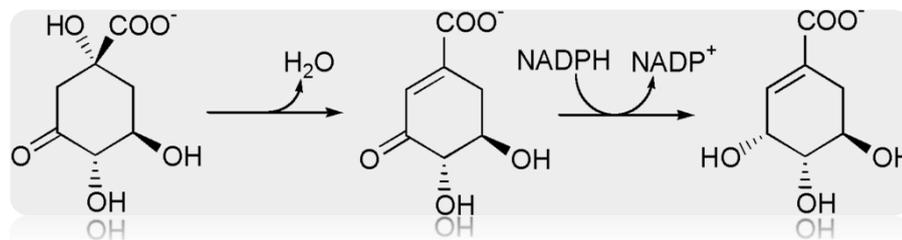


Figure 10 : Conversion du 3-déshydroquinone en 3-déshydroshikimate puis en SHIKIMATE

2.1.5. Conversion du SHIKIMATE en 3-phosphoshikimate puis en 5-o-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate

Le SHIKIMATE est phosphorylé par la SHIKIMATE KINASE pour donner du 3-phosphoshikimate, qui est alors condensé avec le phosphoénolpyruvate sous l'action de l'EPSP synthase pour donner du 5-o-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate, ou 5-énolpyruvyl-3-phosphoshikimate.

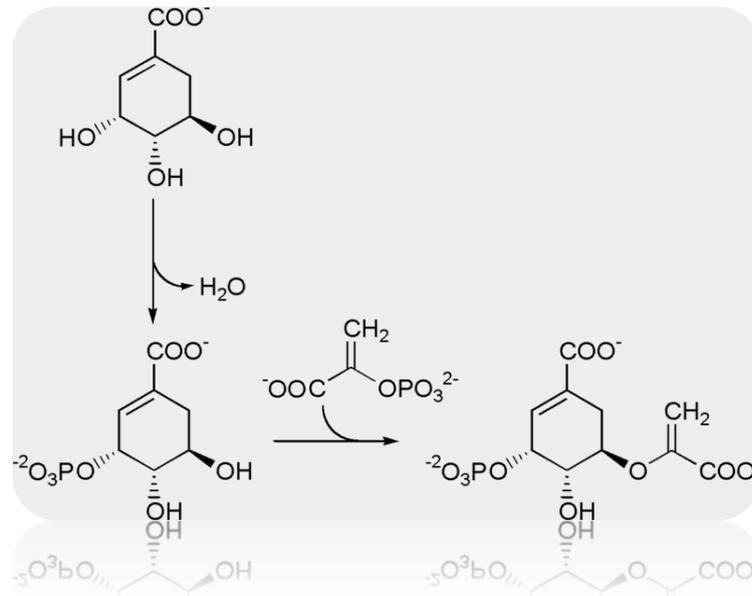


Figure 11 : Conversion du SHIKIMATE en 3-phosphoshikimate puis en 5-O-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate

2.1.6. Conversion du 5-énolpyruvyl-3-phosphoshikimate en chorismate

Le 5-énolpyruvyl-3-phosphoshikimate est déphosphorylé par la CHORISMATE SYNTHASE pour donner du CHORISMATE.

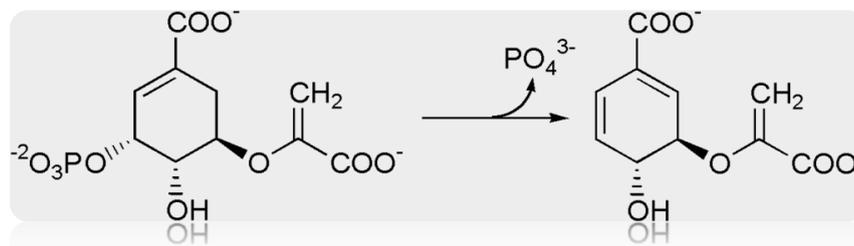


Figure 12 : La formation de CHORISMATE

2.1.7. Conversion du CHORISMATE en acides aminés aromatiques

2.1.7.1. Formation du préphénate

Un réarrangement de Claisen du CHORISMATE sous l'action de la CHORISMATE MUTASE conduit à l'acide préphénique (**Helmut Goerisch, 1978**).

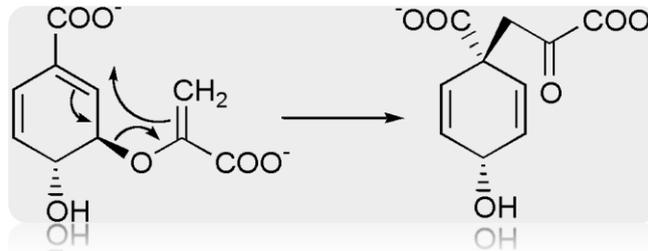


Figure 13 : Formation du préphénate

2.1.7.2. Conversion du préphénate en phénylalanine

Le préphénate peut subir une décarboxylation oxydative éliminant également le groupe hydroxyle pour donner du phénylpyruvate, qui peut donner de la phénylalanine par transamination à partir de glutamate, converti pour sa part en α -cétoglutarate.

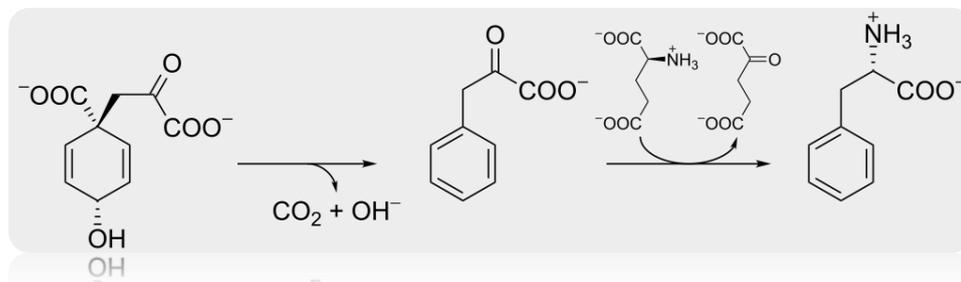


Figure 14 : Formation de phénylalanine

2.1.7.3. Conversion du préphénate en tyrosine

Le préphénate peut également subir une décarboxylation oxydative conservant le groupe hydroxyle, ce qui donne 4-hydroxyphénylpyruvate, lequel peut ensuite donner de la tyrosine par transamination à partir de glutamate.

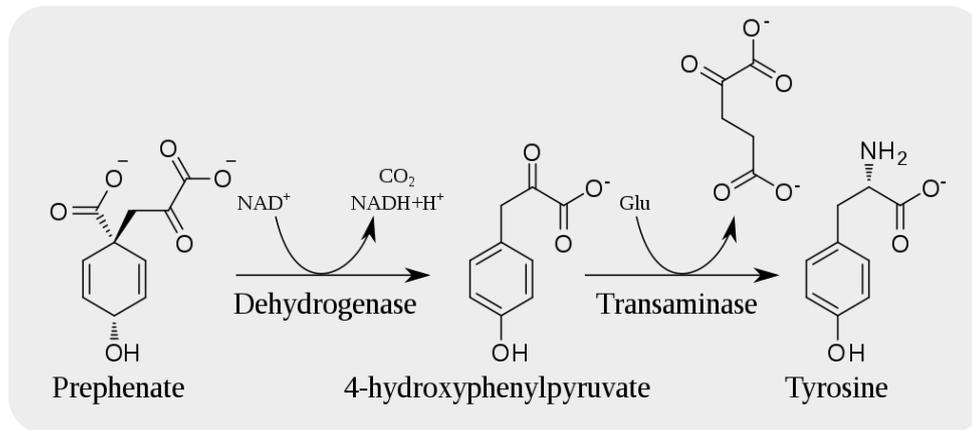


Figure 15 : formation de tyrosine

2.1.8. Conversion du CHORISMATE en tryptophane :

La biosynthèse du tryptophane est plus complexe, et se déroule à partir du CHORISMATE en six étapes.

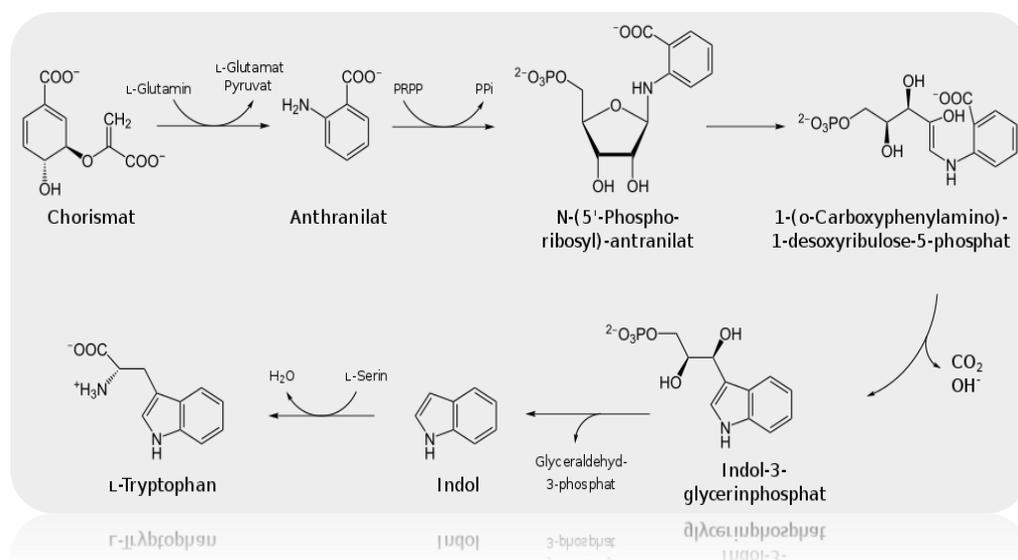


Figure 16 : Etape de la biosynthèse de tryptophane.

2.2. LA voie de MEVALONATE

La voie du MEVALONATE, ou voie de L'ACIDE MEVALONIQUE, également appelée voie de l'HMG-CoA réductase, est la voie métabolique de biosynthèse de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et du diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) chez tous les eucaryotes supérieurs et la plupart des bactéries.

Il existe une alternative à cette voie chez les plantes, certains protozoaires et la plupart des bactéries (dans ce cas à côté de la voie du mévalonate) appelée voie du méthylérythritol phosphate.

La voie du mévalonate produit des métabolites utilisés dans des processus tels que la synthèse des terpénoïdes et des stéroïdes, la prénylation des protéines, la maintenance des membranes cellulaires, la synthèse d'hormones, l'ancrage des protéines à la membrane plasmique, ou encore la N-glycosylation.

Un ensemble de médicaments, parmi lesquels certains anticancéreux (Kelly *et al*, 2006).

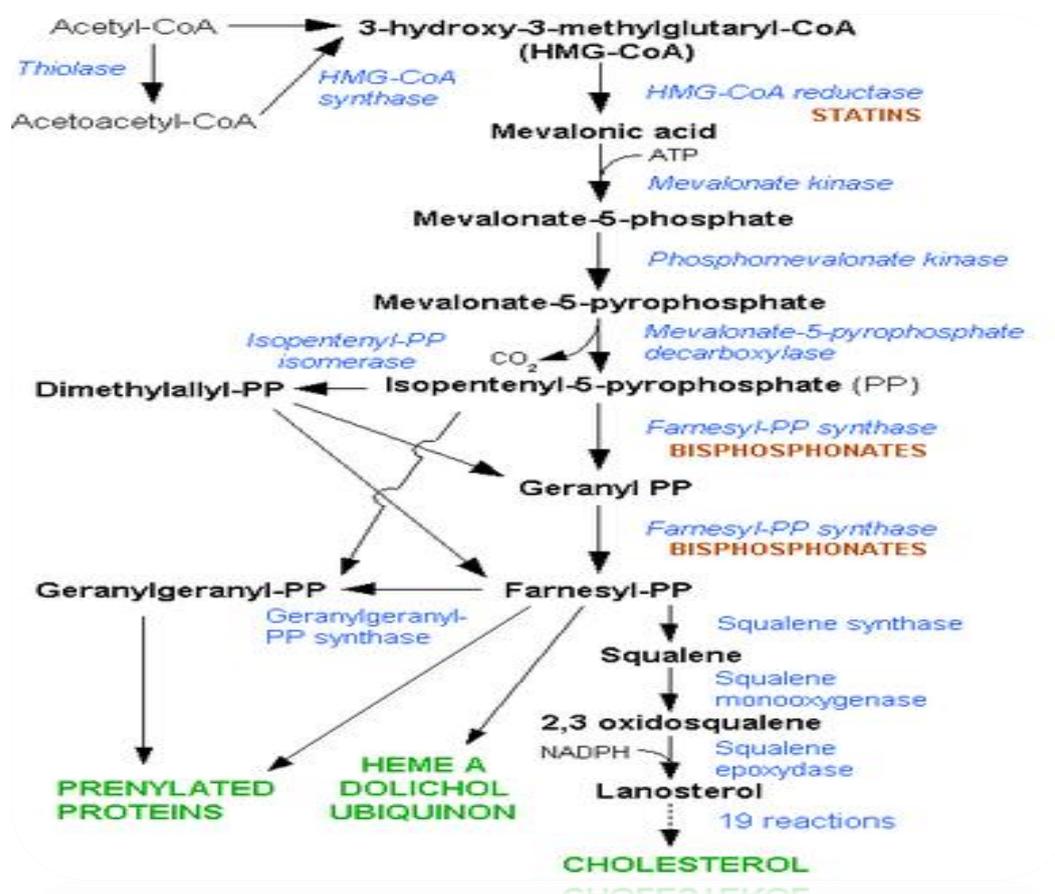


Figure 17 : voie MEVALONATE

3. Classification des métabolites secondaires :

On distingue trois classes principales qui sont les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes :

3.1. Les composés phénoliques :

Tableau 02 : principales classes de composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, Pomme, citrus
	Coumarines	Myristicin, eugénol	
	Isocoumarines	Scopolétine	
	Chromones	Myristicine, eugénol	
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones polyphénols	Eugénine	
		Juglone, plumbagine	Noix
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
	Anthraquinones	Anthraquinones	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, daidzéine	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
	Neolignanes	Eusiderine	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Amentoflavone	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés		

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. (Lebham, 2005). Ils constituent un des groupes les plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante.

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substance organique cycliques

très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène.

Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines les feuilles, les fruits et l'écorce pigments des fleurs, La couleur et l'arome, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ces composés représentent 2 à 3 % de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% et même d'avantage. Ils existent également sous forme de polymères naturels (Tanins). Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des Flavonoïdes. (Walton et Brown, 1999).

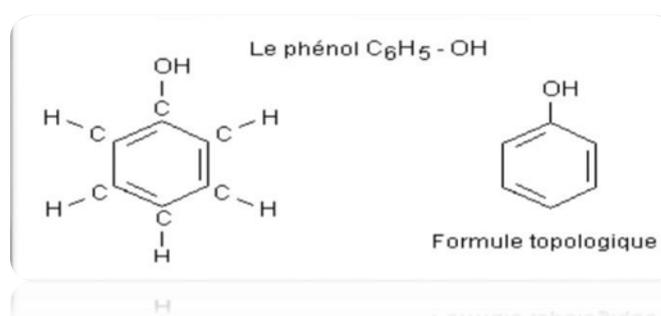


Figure 18 : Formule chimique brute d'une fonction phénol C_6H_5OH

Les composés phénoliques (Acides phénoliques, Flavonoïdes simples et paranthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta *et.al*, 2005).

3.1.1. Acides phénoliques

Ils ne possèdent pas de squelette flavane. Ils sont solubles dans l'éther. Ils peuvent être associés à la lignine, présents sous forme d'ester, ou bien localisés dans la partie de la feuille insoluble dans l'alcool. Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, anti radicalaires, cholagogues, hépato protecteurs, cholérétiques, immunostimulants (Bruneton, 1999). On distingue : Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones). Les dérivés d'esters hydroxy cinnamiques (constitués d'une structure de type C6-C3) (Barboni, 2006). Ce sont composés organiques possèdent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique on distingue 2 sous classes :

3.1.1.1. Les Acides Benzoïques (Hydroxy benzoïques) :

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxy benzoïques, proto-catéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques, o-hydroxy benzoïques et gentisiques. Les acides proto-catéchiques et galliques ont probablement une origine et des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, on le rencontre dans la nature surtout sous forme de dimère (Ribereau, 1968).

Les acides benzoïques proviennent de l'acide cinnamique dont la chaîne latérale perd 2 carbones.

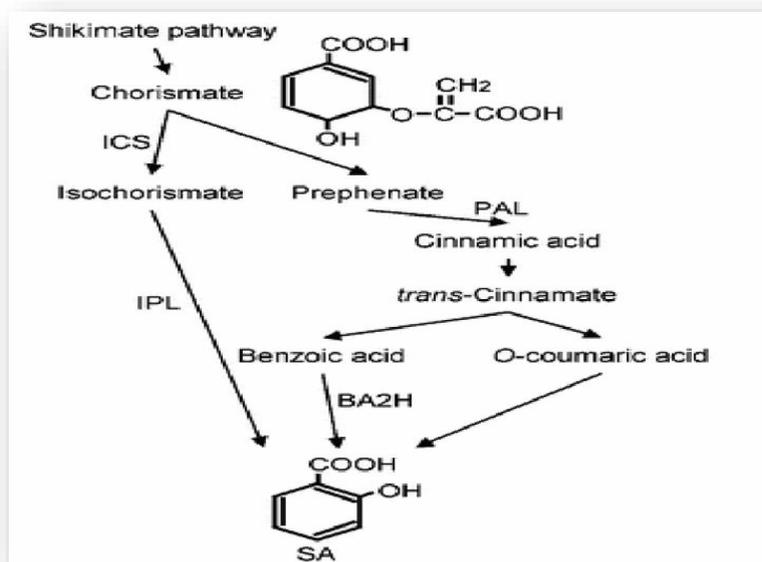


Figure 19 : Voies simplifiées de biosynthèse AS benzoïque Acide 2-hydroxylase BA₂H, ICS isochorismate synthase, IPL isochorismate pyruvate lyase, PAL phénylalanine ammoniac lyase, SA Acide salicylique

3.1.1.2. Les acides cinnamique (Hydroxy cinnamique) :

Ces acides possèdent une structure du type C₆-C₃. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide fertarique et l'acide cinnamique (Ribereau, 1968). Ils sont appelés aussi phénylprpanoïdes.

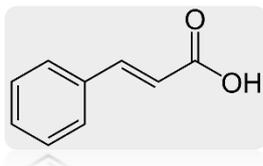


Figure 20 : structure plane de l'acide cinnamique

L'acide cinnamique est biosynthétisé par une grande partie des végétaux. C'est un des éléments de la voie des phénylpropanoïdes; il est produit par l'action de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) sur la phénylalanine. Il est ensuite transformé en acide paracoumarique par l'action de la cinnamate 4-hydroxylase, qui lui donnera une grande série de composés :

- 1) d'autres phénylpropanoïdes, les acides (et esters) hydroxy cinnamiques comme l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique
- 2) Les coumarines, par cyclisation interne
- 3) Les flavonoïdes, via la chalcone
- 4) Les lignines, polymères des monolignols, obtenus par deux réductions successives des acides cinnamique, férulique et sinapique.

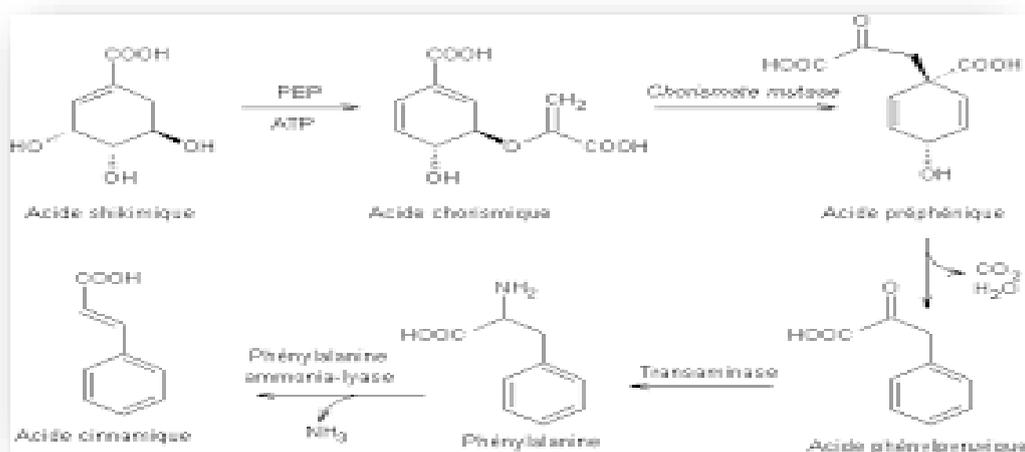


Figure 21 : la voie de la biosynthèse de l'acide cinnamique

L'acide cinnamique est aussi un précurseur des acides de la série benzoïque (via le thioester qu'il forme avec le coenzyme A), avec parmi eux l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide gallique, et leurs nombreux dérivés.

3.1.1.3. Propriétés physicochimiques :**A/ Solubilité :**

- Soluble dans les solvants organiques polaires
- Solubles dans les solutions des bases fortes NAOH et de carbonate de NA
- Les formes hétérosidiques (forme liée avec plusieurs oses) sont solubles dans l'eau.

B/ Stabilité :

- Tous ces composés sont instables, ils sont facilement oxydables surtout en milieu alcalin
- Isomération en milieu acide ou alcalin ou sous l'influence des rayons UV
- Elles présentent des propriétés réductrices l'eau (**Ribereau, 1968**).

C/ Intérêt Pharmacologique :

- Antiseptique
- Anti inflammatoire
- Anti allergique
- Hypolipémiant

3.2. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal (plante vasculaires) Constituant des pigments responsable des coloration jaune, rouge, violet et bleu de différents organes (feuilles, fleurs, fruits). Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (**Bruneton, 1999**).

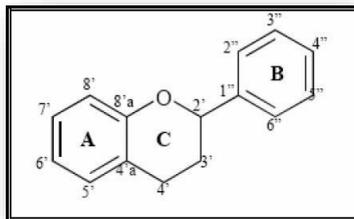


Figure 22 : Squelette de base des flavonoïdes (Ghedira K, 2005).

3.2.1. Biosynthèses :

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide SHIKIMIQUE. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamate-coenzyme a synthétisé à partir de la phénylalanine (Bruneton, 1999)

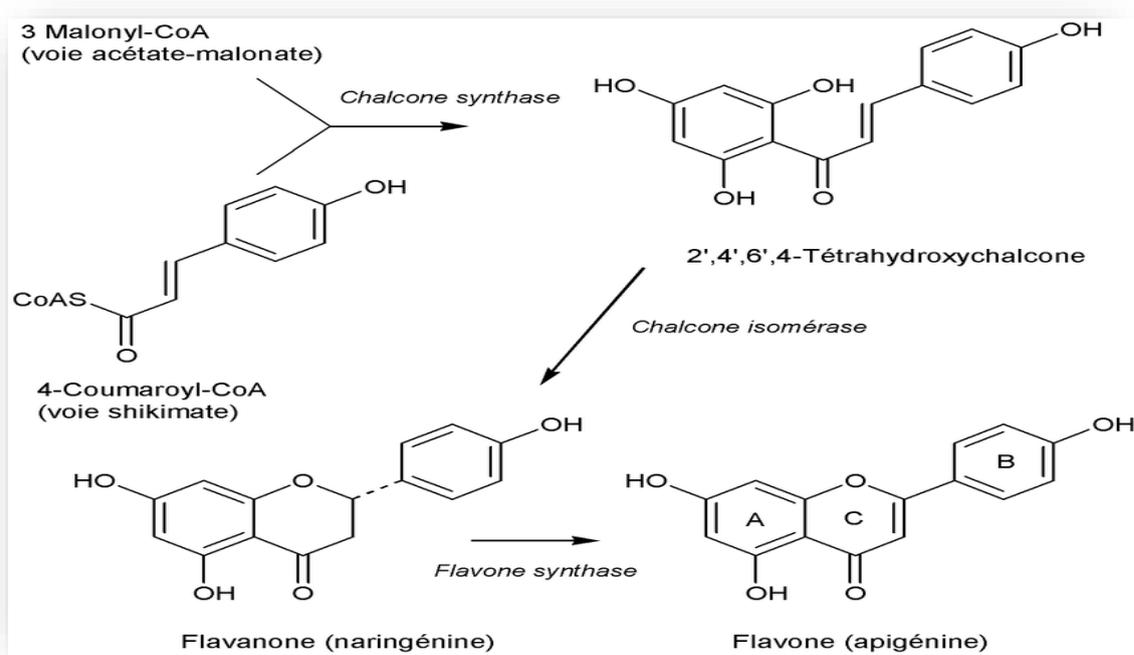


Figure 23 : Biosynthèse des flavonoïdes

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par chalcone, la synthèse d'un acide hydroxycinnamique 4-coumaroyl -COA avec trois unités Malonyl COA, la structure de base en C15 sous forme d'une chalcone soit Tetrahydrochalcone. Dans les conditions physiologiques normale cette chalcone tend à s'isomériser en Flavane sous l'action de la chalcone isomerase qui induit une fermeture

stéréospécifique du cycle **C** (Bruneton, 1999).

3.2.2. Classification :

Les flavonoïdes sont classés d'un côté sur la base du nombre, de la position et de la nature des substituants (groupements hydroxyles -OH et méthoxyles -OCH₃), de l'autre côté sur la base des deux cycles aromatiques A et B et de la chaîne de carbone intermédiaire.

On distingue les flavonols, flavanones, flavones, les isoflavonoïdes (roténonnes et roténoïdes), les leuco-anthocyanes, les anthocyanes et les tanins condensés.

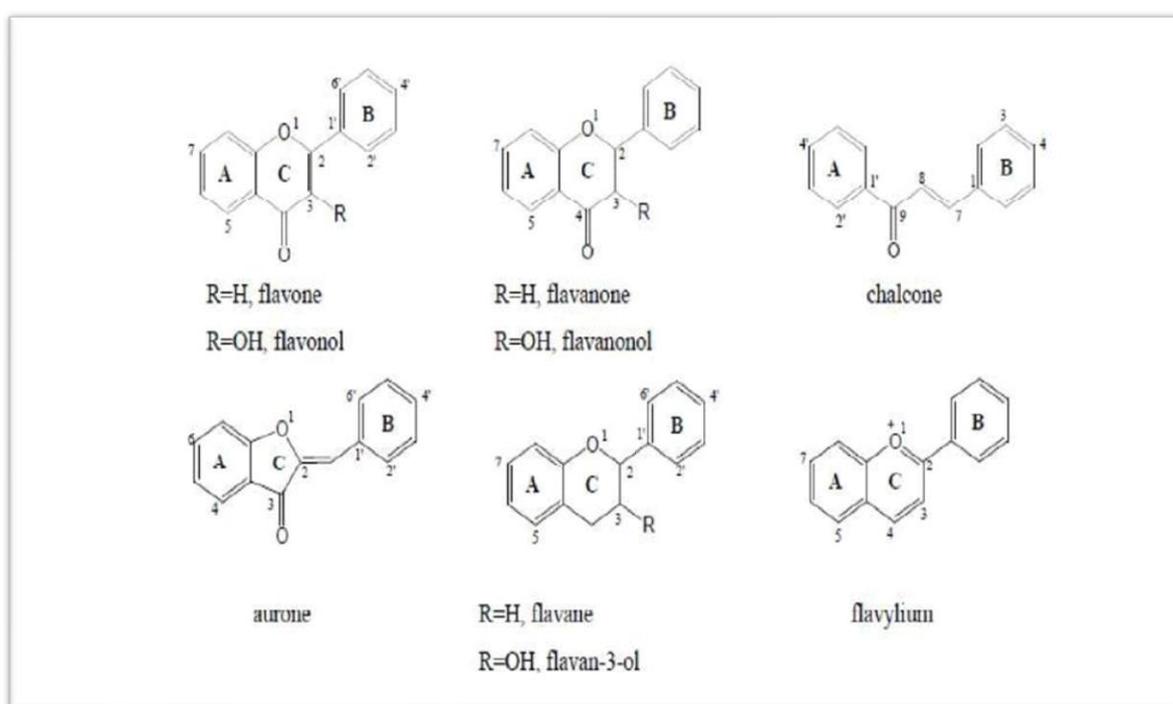


Figure 24 : Structure des différentes classes des flavonoïdes (Dacosta, 2003)

Ils sont subdivisés en sous classe selon le nombre, la position et la nature des substituants (groupement hydroxyle libre, méthyles ou glycolyses) sur les deux cycles aromatiques A et B et le Cycle central C. On distingue alors les 4 oxo-flavonoïdes (flavones, isoflavones, Flavonols, et flavanones, les flavanols et les anthocyanes ainsi que des composés plus minoritaires, les chalcones et dihydro-chalcones (Dacosta, 2003).

3.2.2.1. Flavones :

Les flavones sont une sous-famille des flavonoïdes dont la structure est basée sur (2-phényl-1-benzopyran-4-one ou 2-phénylchromèn-4-one). Ce sont des colorant végétal jaunes dont environ 300 composés naturels sont connus.

Comme d'autres flavonoïdes (hypéroside quercitrine,), ils sont parfois présents sous forme d'hétérosides solubles dans l'eau. On les trouve parfois comme co-pigment avec les anthocyanes.

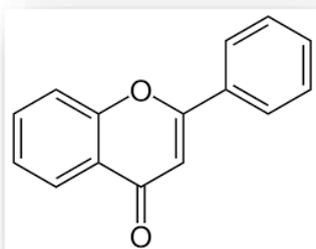


Figure 25 : Squelette de base des flavone

3.2.2.2. Flavonols :

Les flavonols sont un sous-groupe de flavonoïdes dérivés du flavonol (3-hydroxy-2-phénylchromèn-4-one) en nomenclature IUPAC, c'est-à-dire des flavonoïdes possédant un Hydroxyl phénolique en C3 et une fonction carbonyle C=O en C4 sur l'hétérocycle central du squelette de base des flavonoïdes. Ce sont des pigments végétal de couleur jaune plus ou moins clair. Ils diffèrent par le nombre et la position d'hydroxylphénolique -OH, parfois méthylés (groupes méthoxy).

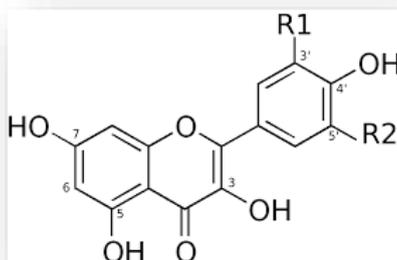


Figure 26 : Squelette de base des Flavonols

3.2.2.3. Flavanones et dihydroflavonols :

Les flavanones et dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centre d'asymétrie. Les dihydroxyflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3. Cette sous classe des flavanones et des dihydroflavonols est un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et les flavonols. En ce qui concerne les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols.

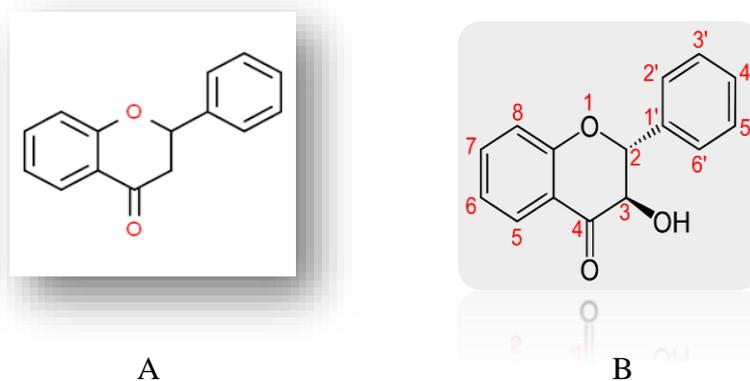


Figure 27 : A / Squelette de base des flavanones. B / Squelette de base des dihydroflavonols

3.2.2.4. Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols et anthocyanidols :

Ces trois groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4, position peut être libre (cas des flavan-3-ols, et anthocyanidols) ou hydroxylé (cas des flavan-3,4-diols). Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères flavoniques appelés pranthocyanidols ou tanins condensés. Les anthocyanidols les plus fréquents sont le pélagonidol et le cyanidol ; Ces molécules peuvent engager le groupement hydroxyle en position C3 en formant une liaison hétérosidique permet d'obtenir à titre d'exemple ; plangonidol-3-oglucose et le cyanidol-3-O-rutinoose ou kéraçyanine.

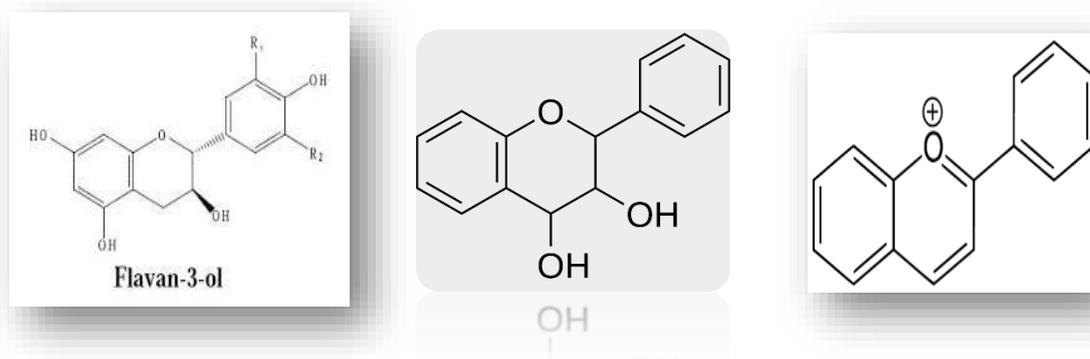


Figure 28 : Squelette de base des : A / flavan-3 –ols, B/ flavan-3,4-diols et C/anthocyanidol

3.2.2.5. Chalcones et aurones :

Les chalcones sont différentes des autres types de flavonoïdes cités au-dessus, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliés par une chaîne tri-carbonée cétonique alpha-béta insaturée. Le noyau B assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A plus souvent identique à celle des autres flavonoïdes. Les autres aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone (figure 22B) (**Anderson, 2001**).

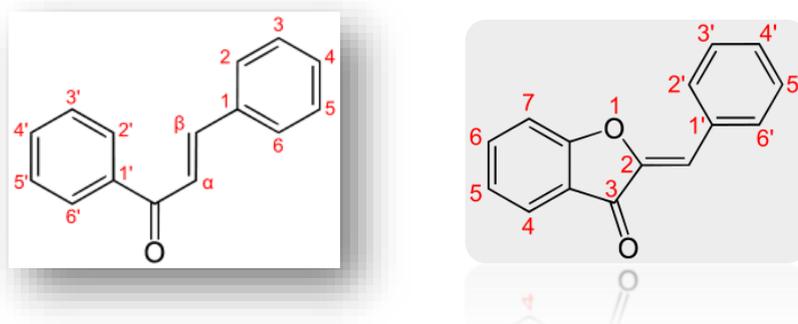


Figure 29 : squelette de base des : A/ chalcones et B/aurone.

3.2.3. Distribution et localisation des flavonoïdes :

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles, Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois des plantes, destiné à les protéger des rayonnements. Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones. L'ingestion de flavonoïdes d'origine alimentaire a été associée à une réduction considérable de la mortalité liée aux maladies cardio-vasculaires. En effet, une étude

menée aux Pays-Bas (Zulphen Elderly Study) auprès de 805 sujets de sexe masculin a mis en évidence une corrélation inverse entre la prise de flavonoïdes d'origine alimentaire (thé, oignons, pommes) et les maladies cardio-vasculaires. D'autres études se sont focalisées sur l'impact de la consommation du thé (boisson riche en flavonoïdes, notamment en quercétine (10 à 25mg/l)). Ce dernier composé exerce des effets antioxydants, antiagrégants et vasodilatateurs pouvant expliquer ses effets cardio-prophylactiques. En outre, il a été démontré que la consommation de quercétine dans les oignons (0.3mg/g de masse fraîche) et les pommes (1mg/g de masse fraîche de la peau de pommes) est inversement corrélée au risque de cancer du poumon (**Yang et al , 2008**).

3.2.4. Activités biologiques des flavonoïdes

De nombreuses enquêtes épidémiologiques dont ressortir l'importance d'une consommation régulière de fruits et légumes dans la prévention des diverses maladies à développement lent (diabète, MCV, cancer...); or ces maladies sont particulièrement fréquentes dans les pays occidentaux où l'alimentation est riche en produits d'origine animale, en graisse, en sucre, ce qui provoque une insuffisance dans l'apport des produits végétaux intéressants (vitamines, polyphénols) (**Quideau et al, 2011**)

Le rôle clé des radicaux libres dans les processus du vieillissement et la genèse de nombreuses pathologies justifie la nécessité d'apporter à l'organisme une protection antioxydante suffisante, et c'est un des arguments majeurs pour recommander une consommation abondante en produits végétaux riche en antioxydants (**Lotito et al, 2006**)

Certains flavonoïdes sont susceptibles de neutraliser les radicaux libres, de favoriser l'élimination de substances toxiques et d'exercer d'autres rôles de protection vasculaire et dans la prévention du cancer (**Sousa et al, 2007**).

Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées). Leur fonction principale est la pigmentation des plantes (aspect esthétique indéniable, culminant dans les fleurs des végétaux). Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge. Les flavones, auronés et chalcones donnent plutôt des couleurs jaunes,

beige voire blanche, ou participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes. Un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer les insectes et cela afin de déclencher la fécondation, les charger de pollen ou de graines de façon à en assurer la dissémination nécessaire à la reproduction de l'espèce. Si tous les flavonoïdes n'absorbent pas dans le domaine visible, ils présentent tous une bande dans l'ultra-violet proche du visible. Certains insectes, telle que l'abeille, distinguent les fréquences de radiation dans le domaine ultra-violet et visible et montrent des préférences pour certaines teintes. C'est pourquoi la possibilité de changement de couleur est largement utilisée par les plantes pour assurer la survie de l'espèce. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent également jouer un rôle dans la protection de ces plantes (**choi et al, 2006**).

Le monde animal est lui aussi très concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la charysine de la quercétine de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes la fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, l'épicéa, le sapin, le saule, l'orme, et la modifient par leurs enzymes salivaires. Les abeilles mettent instinctivement en œuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leur ruche et en colmater les fentes. Les propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses de la propolis étaient entre autres utilisées par les civilisations égyptienne, romaine, grecque et inca. Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactériessymbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Et aussi impliqué dans la Régulation de l'élongation des tiges. Interviennent dans la maturité des fruits. (**Yang et al, 2008**).

Les flavonoïdes préviennent la cataracte diabétique par inhibition de l'aldose réductase du cristallin. En effet, la myricétine présente des effets hypoglycémiant et hypo-triglycéridémiant chez les animaux diabétiques. L'effet des flavonoïdes sur le système immunitaire est complexe et demeure encore mal élucidé. Certains d'entre eux réduisent l'activation du complément diminuant de façon générale la réponse inflammatoire. A doses élevées, ils inhibent les fonctions lymphocytaires, mais, à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés. L'activité immuno--modulatrice des flavonoïdes dépend

d'une part, de leur capacité à inhiber la formation des eicosanoïdes et de l'histamine et de leur pouvoir piègeur des radicaux libres d'autre part. Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes en différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence. Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus.

3.3. Les coumarines :

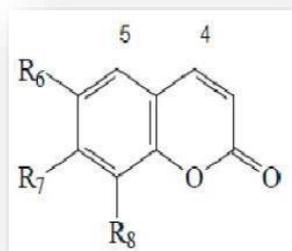


Figure 30 : Structure de base des coumarines

Les coumarines sont des substances naturelles dont la structure compose de neuf atomes de carbone comporte le noyau benzo-apyrone (coumarine) résultant de la lactonisation de l'acide ortho-hydroxy- cis cinnamique. Les coumarines tirent son nom de « coumarou » nom de la fève tonka Coumarouna.



L'acide ortho-hydroxy cinnamique

Coumarine

Figure 31 : réaction de cyclisation de l'acide cis cinnamique oxygéné en C2

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus ; elles sont substituées en C7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone, est le précurseur des coumarines 6,7-di- et 6,7,8-trihydroxylées.

Les différents types de coumarines se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation

des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor,2002).

Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives, elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (Gonzalez *et al*, 1997).

Les coumarines sont des substances phénoliques synthétisées à partir de la fusion des noyaux benzènes et α - pyrone (O'Kennedy *et al*, 1997). Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés alors que les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau (Bruneton, 1999). Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentées sous forme glycosylée, Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries, ils peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (Hofmann, 2003),

3.3.1. Répartition botanique et localisation :

Elles sont surtout présentes chez les Dicotylédones et abondantes dans certaines familles : Rutaceae, Fabaceae, Apiaceae, Oléaceae, Loganiaceae, Solanaceae, Asteraceae et Hippocastanaceae.

Les coumarines sont formées dans les feuilles et s'accumulent surtout dans les racines et les écorces, ainsi que dans les tissus âgés ou lésés. (Hofmann, 2003),

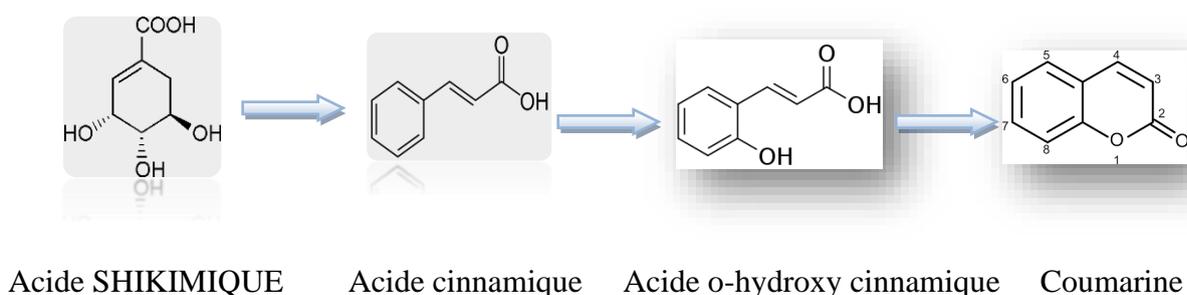
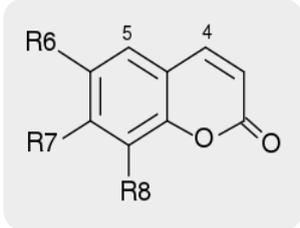


Figure 32 : schéma générale de la biogenèse de coumarine

3.3.2. Classification :

La famille des coumarines est formée des composés phénoliques dérivés de la coumarine simple, la 2H-1-benzopyrane-2-one, molécule elle-même dénuée de groupe hydroxyle phénolique OH. Toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle phénolique. Les divers groupes hydroxyles en C-6, C-7 et C-8, peuvent ensuite :

Tableau 03 : Cas des coumarines substituées par des groupements hydroxyle et méthoxyle

Les coumarines aglycones				
	R6	R7	R8	Formule
Coumarine (non phénolique)	H	H	H	
Ombelliférone	H	OH	H	
Herniarine	H	OCH ₃	H	
Esculétol	OH	OH	H	
Scopolétol	OCH ₃	OH	H	
Scopanone	OCH ₃	OCH ₃	H	
Fraxétol	OCH ₃	OH	OH	

Le Scopolétol est très répandu dans les enveloppes des graines où il inhibe la germination (Hofmann, 2003).

Tableau 04 : Cas des coumarines substituées par un hétéroside (glucosyl).

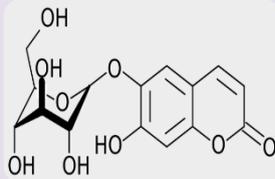
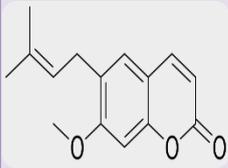
Synonyme		R6	R7	R8	La structure de base Esculoside
Skimmine	7-(o-glucosyl) ombelliférone	H	Gluc	H	
Esculoside	6-(o-glucosyl) esculétol	Gluc	OH	H	
Chicorine	7-(o-glucosyl) esculétol	OH	Gluc	H	
Scopoline	7-(o-Glucosyl)-6-méthoxycoumarine	OCH ₃	Gluc	H	

Tableau 05 : Cas des coumarines substituées par des chaînes isopréniques en C5, C10 (monoterpènes) ou plus rarement C15 (sesquiterpènes).

	Synonyme	R6	R7	R8	Structure de base Subérosine
Auraptène	7-géraniloxy coumarine	H	o-géranyle	H	
Subérosine	7-méthoxy-6-(3-méthyl-2-butényl)-coumarine	Amylényle	OCH ₃	H	
Osthol	7-méthoxy-8-(3-méthyl-2-butényl)-coumarine	H	OCH ₃	Amylényle	

La fusion de la coumarine avec un hétérocycle supplémentaire à 5 ou 6 atomes donnent deux nouvelles classes :

- **Les furanocoumarines** : composés formés par la fusion d'un hétérocycle Furane avec la coumarine et ses dérivés. L'association peut se faire :
 1. Soit dans le prolongement de la coumarine (forme linéaire) : Psoralène et ses dérivés (Bergaptène, Impérorine, Xanthotoxine, Chalepentine),
 2. Soit sur le côté (forme angulaire) : Angélicine et ses dérivés ;

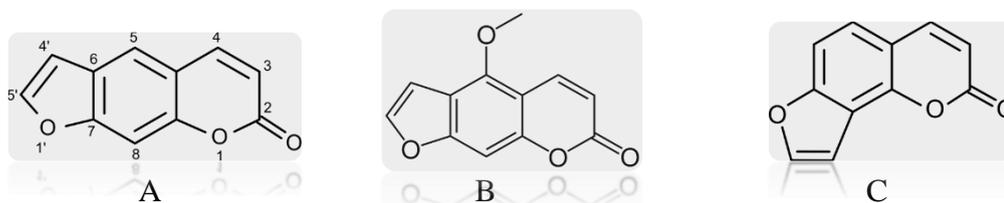


Figure 33 : structure de : A/ Psoralène, B/ Bergaptène et C/ Angélicine

- Les pyranocoumarines, composés formés par la fusion d'un hétérocycle Pyrane avec la coumarine :

1. Soit dans le prolongement (forme linéaire) : Xanthylétine.
2. Soit latéralement (forme angulaire) : Séseline, Visnadine.

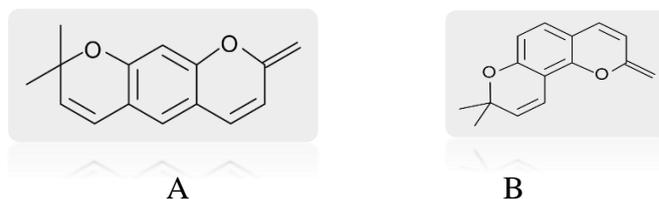


Figure 34 : structure de : A/ Xanthylétine et B/ Séseline

3.3.3. Intérêt pharmacologique de coumarines :

En médecine, la coumarine est utilisée dans le traitement adjuvant du lymphoedème post-mastectomie, en complément des méthodes de contention. Son action anti-œdémateuse résulte de l'augmentation du drainage lymphatique et de la stimulation de l'activité protéolytique des macrophages (**commission du Codes Alimentaire, 2006**). Mais la multiplication des cas d'hépatite chez les patients traités à fortes doses avec cette molécule a conduit au retrait du marché de la spécialité correspondante (**Casley *et al*, 1993**). La coumarine reste utilisée en phytothérapie, mais à des doses beaucoup plus faibles, comme dans les spécialités contenant du mélilot.

À la différence de ses dérivés (comme la warfarine), la coumarine elle-même n'a pas d'activité anticoagulante. Mais la fermentation humide de foin qui renferme de la coumarine (en raison de la présence de mélilot) génère des dérivés anticoagulants, qui entraînent des hémorragies chez les herbivores qui en consomment. Le 4-hydroxy-3-[1-(4-nitrophényl)-3-oxobutyl]coumarine, appelé usuellement Acénocoumarol, est antagoniste de la vitamine K et inhibiteur de la synthèse des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants. Ses propriétés anticoagulantes sont utilisées dans la thérapie des maladies thromboemboliques.

L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie. Actuellement, elle entre dans la composition de 90 % des parfums (dans 60 % avec une teneur supérieure à 1 %) (**Bouzabata, 2018**). Elle s'associe bien à la vanilline dont elle atténue le côté alimentaire. Elle est aussi utilisée dans les produits cosmétiques (déodorants, eaux de toilette, crèmes, shampoings, savons de toilette, dentifrice, etc.).

On trouve aussi de la coumarine dans les cigarettes indiennes, les bidî, et les cigarettes aux clous de girofle indonésiennes, les karatekas.

Pour neutraliser ou masquer les mauvaises odeurs, la coumarine est aussi ajoutée aux peintures, insecticides, encres, aux aérosols, au caoutchouc ou aux matières plastiques (Lake, 1999).

3.4. Les quinones :

Les quinones constituent une série de diènes plutôt que des composés aromatiques comportant un noyau de benzène sur lequel deux atomes d'hydrogène sont remplacés par deux atomes d'oxygène formant deux liaisons carbonyles (dicétones éthyléniques conjuguées cycliques). Ils sont des transporteurs d'électrons dans la membrane mitochondriale interne et dans la membrane des thylakoïdes.

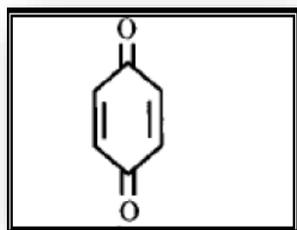


Figure 35 : Structure d'une molécule de quinone (Cowan, 1999).

3.4.1. Classification :

Les principales quinones sont :

3.4.1.1. Le Benzoquinone ou quinone (C₆H₄O₂) :

Découverte en 1838 par Wosrerenski, chimiste polonais, dont on utilise les propriétés rédox dans la technique de développement photographique. C'est l'un des deux isomères de la cyclohexadienedione. L'orthobenzoquinone (1,2-dione) et le parabenzoquinone (1,4-dione).

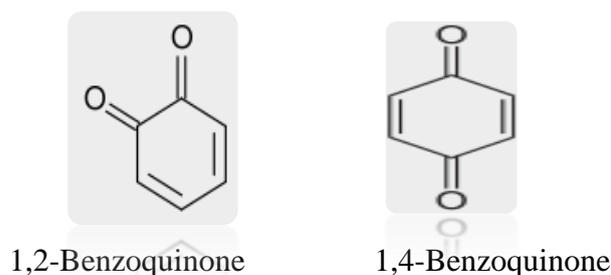


Figure 36 : Structure de Benzoquinone

3.4.1.2. Le Naphtoquinone (C₁₀H₆O) :

Le Naphtoquinone, ou 1,4-naphtoquinone, est un quinone dérivant du naphthalène dont de nombreux dérivés sont pharmacologiquement actifs, étant généralement cytotoxiques et possédant, selon les cas, des effets antibactériens, antimycosiques, antiviraux, insecticides, anti-inflammatoires et/ou antipyrétiques.

Les différentes formes de vitamine K ont un squelette 1,4-naphtoquinone.

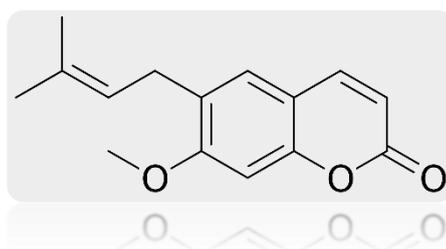


Figure 37 : Structure de base la Naphtoquinone

3.4.1.3. L'antraquinone (C₁₄H₈O)

Est une molécule dérivée de l'anthracène, elle appartient aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. L'antraquinone existe dans les plantes, les champignons et les insectes. On peut la trouver dans les racines, tiges vertes et les graines. L'antraquinone fait partie des quinones naturelles, c'est une substance oxygénée engendrée par l'oxydation des composés aromatiques (**Bravo, 1998**).

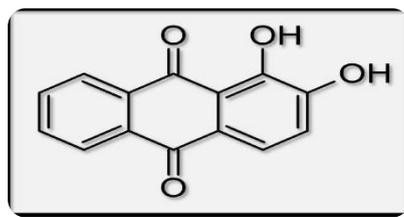


Figure 38 : structure chimique des anthraquinones

3.5. Tanins :

Ils sont d'origine végétale et non azotée qu'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres, les fruits (raisin, datte, café, cacao...) et les feuilles de thé. Ce sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau de masse molaire entre 500-2000D, de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. (**Vermerris *et.al*, 2006**).

Ils sont utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, les tanins ont une importance économique et écologique importante parmi les caractéristiques des tanins le goût astringence qui est une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (**Peronny, 2005**).

Sur le plan chimique, ils sont constitués soit de polyol (glucose le plus souvent), ou de catéchine ou de triterpénoïde auxquels sont attachées des unités galloyles (ou leurs dérivés), soit d'oligomères, ou de polymères de flavanols.

3.5.1. Classification :

Les tanins sont classés en deux groupes selon leur structure chimique :

3.5.1.1. Les tanins condensés (pro-anthocyanidines) :

De structure plus complexe, on les appelle également pro-anthocyanidines, largement présents dans le règne végétal, et que l'on rencontre dans de nombreux produits alimentaires (fruit, légumes, boissons...) (**Peronny, 2005**).

Ils ne renferment pas de sucres dans leur molécule ; ils ne sont hydrolysés ni par les acides, ni par les tannases mais en présence d'acides forts ou d'agents d'oxydation, ils se transforment en substances rouges.

Les phlobaphènes (exemple : rouge de cola), ce sont des polymères de flavan-3-ols, appelés aussi catéchines et de flavan-3,4-diols appelés leuco- anthocyanidines ou un mélange des deux (**Atefeibu, 2002 ; Peronny, 2005**).

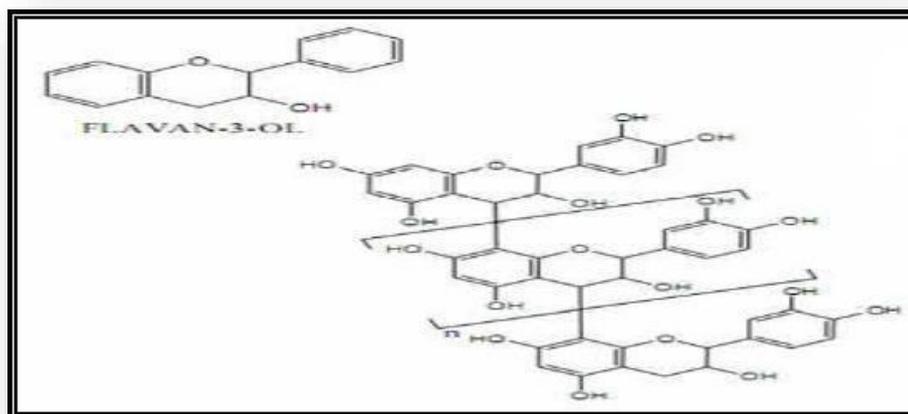


Figure 39 : Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

3.5.1.2. Tanins Hydrolysable :

Ce sont des esters de glucose, ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (le plus souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être de l'acide gallique (Macheix *et al.*, 2005).

Ils sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbonées à carbone entre noyaux (liaisons bi-phényle réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins ellagiques. (Bessas *et al.*, 2007).

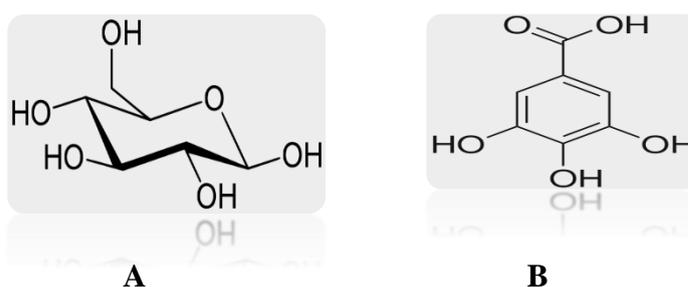


Figure 40 : Structure de : A/ D-Glucose et B/ Acide Gallique

Les gallotanins ou tanins galliques sont formés autour d'un sucre (glucose ou polyol dérivé du D-glucose) comportant plusieurs liaisons esters avec des acides galliques (ou leurs dérivés) ; les fonctions hydroxy OH des résidus polyoliques sont partiellement ou totalement substitués par des unités galloyles. Les tetra-esters et penta-esters sont les

intermédiaires fondamentaux dans la biosynthèse de presque tous les polyphénols hydrolysables naturels. Il peut se constituer des chaînes latérales de plusieurs acides galliques liés selon un mode méta- ou para-dépsidique.

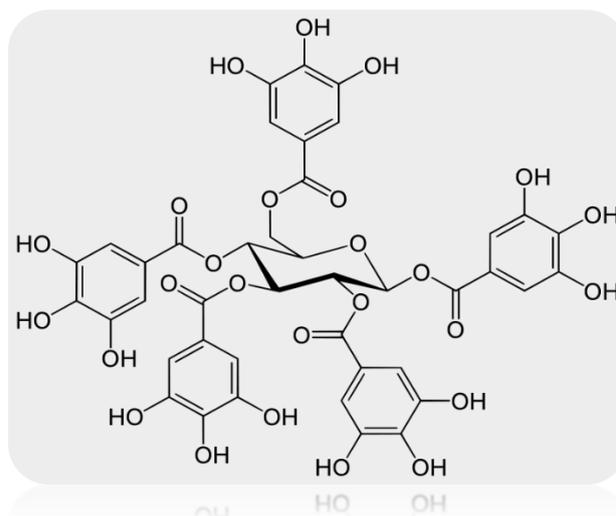


Figure 41 : structure penta-o-galloyl-D-glucose,

3.5.2. Propriétés Biologique :

Les tanins sont des métabolites secondaires des plantes, leur conférant une protection contre les prédateurs (herbivores et insectes). La propriété astringente des tanins est à la base d'autres propriétés (vulnérable, guérison des plaies ou des blessures, antidiarrhéique.), elle permet la cicatrisation, l'imperméabilisation de la peau, favorise la vasoconstriction des petits vaisseaux. En outre, les tanins ont un très grand pouvoir antibactérien, antiviral, antiinflammatoire. Les plantes riches en tanins sont utilisées dans les cas de rhume, les problèmes de sécrétions trop importantes, blessures, coupures et brûlures

Les tanins sont capables de former des complexes avec les macromolécules et particulièrement avec les protéines. Les tanins vacuolaires dans les cellules végétales, en réagissant avec les protéines cytosoliques, expliquent le brunissement enzymatique des fruits. (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Tanin> - cite_note-isyeb-24).

La cuticule joue un rôle protecteur chez les Arthropodes. Elle est durcie par des tanins qui se combinent avec les scléroprotéines de l'exocuticule. La combinaison avec le collagène de la peau est à l'origine du tannage.

La réaction des tanins des végétaux verts et des vins trop jeunes avec les glycoprotéines de la salive est à l'origine de la sensation d'astringence. La faculté de

percevoir l'amertume et l'astringence (sensation induite par les tanins qui se complexent avec les protéines salivaires de type mucine et leur font perdre leurs propriétés lubrifiantes) a probablement été sélectionnée au cours de l'évolution pour avertir les herbivores et les omnivores de l'absorption de ces composés potentiellement toxiques, ces sensations pouvant provoquer un rejet de l'aliment par l'animal (anti-appétent), voire l'arc réflexe du vomissement (**Georg et al, 1999**). Les tanins peuvent en effet avoir une toxicité propre mais ils agissent généralement en interférant avec les protéines, soit celles de l'aliment végétal ce qui diminue alors sa digestibilité, soit celles de la salive, soit encore les enzymes digestives (rappel du rôle des tanins des plantes qui interviennent dans leur défense contre les herbivores et les microbes pathogènes) ou les glycoprotéines membranaires au niveau de la muqueuse intestinale qui peuvent être partiellement inhibées (**Macheix et al, 2005**). Selon leur concentration (notion de dose efficace et de dose toxique), les tanins ont la capacité à resserrer les tissus et de modifier la perméabilité membranaire par complexation avec leurs chaînes glycoprotéiques, d'où leur usage interne (antidiarrhéique, antitumoral, action anti-inflammatoire, activité antimicrobienne, antifongique et antivirale) et externe (effet hémostatique, cicatrisant)

La complexation peut être réversible quand elle s'effectue par liaison hydrogène et interactions hydrophobes . Les tanins condensés (proanthocyanidols) ont une affinité moindre pour les protéines que les esters poly-galliques. La complexation peut devenir irréversible lorsque les tanins par auto-oxydation donnent des o-quinones qui forment des liaisons covalentes.

3.6. 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 dû aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle.

Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (**Bessas *et al.*, 2007**).

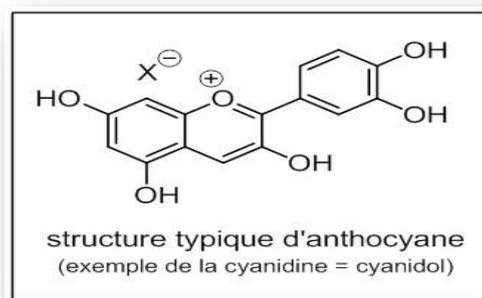


Figure 42 : structure typique d'anthocyane

3.7. Les alcaloïdes :

Sorti des laboratoires chimiques entre 1819 et 1827, le mot *alcaloïde* se rapporte à l'origine à un « comportement chimique semblable à un alcali, c'est-à-dire à tout corps basique en milieu aqueux » au cours de l'opération d'extraction en milieu liquide de base forte, solubilisant le ou les solutés basiques dits alcaloïdes. Il a été employé au siècle suivant pour décrire n'importe quelle base de Lewis contenant un hétérocycle azoté ou, improprement, une fonction amine. À cause du doublet électronique non liant de l'azote, les alcaloïdes sont considérés comme des bases de Lewis. Les alcaloïdes ont la propriété de former des sels et d'avoir un goût amer. De nombreuses autres méthodes comme la chromatographie sont également employées pour identifier et doser la molécule.

Un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doté, à faible dose de propriétés pharmacologiques marquées. Associés à l'essor de l'industrie pharmaceutique, ils ont permis d'ouvrir le domaine des « médicaments chimiques » à partir de la fin du XIX^e siècle. Le regroupement d'un tel ensemble est par ailleurs confirmé par des réactions communes de précipitation avec les « réactifs généraux des alcaloïdes » (**Bruneton, 2009**).

En effet, les molécules d'alcaloïdes à l'état pur, les plus connues, sont souvent hautement toxiques comme la strychnine, l'aconitine, l'atropine, la cocaïne... mais certaines, du fait de leur action physiologique puissante, sont efficacement employées en dosage mesuré et contrôlé dans la médecine ou thérapeutique moderne (**Lendvaib Z *et al.***,

2002). Il s'agit, par exemple, de propriétés analgésiques avec la morphine ou la codéine, dans le cadre de protocoles de sédation (anesthésie) souvent accompagnés d'hypnotiques, ou bien d'un usage comme agent antipaludéen (quinine, chloroquine) ou agent anticancéreux (vinblastine, vincristine), et même de la sédation aux opiacés avec l'ibogaïne (Aniszewski, 2007).

3.7.1. Distribution Alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont présents essentiellement chez les Angiospermes dont la plupart sont des dicotylédones. Cependant, de nombreux alcaloïdes ont également été trouvés chez des Monocotylédones et même chez des Gymnospermes *Ephédra*.

Les ptéridophytes sont rarement alcaloïdifères. Les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement un seul alcaloïde, même si elles contiennent parfois un composé très majoritaire mais, il n'est pas rare que plusieurs dizaines d'alcaloïdes soient présents dans une même drogue.

Généralement, tous les alcaloïdes d'une même plante ont une origine biogénétique commune, et ils existent généralement sous la forme, soluble, de sels d'acides végétaux (citrate, malate, tartrate, benzoate...etc.) ou sous celle d'une combinaison avec les tanins.

Les alcaloïdes sont exceptionnels chez les bactéries et assez rares chez les champignons. Les structures alcaloïdiques existent aussi rarement chez les animaux. Dans certains cas, ce sont des produits formés à partir des alcaloïdes contenus dans les végétaux inclus dans la ration alimentaire de l'animal et dans d'autres cas, ils semblent être des produits du métabolisme de l'animal, c'est en particulier le cas chez des Amphibiens Urodèles ou Anoures.

Les alcaloïdes peuvent être présents dans toutes les parties de la plante mais sont le plus souvent localisés dans certains organes : Racine (Ipéca), feuille (Coca), fruit (Pavot), écorce (quinquina), graine (Colchique) etc cependant, ils existent rarement à l'état libre dans la plante, le plus souvent ils sont combinés aux tanins ou aux acides organiques (Acide acétique, citrique, malique...). Leur teneur est très variable. Généralement, elle est comprise entre 1‰ et 2 à 3% (du poids sec). Parfois on trouve des teneurs supérieures à 10% (Ecorces de quinquinas) (Krief, 2003 ; Bruneton, 2009).

3.7.2. Classification :

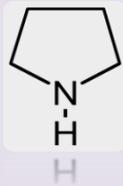
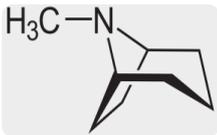
Les alcaloïdes vrais dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ce sont des substances douées d'une grande activité biologique, même à faibles doses. Ils apparaissent dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme d'un sel, soit comme N-oxide.

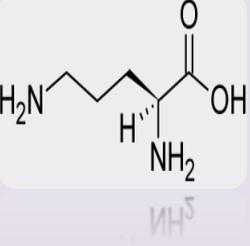
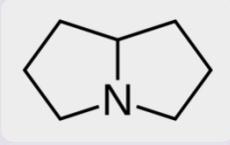
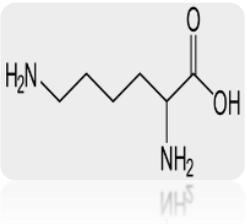
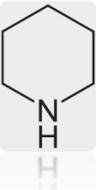
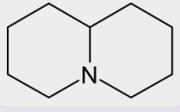
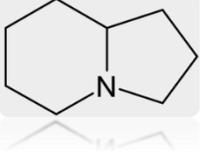
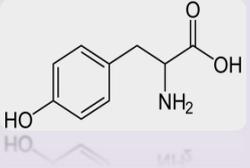
Les proto-alcaloïdes sont des amines simples, dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle. Ils dérivent aussi d'acides aminés.

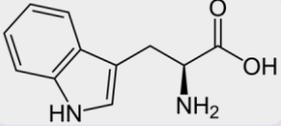
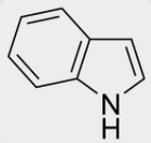
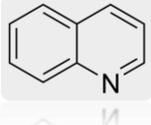
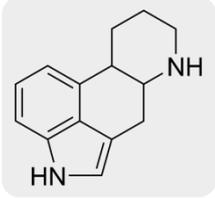
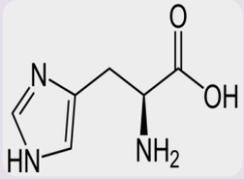
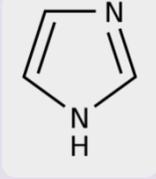
Les pseudo-alcaloïdes ne sont pas dérivés d'acides aminés. Ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire d'un de leurs précurseurs, ou d'un de leurs postcurseurs (dérivés). Ils peuvent aussi résulter d'amination, ou de réaction de transamination dans une voie connectée avec les précurseurs ou les postcurseurs d'acides aminés.

Tadeusz Aniszewski propose la classification suivante, basée sur les précurseurs dans la voie biologique de synthèse.

Tableau 06 : Les alcaloïdes vrais

Précurseur	Groupe d'alcaloïdes	Noyau caractéristique	Exemples
L'ornithine	Alcaloïdes pyrrolidiniques	 Pyrrolidine	Cuscohygrine, Hygrine
	Alcaloïdes tropaniques	Tropane 	Atropine, Cocaïne, Hyoscyamine, Scopolamine

	<p>Alcaloïdes pyrrolizidiniques</p>	<p>Pyrrolizidine</p> 	<p>Acétyl-lycopsamine, Europine, Homospermidine, Ilamine, Mételoidine, Rétronécine</p>
	<p>Alcaloïdes pipéridiniques</p>	 <p>Pipéridine</p>	<p>Anaférine, conine, Lobélanine, Lobéline, Pelletièreine, Pipéridine, Pipérine, Sédamine</p>
<p>L-lysine</p>	<p>Alcaloïdes quinolizidiniques</p>	 <p>Quinolizidine</p>	<p>Cytisine, Lupinine, Spartéine</p>
	<p>Alcaloïdes indolizidiniques</p>	 <p>Indolizidine</p>	<p>Castanospermine, Swainsonine</p>
<p>L-tyrosine</p> 	<p>Alcaloïdes tétrahydroisoquinoliniques simples</p>	<p>Benzyltétrahydroisoquinoline</p>	<p>Codéine, Morphine, Norcoclaurine, Papavérine, Tétrandine, Thébaïne, Tubocurarine</p>
<p>L-tyrosine ou L-phénylalanine</p>	<p>Alcaloïdes phényléthylisoquinoliniques</p>	<p>Alcaloïdes des Amaryllidacées</p>	<p>Crinine, Floramultine, Galantamine, Lycorine</p>

<p>L-tryptophane</p> 	Alcaloïdes indoliques	 <p>Indole</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Arundacine, Psilocine, Sérotonine, Tryptamine, Zolmitriptan - Elaeagnine, Harmine - Ajmalicine, Catharantine, Tabersonine
	Alcaloïdes quinoléiniques	<p>Quinoléine</p> 	Chloroquinine, Cinchonidine, Quinine, Quinidine
	Alcaloïdes pyrroloindoliques	<p>Indole</p>	A-yohimbine, Chimonanthéine, Corynanthéidine
	Alcaloïdes de l'ergot de seigle	 <p>Ergoline</p>	Ergotamine, Ergokryptine
<p>L-histidine</p> 	Alcaloïdes imidazoliques	 <p>Imidazole</p>	Histamine, Pilocarpine, Pilocosine
	Alcaloïdes mangamaniaques	Xestomanzamine	Xestomanzamine A et B

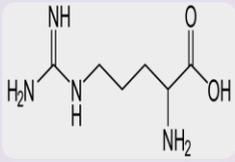
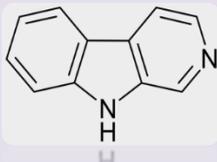
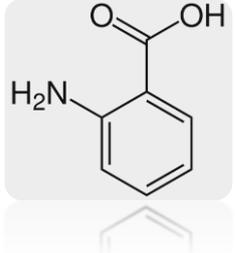
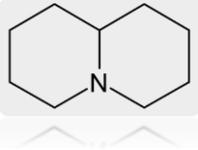
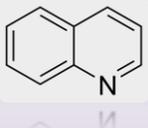
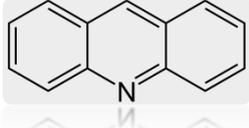
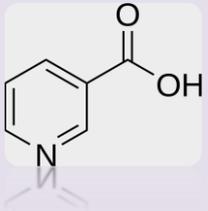
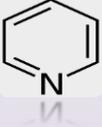
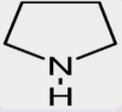
<p>L-arginine</p> 	<p>Alcaloïdes marins</p>	<p>β-carboline</p> 	<p>Saxitoxine, Tétrodotoxine</p>
<p>Acide anthranilique</p> 	<p>Alcaloïdes quinazoliques</p>	<p>Quinazoline</p> 	<p>Péganine</p>
<p>Acide nicotinique</p> 	<p>Alcaloïdes quinoléiniques</p>	<p>Quinoléine</p> 	<p>Acutine, Bucharine, Dictamine, Foliodine, Perforine, Skimmianine</p>
<p>Acide nicotinique</p> 	<p>Alcaloïdes acridoniques</p>	<p>Acridine</p> 	<p>Acronycine, Rutacridone</p>
<p>Acide nicotinique</p> 	<p>Alcaloïdes pyridiniques</p>	<p> Pyridine  Pyrrolidine</p>	<p>Anabasine, Cassinine, Evoline, Nicotine, Wilforine</p>

Tableau 07 : Les proto-alcaloïdes.

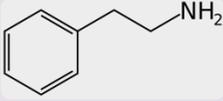
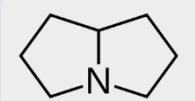
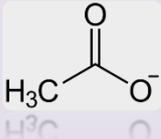
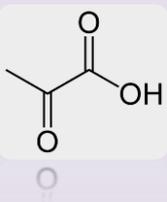
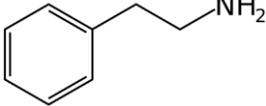
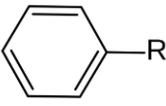
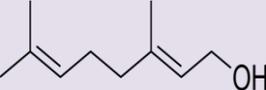
Précurseur	Groupe d'alcaloïdes	Noyau caractéristique	Exemples
L-tyrosine	Alcaloïdes phényléthylaminés	Phényléthylamine 	Adrénaline, Anhalamine, Dopamine, Noradrénaline, Hordenine, Mescaline
L-tryptophane	Alcaloïdes indoloterpéniques	Indole	Yohimbine
L-ornithine	Alcaloïdes pyrrolizidiniques	Pyrrolizidine 	4-hydroxy-stachydrine, Stachydrine

Tableau 08 : Les pseudo-alcaloïdes.

Précurseur	Groupe d'alcaloïdes	Noyau caractéristique	Exemples
Acétate 	Alcaloïdes pipéridiniques	Pipéridine	Conicine, Conicéine, Pinidine
	Alcaloïdes sesquiterpéniques	Sesquiterpène	Cassinine, Évonine, Maymysine, Wilforine

<p>Acide pyruvique</p> 	Alcaloïdes de l'Ephédra	Phényle C	Cathine, Cathinone, Éphédrine, Noréphédrine
<p>Acide férulique</p> 	Alcaloïdes aromatiques	Phényle 	Capsaïcine
<p>Géraniol</p> 	Alcaloïdes terpéniques	Terpénoïdes	Aconine, Aconitine, Méthyllycaconitine, Actinidine (en), Atisine, Gentianine
<p>Saponines</p>	Alcaloïdes stéroïdiques		Cholestane, Conessine, Jervine, Etioline, Prégnénone, Solanidine

3.7.3. Intérêt des alcaloïdes :

Comme pour beaucoup d'autres métabolites secondaires, on ne sait pratiquement rien du rôle des alcaloïdes dans les végétaux. La toxicité de certaines, laisse supposer des rôles de protection contre les prédateurs. Certains auteurs estiment que ce sont des métabolites terminaux « déchets inutiles ». D'autres les désignent comme des métabolites intermédiaires.

Du fait de leurs rôles physiologiques ou de leurs activités biologiques spécifiques, les molécules alcaloïdes restent des importants réactifs biologiques. Elles présentent un intérêt toujours actuel en thérapeutique. Si la recherche des principes actifs continue activement en ce qui concerne les plantes médicinales et/ou toxiques, les alcaloïdes connus sont des produits de base de la pharmacie. En 1995, ils représentaient en valeur dans l'industrie

pharmaceutique environ 1,5 milliard de francs, au même rang que les hormones, chiffre dépassé par les vitamines comptant 1,8 milliard de francs, mais dépassant en valeur les antibiotiques représentant 1,2 milliard de francs.

3.8. Les Terpénoïdes :

Issus des mêmes précurseurs, et formés à partir de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (polymères de l'isoprène), les Terpénoïdes et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires. Les terpènes ne sont pas formés à partir de l'isoprène C_5H_8 bien qu'ils aient pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire $(C_5H_8)_n$. En fonction du nombre n (entier) d'unités penta-carbonées (en C_5) ramifiées (**Bottine, 2011**).

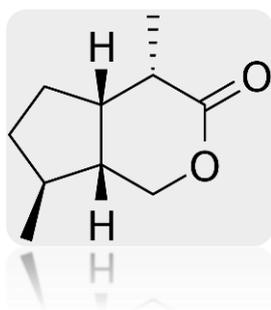


Figure 43 : Structure chimique d'un Terpénoïdes, l'Iridoïde.

Les terpénoïdes de plantes sont beaucoup utilisés en raison de leurs qualités aromatiques. Ils jouent un rôle dans les remèdes en herboristerie traditionnelle et font l'objet de recherche pour découvrir des effets antibactériens, antinéoplasiques ou autres effets pharmaceutiques (**Klaas et al., 2002**).

Les terpénoïdes contribuent au parfum de l'eucalyptus, au goût de la cannelle, du clou de girofle et du gingembre et aux couleurs jaunes des fleurs. Parmi les terpénoïdes connus, on peut citer le citral, le menthol, le camphre et les cannabinoïdes trouvés dans la plante de *Cannabis*.

Les stéroïdes et les stérols chez les animaux sont produits biologiquement à partir de précurseurs terpénoïdes. La liaison de protéines à des terpénoïdes a pour effet d'augmenter leur attachement à la membrane cellulaire ; cette modification post-traductionnelle s'appelle « l'isoprénylation ».

Les terpénoïdes sont classés selon le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène : hémiterpènes (5C), monoterpènes (10C), sesquiterpènes (15C), diterpènes (20C) comme le vitamine k, sesterpènes (25C), triterpènes (30C), tetraterpènes (40C) et polyterpènes (**Guentri A, 2019**). Néanmoins, ils ne sont pas spécifiques des végétaux puisque le squalène, le cholestérol ou encore des sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent chez les animaux.



CHAPITRE III :
DOSAGE DES ALCALOIDES

1. Introduction :

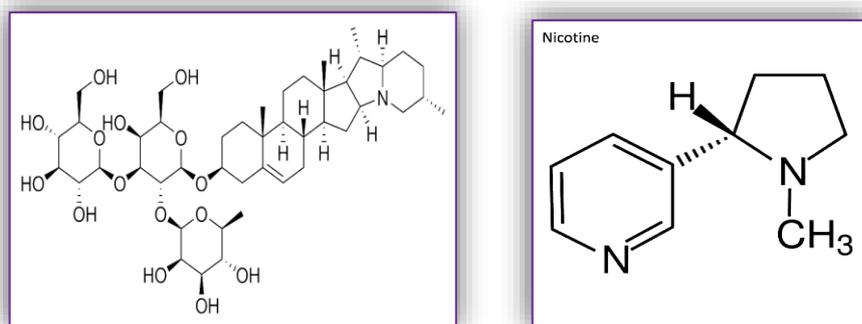
Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Depuis l'identification du premier alcaloïde - à savoir la morphine - à partir de l'Opium en 1806 (**Harborne,1995**), plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes.

Les alcaloïdes sont principalement extraits des plantes fleurissantes, mais on les trouve également chez quelques animaux comme les fourmis, les grenouilles et les coccinelles (**Mann,1994**).

Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane (**Dewick, 2001**). Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes.

Une plante peut contenir plus de cent alcaloïdes différents, mais en général leur concentration ne représente pas plus de 10% du poids sec. L'existence de plantes ne contenant pas d'alcaloïdes démontre que ces composés ne sont apparemment pas essentiels à leur reproduction. Pourtant, plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes (**Kutchan,1995**). La nicotine empêche la croissance des larves du tabac.

Le composé pur est également appliqué comme insecticide efficace dans des serres. En outre, des alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante (**Bhat,2005**). Parfois, ils n'ont pas de rôle précis et sont simplement des sous-produits du métabolisme végétal.



A

B

Figure 44 : La structure de : A/ Solanine et B/ Nicotine

2. Fonction des alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des composés qui sont extraits de plantes et qui sont utilisés dans de nombreux cas et pour diverses raisons : antalgiques, antipaludéen, substances paralysantes, poisons ou encore en tant que stupéfiants. On les retrouve, sans le savoir, au quotidien dans de nombreux cas, elles ont un coté stimulant non négligeable mais sont aussi des substances toxiques aux effets néfastes pour l'organisme (**Anaëlle Chaudier,2021**).

3. Le dosage :

Le dosage s'impose dans les matières premières servant à préparer les alcaloïdes (plantes) et ensuite pour en suivre l'extraction.

Il faut s'assurer au préalable de la pureté de l'alcaloïde et, si besoin, l'extraire de son milieu. On opère dans un solvant aqueux, alcoolique ou anhydre (acide acétique cristallisable), ce dernier type étant plus approprié au dosage de substances à faible basicité. Les mesures physiques, souvent plus spécifiques et plus sensibles, sont couramment appliquées sur des quantités inférieures au milligramme comme la spectrophotométrie UV., la fluorescence ou les méthodes électrochimiques.

Mais il est fait appel de plus en plus, surtout pour des dosages dans les milieux biologiques, à la chromatographie liquide à haute performance (CLHP.) qui permet une bonne séparation du produit analysé et son dosage sélectif à la sortie de l'appareil. (**Jacques E, 2022**)

3.1. Technique de dosage des alcaloïdes :

Il faut distinguer le dosage des alcaloïdes totaux et celui d'un alcaloïde particulier dans une drogue donnée. Le dosage des alcaloïdes totaux commence obligatoirement par leur extraction à l'aide d'une méthode général : on préfère généralement l'extraction en milieu alcalin en s'assurant à chaque étape que l'épuisement a été total.

Le résidu d'alcaloïde totaux peut ensuite être apprécié par une méthode gravimétrique ou par un dosage volumétrique, par d'autres procédés dans le dosage volumétrique en utilisant soit l'acidimétrie directe soit le plus souvent l'acidimétrie en retour : dissolution du résidu dans un excès d'acide titré et dosage en retour de l'excès d'acide par une base de titre connu en présence d'un indicateur coloré. Dans le cas contraire on peut recourir à la photométrie en milieu non aqueux comme les bases faibles.

Quant au dosage d'un constituant ou d'un groupe de constituants dans une drogue déterminée, on utilise des techniques spectrophotométrique, colorimétrique, fluorimétriques, densitométrique.

Les techniques spectrophotométriques sont très sensibles et assez fréquemment préconisées, exemple : dosage des alcaloïdes de genre quinine et cinchonine par mesure de l'absorbance à deux longueurs d'onde. Si le dosage ne peut se faire directement, il est possible de séparer le composé à doser par chromatographie et de procéder à la mesure de l'absorbance après élution des tâches. Les techniques colorimétriques peuvent également être appliquées au dosage d'un alcaloïde ou d'un groupe d'alcaloïdes. La technique la plus avantageuse demeure la HPLC qui supplante ces méthodes « classiques » (Bruneton, 2009).

Les méthodes de dosage classiques sont le plus souvent, colorimétriques ou Spectrophotométriques. L'HPLC offre maintenant la possibilité d'une estimation rapide et précise de tous les flavonoïdes, Nous les détaillons ci-dessous :

3.1.1. Dosage volumétrique :

Il met à profit le caractère basique des alcaloïdes ; on traite le résidu d'alcaloïdes totaux par une quantité connue et en excès d'acide titré et on détermine l'excès d'acide par une solution de base titré ; on en déduit la quantité d'acide nécessaire pour neutraliser les alcaloïdes.

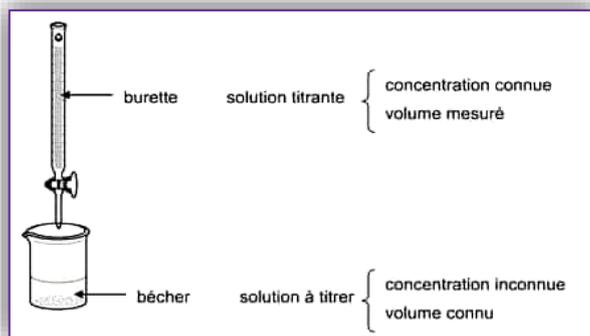


Figure 45 : Technique de dosage volumétrique

Le dosage volumétrique est une technique où la concentration d'une solution inconnue est déduite de la mesure d'un certain volume d'une autre solution de concentration connue.

Appelons A l'espèce chimique dont on recherche la teneur dans une solution de concentration inconnue CA . Lors d'un dosage volumétrique, pour déterminer CA , on provoque une réaction chimique entre le composé A et un autre composé B : cette réaction doit être totale.

En pratique, on introduit progressivement des quantités croissantes d'une solution du composé B de concentration CB connue, dans un volume VA connu de la solution de A, cela jusqu'à ce que toutes les molécules de A soient consommées. Lorsque la quantité de B versée correspond exactement à ce qu'il fallait introduire pour que toutes les molécules de A aient disparu, on dit que l'on a atteint l'équivalence du dosage. Le volume de solution de B versé pour atteindre l'équivalence Ve , s'appelle le volume équivalent. La concentration CA se déduit alors de la relation de bilan associée à la réaction du dosage.

3.1.2. Dosage colorimétrique

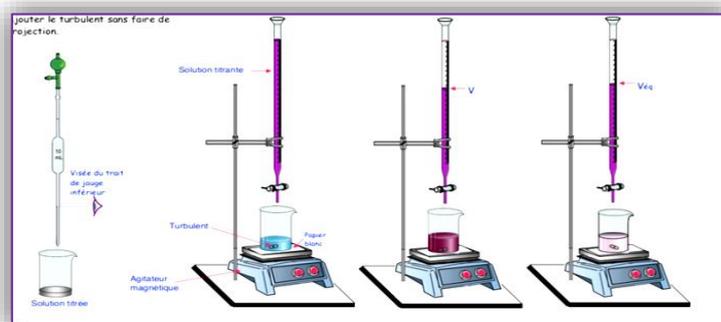


Figure 46 : Technique de dosage colorimétrique.

Le dosage colorimétrique consiste les étapes suivantes :

- ❖ Prélevé le volume de solution à titrer.
- ❖ Ajouter un indicateur coloré.
- ❖ Placer le bécher préparé précédemment sur l'agitateur magnétique puis mettre l'agitation en route.
- ❖ Verser lentement la solution titrant jusqu'à changement de couleur, noter le volume V versé.
- ❖ Recommencé le titrage depuis le début verser rapidement la solution titrant jusqu'à V-2 ml repérer l'équivalent à la goutte près.

3.1.3. Dosage spectrophotométrique :

Le dosage par la méthode spectrophotométrique décrite par (Sreevidya et Mehrotra ,2003). Une quantité de 5mL de solution d'extrait a été prise, et le pH a été maintenu entre 2 et 2,5 avec du HCl dilué. 2mL du réactif de Dragendorff y est ajouté et le précipité formé a été centrifugé. On a vérifié la précipitation complète du centrifugat en y ajoutant du réactif de Dragendorff. Le mélange centrifugé a été décanté complètement. Le précipité a été lavé avec de l'alcool.

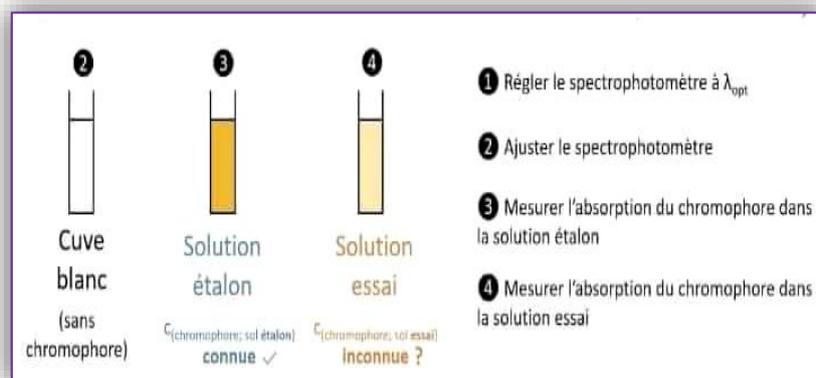


Figure 47 : Dosage par spectrophotométrique

Le filtrat a été jeté et le résidu a ensuite été traité avec 2mL de solution de sulfate disodique. Le précipité noir brunâtre formé a ensuite été centrifugé. L'achèvement de la précipitation a été vérifié en ajoutant 2 gouttes de sulfate de disodium. Le résidu a été dissout dans 2mL d'acide nitrique concentré, avec réchauffement si nécessaire. Cette solution a été

diluée à 10mL avec de l'eau distillée. Puis 1mL de cette solution diluée a été prélevé et 5mL de solution de thio-urée y ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 435nm.

La courbe d'étalon été réalisée à partir d'une solution mère d'atropine à 10mg/L avec une gamme allant de 0 à 1mg/mL.

Les absorbances ont été lues au spectrophotomètre à 435 nm contre le tube blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant le mélange par l'eau distillée.

Les teneurs en alcaloïdes des extraits (organes et milieu de culture liquide) ont été évaluées à partir de la droite de régression linéaire et exprimées en gramme équivalent d'atropine pour 100g de poudre ou 100mL de milieu liquide.

3.1.4. Dosage pondéral :

Le dosage gravimétrique ou Analyse pondéral est une méthode d'analyse qui utilise la masse. Elle peut permettre de trouver soit la nature d'un composé (par la quantité de l'un de ses ions), soit la quantité d'une substance dans un mélange. Le principe est de faire réagir chimiquement l'ion, l'élément ou le composé dont on veut connaître la teneur dans l'échantillon, selon le cas, ce peut être la masse du produit ou la différence de masse de l'échantillon qui après calculs, permettront de déterminer la teneur ou la nature de produit. Le doseur pondéral permet de doser de 3 façons :

- ✚ Doseur gravimétrique par perte de poids : Il effectue une dose en contrôlant la perte de poids du doseur.
- ✚ Doseur gravimétrique par gain de poids : effectue une dose en contrôlant la pesée du contenant en aval du doseur.
- ✚ Doseur gravimétrique continu : il dose en continu en régulant la vitesse du doseur en fonction de la perte de poids du doseur pour obtenir un débit constant.



CHAPITRE IV :
ACTIVITES BIOLOGIQUES

1. Activité Antioxydante :

1.1. Définition d'un radical libre :

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta, 2003**).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène.

Les autres radicaux libres, dits radicaux libres secondaires (radical peroxy ROO^\bullet et radical alkoxy RO^\bullet), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Novelli, 1997**).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde O_2^\bullet , radical hydroxyl OH^\bullet , monoxyde d'azote NO^\bullet , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet, peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxydinitrite ONOO^- (**Favier, 2003**).

1.2. Les antioxydants :

La production de radicaux libres est contrebalancée par des systèmes antioxydants assurant le maintien de l'état biologique. De nombreuses situations peuvent entraîner l'apparition en excès de ces espèces chimiques. Les agents anti-radicalaires sont des capteurs de radicaux qui agissent avec eux plus vite que ne ferait le substrat à protéger ou interrompre les chaînes de réaction radicalaires (**Diplok, 1991**).

1.2.1. Définition d'un antioxydant :

Le terme antioxydant désigne une substance qui, ajoutée à faible dose à une substance, et il est capable d'empêcher l'action d'oxygène, si la réaction se fait spontanément à l'air. Elle interfère sur le processus normal d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel cette oxydation aura produit des odeurs indésirables et une détérioration décelable (**Knox et Dodge, 1985**).

Toutefois, pour être efficace, les antioxydants doivent être additionnés le plus tôt possible dans le processus de fabrication. Ils ne peuvent en effet inverser la réaction d'oxydation, mais seulement la ralentir ou la stopper (**Murase et al, 1993**).

1.2.2. Classification des antioxydants :

1.2.2.1. Les antioxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (**Lisu et al, 2003**).

Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (**Yu et al, 2000**). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatiques (**Barlow, 1990**).

❖ Le Butylhydroxyanisole (BHA):

C'est un produit qui n'existe pas dans la nature mais on le synthétise avec la méthode de butylation du paraméthoxyphénol. BHA ayant deux formules (figure 01), parmi les importantes caractéristiques de ces produits est la possibilité de résister même à la chaleur, par exemple le cas des fritures, c'est pour cette cause, certains pays permettent son ajout avec une concentration ne dépassant pas 200 ppm (**Gunckel et al, 1998**).

❖ Le Butylhydroxytoluène (BHT):

Ce produit n'existe pas dans la nature, on le fabrique pour ses utilisations dans les produits pétroliers comme l'élastique et aussi son utilisation dans les produits alimentaires.

BHT est un produit net de couleur blanche (figure 01), il est sous forme d'une matière cristallisée qui n'a pas d'odeur, il ne se dissout pas dans l'eau, il se dissout dans d'autres solvants organiques (Hammerich *et al*, 1990).

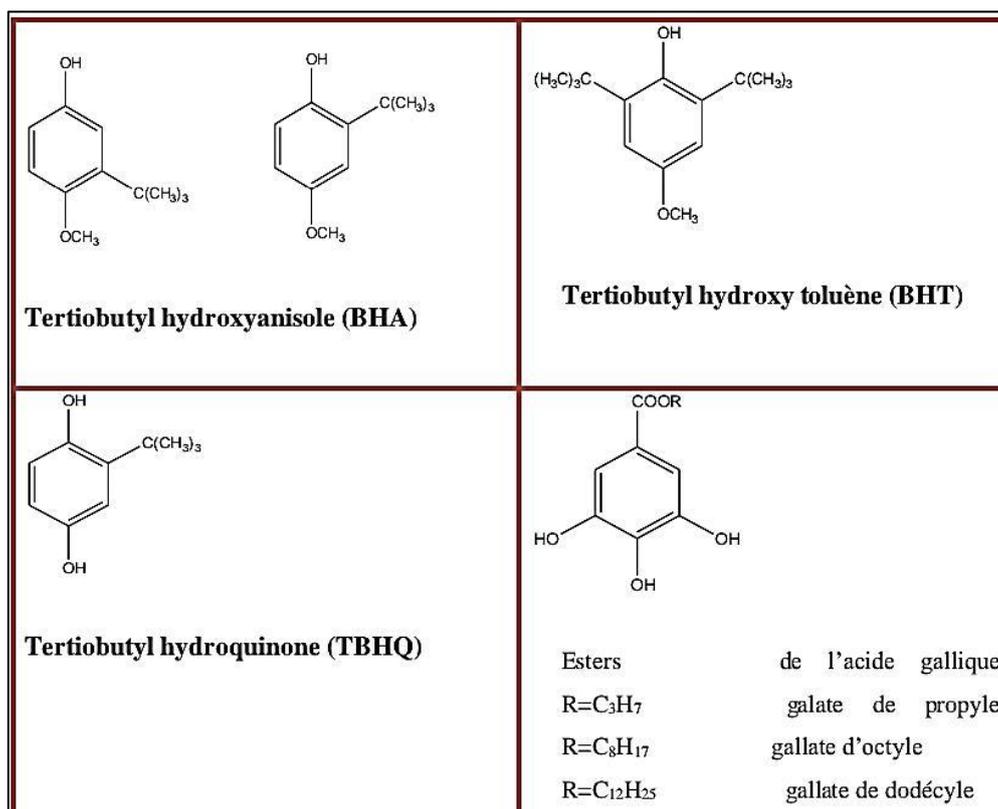


Figure 48 : Quelques antioxydants synthétiques.

1.2.2.2. Les antioxydants naturels :

L'utilisation empirique d'antioxydants naturels est une pratique très ancienne. La recherche de nouveaux antioxydants naturels, reconnaît depuis ces dernières années une très grande importance, car les antioxydants synthétiques actuellement utilisés, notamment le BHT et le BHA ne seraient pas dépourvus de toxicité.

Les multiples atouts santé des fruits et légumes sont liés à leur faible teneur calorifique, à leur richesse en fibres, minéraux, vitamines et autres micronutriments. Certains de ces micronutriments, apparaissent de plus en plus clairement comme essentiels en participant à la protection de notre organisme contre les cancers, les maladies cardio-vasculaires et les autres

maladies dégénératives. C'est le cas des antioxydants dont les fruits et légumes constituent l'une des principales sources alimentaires. L'homme ingère avec ses aliments environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine c'est 100 fois plus que caroténoïdes ou vitamine et l'on estime que les fruits et légumes contribuent pour la moitié à ces apports (Cuendet, 2000).

a) Les vitamines:

- ❖ La vitamine C ou l'acide ascorbique : C'est un puissant réducteur. Elle joue un rôle important dans la régénération de la Vitamine E.
- ❖ La vitamine E ou tocophérol : prévient de la peroxydation des lipides membranaires in vivo en capturant les radicaux peroxydes (Athmania, 2009).

b) Les éléments minéraux:

Plusieurs éléments minéraux ont été reportés dans les baies et les graines d'argousier, parmi lesquels au moins vingt-quatre sont présents dans le jus tels que l'azote, le Phosphore, l'aluminium, le calcium, le fer, le bore, le manganèse...

- ❖ **Le Fer** : Est un anti-oxydant puissant qui joue un rôle protecteur au niveau des systèmes Cardio-vasculaires et il est indispensable au cerveau. Il agit également sur le foie, les Muscles et même sur la production des spermatozoïdes. Cet oligo-élément est votre allié contre le stress, le cancer, les maladies cardio-vasculaires et il stimule le système Immunitaire et protège les yeux de la cataracte. Il prévient le vieillissement général de L'organisme et neutralise les toxines et les radicaux libres.
- ❖ **Le zinc**: C'est un minéral qui a un rôle très important pour notre système immunitaire, le système nerveux, la sexualité, l'état général, la fertilité. Aliments riches en zinc : Foie, Soja, crustacés, coquillages, viandes, germe de blé, pain complet, jaune d'œuf, amandes, Noix, noisettes (ATHmania, 2009).

2. Étude de l'activité antifongique :

Un champignon phytopathogène, à savoir : *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (FOL) souche 4287, sera testé pour son fongitoxicité en évaluant l'inhibition de la croissance mycélienne des agents phytopathogènes.

L'activité inhibitrice des différents composés, sur la croissance du mycélium des agents phytopathogènes, est déterminée en mesurant la croissance radiale du champignon sur milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar), contenant le complexe à tester. Ainsi, un volume de 1 ml de solution de DMSO contenant 5 mg du produit Lyophilisé a été ajouté à 100 ml de milieu PDA à 60 ° C, préalablement stérilisé, puis réparti dans 4 boîtes de Pétri. De même, 1 ml de DMSO a été ajouté à 100 ml de milieu PDA, et a été considéré comme un contrôle positif.

Le contrôle négatif contient le milieu PDA sans aucun autre produit (**Song *et al.*, 2004**). Expérimentalement, un disque de 5 mm de diamètre est prélevé sur une jeune culture fongique et est déposé aseptiquement au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA et le produit à tester. L'expérience est répétée 4 fois pour chaque traitement. Après 6 jours d'incubation à 25°C, croissance mycélienne de l'agent phytopathogène est mesurée sur une échelle millimétrique. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance de chaque champignon par chaque produit par rapport aux diamètres moyens des colonies de chaque champignon cultivé en milieu témoin. Ainsi, l'activité d'inhibition a été exprimée en

Pourcentage et a été calculée selon la formule (**Dennis *et al.*, 1971**) :

$$I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Où I = taux d'inhibition en %

C = croissance radiale de l'agent phytopathogène en mm sur milieu PDA avec DMSO (contrôle).

T = croissance radiale, en mm, de l'agent phytopathogène sur milieu PDA contenant le complexe à tester.

Pour identifier la plus faible concentration inhibitrice, le test a été répété avec 2,5 mg / ml, 1,25 mg / ml, 0,625 mg / ml et 0,312 mg / ml de solvant au lieu de 5 mg / ml de solvant. Si le même résultat a été obtenu, cela signifie que la concentration seuil peut être plus faible.

2.1. Définition de l'antifongique :

Les antifongiques (ou antifungiques) tirent leur nom du latin fungus qui signifie champignons. Ce sont donc des médicaments capables de traiter les mycoses, c'est-à-dire les infections provoquées par des champignons microscopiques.

2.1.1. Comment agissent les antifongiques ?

Un antifongique agira :

- ✓ Soit en s'attaquant directement à la paroi fongique, provoquant ainsi la mort de la cellule (Action fongicide).
- ✓ Soit en bloquant la division cellulaire, arrêtant ainsi la reproduction des champignons (Action fongistatique).

2.1.2. Généralité sur le champignon étudié :

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin *et al.*, 2000). Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des Saprophytes (Leveau et Bouix, 1993).

Parmi les champignons, agents de maladies vasculaires, ceux appartenant au genre *Fusarium*, sont les plus fréquents et dommageables pour les cultures (Messiaen *et al.*, 1991). De toutes les espèces du genre *Fusarium* que l'on rencontre dans le sol, c'est l'espèce *F.oxysporum* qui est la plus répandue. L'identification des espèces *Fusarium* est assez difficile, elle est basée sur la morphologie des spores asexuées (Fisher *et al.*, 1982).

2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique :

L'activité Antifongique des différents extraits de plantes sur la croissance des levures été évaluée par :

2.2.1. Technique de macrométhode en milieu liquide :

Selon les recommandations de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory standards) M38P pour les levures. Dans des tubes à hémolyse contenant 200 μ l de la suspension fongique mère, préalablement préparée et ajustée à 2.10^3 Levures/ mm^3 , on ajoute 10 μ l de l'extrait de plante (EP) à tester puis Homogénéisée au mixeur Vortex. Ensuite on ajoute 10 μ l de DMSO 10% puis une deuxième homogénéisation est effectuée. Enfin, les tubes sont complétés par la quantité suffisante de sérum glucosé 5% pour avoir un volume final de 1 ml pour chaque tube.

Le screening des extraits a été réalisé sur *C. albicans* 5 par addition de 10 µl d'EP à 2 ml de la suspension fongique mère. Les témoins négatifs ont été préparés par ajout des souches testées aux milieux adéquats sans EP. Le comptage des tubes témoins s'est fait à l'aide de la cellule de Malassez pour déterminer le nombre de levures/mm³ à T₀. Chaque test a été réalisé deux fois dans les mêmes conditions expérimentales et les résultats indiqués représentent la moyenne de ces deux tests.

L'ensemble des tubes à hémolyse, hermétiquement fermés, sont incubés à 37°C pendant 48 heures sous agitation continue en utilisant l'agitateur à plaques ELISA qui réalise des secousses vibratoires réglées à une fréquence de 1350 tours/min (**De Feo V et al, 2002**). Après 48h d'incubation à 37°C, chaque tube est homogénéisé au mixeur Vortex puis le nombre de levures est déterminé par comptage à la cellule de Malassez. Ils sont considérés comme efficaces, les extraits dont le taux d'inhibition est supérieur à 80%. Le taux d'inhibition (TI) est calculé comme suit :

$$TI(\%) = \frac{1 - (T_{48 \text{ extrait}} - T_0)}{(T_{48 \text{ témoin}} - T_0)} \times 100$$

Où : T₀ est le nombre de levures dans le tube Témoin à temps zéro.

T₄₈ témoin : est le nombre de levures dans le tube témoin après 48H d'incubation

T₄₈ extrait : égale au nombre de Levures dans le tube avec extrait testé après 48h d'incubation (**Hochedez, 2007**).

2.2.2. Technique de macrodilution en milieu liquide :

200 µl de l'HE à tester sont placés dans un tube Eppendorf contenant 200 µl de DMSO A 10% puis homogénéisés au mixeur Vortex. Une dilution en cascade de demi en demi est effectuée dans le DMSO à 10%, de manière à obtenir une gamme de concentration décroissante en HE (**Ascioglu et al, 2002**). A partir des différents tubes de la gamme, nous prélevons 20µL qu'on rajoute à 200µl d'inoculum fongique, de densité équivalente levure à 2.10³ levures.mm-3, distribués dans une série de Tubes à hémolyse. Après homogénéisation au Vortex, les tubes sont complétés par la quantité suffisante de sérum glycosé 5% pour avoir un volume final de 1 ml pour chaque tube.

Un témoin de la croissance fongique, pour lequel 200 µl de l'inoculum ont été additionnés de 800 µl du Sérum glycosé 5%, est également préparé. L'ensemble des tubes à

hémolyse, hermétiquement fermés, sont incubés à 37°C pendant 48 heures sous agitation continue en utilisant l'agitateur à plaques ELISA. Après incubation, les tubes sont quantifiés à la cellule de Malassez puis le taux d'inhibition de chaque concentration de la gamme est calculé. La CMI de l'HE testée est alors déterminée comme étant la faible concentration en HE capable d'inhiber à plus de 90% la croissance du champignon étudié (**Hay R,1999**).

3. L'activité anticoagulante :

La coagulation est un processus complexe au cours duquel le sang liquide forme un caillot gélatineux. (**Athukorala et al., 2007**). Dans les conditions physiologiques normales, la coagulation est activée lors d'une brèche vasculaire, pour consolider l'agrégat plaquettaire afin de colmater la brèche et arrêter le saignement du sang (**Gentry, 2004, Revel et al, 2004**). La formation de ce caillot fibrineux est réalisée par deux voies, la voie endogène ou intrinsèque et la voie exogène ou extrinsèque, toutes deux aboutissant à l'activation du facteur X, une étape commune aboutit ensuite à la formation de thrombine, une sérine protéase qui catalyse la transformation de fibrinogène en fibrine insoluble (**Colvin , 2004**). Les deux voies impliquant des facteurs de coagulation qui sont des glycoprotéines dont la plupart sont des enzymes protéolytiques, type sérine protéase qui circulent dans le sang à l'état de zymogène. Ces systèmes enzymatiques sont régulés par des coenzymes ou catalyseurs, des réactions de control rétro-actif positives ou négatives et des inhibiteurs physiologiques (antithrombin III, protéine C et protéine S) (**Meriane, 1991**).

3.1. Voie endogène :

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(Hageman) lors de ce contact aux structures électronégatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycosaminoglycanes), une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-Kallikréine en Kalikriéine 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. Ce dernier se lie à la surface des phospholipides anionique des plaquettes (F₃P) par l'intermédiaire des ions de calcium et forme en présence de son cofacteur, le facteur VIII le complexe Tenase qui est responsable de l'activation du facteur X (**Colvin, 2004 ; Vogler et al, 2009**).

3.2. Voie exogène :

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 sou-endothéliale. 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 (**Caquet R, 2004**).

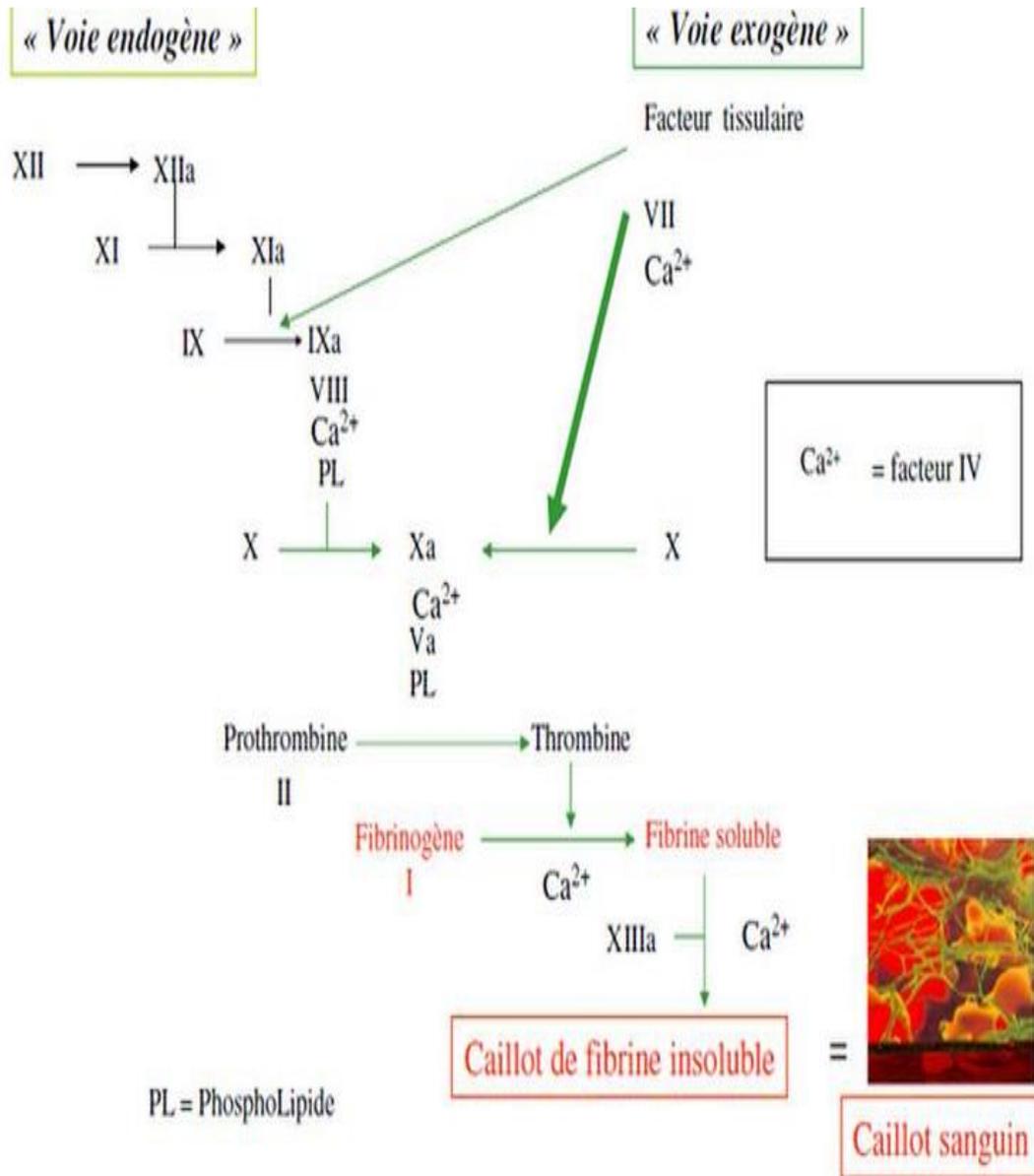


Figure 49 : La cascade de la coagulation dans la voie endogène et la voie exogène

(Gentry, 2004), (Vogler, Siedlecki , 2009)



PARTIE 2 :
ÉTUDE EXPERIMENTALE



CHAPITRE I :
ÉTUDE QUANTITATIVE

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériel végétal :

La plante *Ocimum Basilicum* L. a été récoltée à maturité durant le mois de janvier 2022, dans la région Chelghoum Laid Wilaya de Mila, qui se trouve à 50 km au sud-ouest de Constantine (36° 10' 00" nord, 6° 10' 00") est à climat continental semi-aride (Figure 02). Les parties aériennes (tiges et feuilles) ont été séchées pendant 1 mois (30 jrs) à l'obscurité, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante. Après séchage, les deux parties sont broyées à l'aide d'un moulin électrique en poudre très fine.

L'ensemble des manipulations de cette partie ont été effectués dans les laboratoires de graduation biologie du centre universitaire Abd el Hafid Boussouf de Mila.



Figure 50 : La plante *Ocimum Basilicum*.L
(Photo originale)

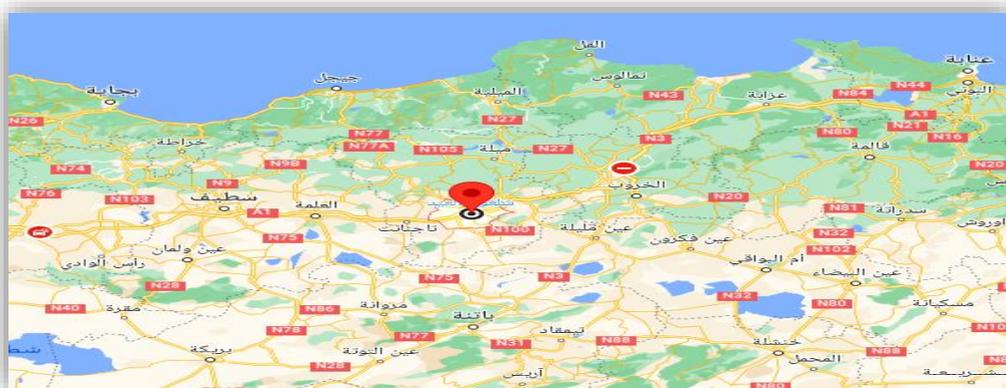


Figure 51 : Localisation géographique de la zone de récolte (Chelghoum laid, wilaya de Mila) (<https://www.google.com/maps>)



Figure 52 : A / Plante fraîche, B / Poudre fine de la plante (*Ocimum Basilicum.L*)
(Photo originale.2022)

1.2. La macération

La macération est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un corps solide par dissolution dans un liquide froid (eau, huile, alcool, saumure...). La macération peut aussi être employée pour que le corps solide absorbe le liquide et en soit parfumé (Anne- cécile, 2017).

L'extraction solide/liquide selon la méthode de (Bruneton, 1993) (L'eau distillée et le méthanol 20/80) est effectuée pour extraire la majorité des composés de différentes parties de l'*Ocimum*, par l'utilisation des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

1.2.1. Préparation de l'extrait hydrométhanolique :

La préparation consiste à introduire une quantité de la poudre végétale dans un erlenmeyer avec un mélange de méthanol-eau distillée (80 :20). Après agitation manuelle quelque minutes, on laisse le mélange à une température ambiante pendant 72 heures (3jours).

La macération hydrométhanolique obtenue est soumise à une filtration, cette partie est répétée 4 fois (chaque fois dure 24 heures), afin d'extraire le maximum de produits contenus dans la plante.

Ensuite, l'évaporation à sec d'extrait obtenu à l'aide d'un rotavapeur (type BUCHI) à 60°C.

Enfin, la pesée d'extrait brut et le calcul du rendement. Puis, la décantation pendant une nuit après traitement avec une quantité d'eau distillée. Et faire une filtration pour l'obtention d'une solution aqueuse.

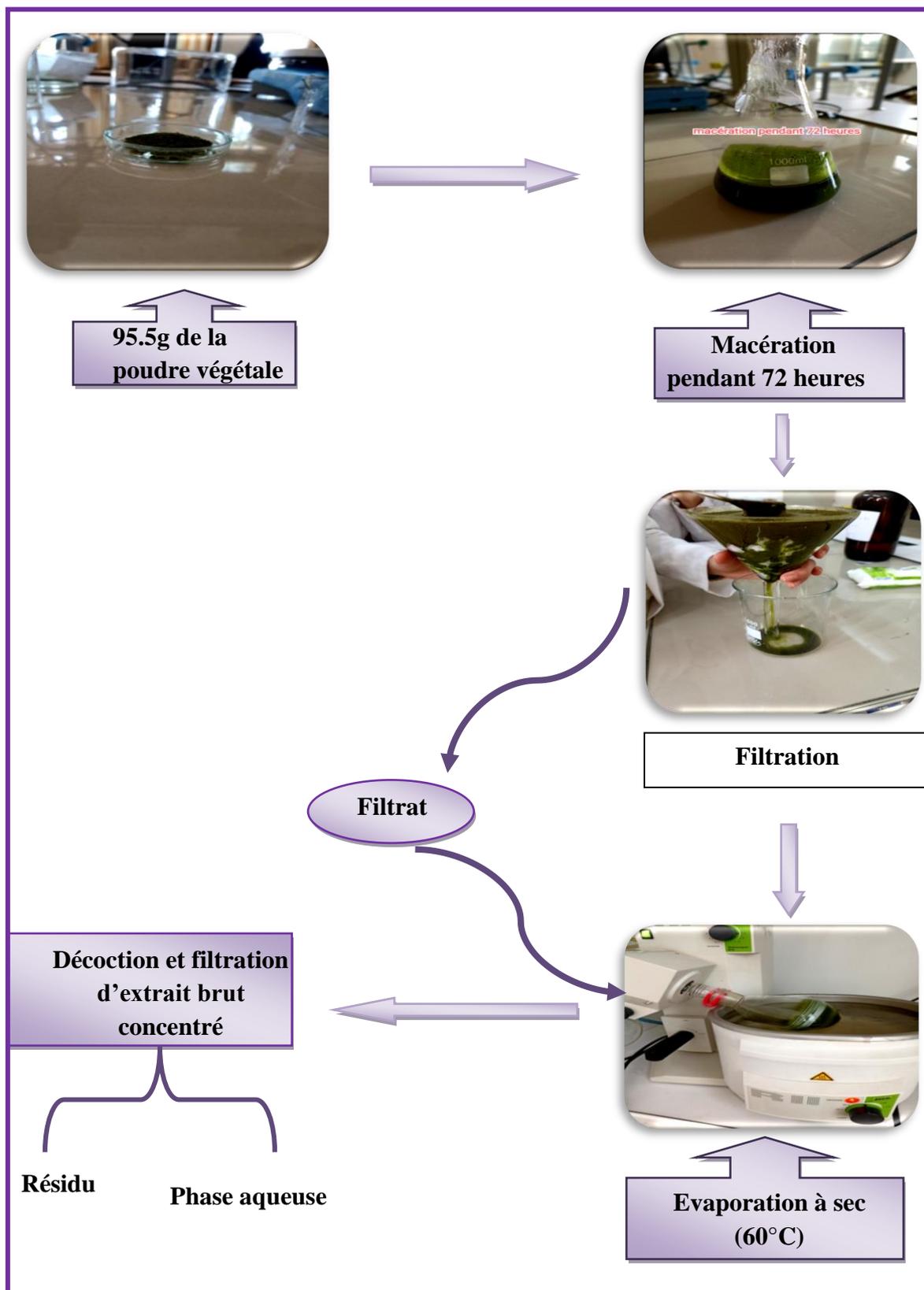


Figure 53 : Etapes d'extraction de la plante *O. Basilicum.L.* par macération

1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux :

La préparation de l'extrait aqueux a été réalisée selon les étapes suivantes :

Ajouter du matériel végétal a une quantité suffisante de l'eau distillé puis chauffer le mélange jusqu'au l'ébullition pendant 10 minutes, et laisser refroidir pendant 24 heures, après répéter l'extraction trois fois, suivi par l'évaporation à sec d'extrait obtenu à l'aide d'un rotavapeur (type BUCHI) à 60°C. Ensuite, peser d'extrait brut et le calcul du rendement et décanter pendant une nuit après traitement avec une quantité d'eau distillée, enfin, faire une filtration pour l'obtention d'une solution aqueuse.

1.3. Fraction liquide-liquide :

L'extraction liquide-liquide est basée sur la distribution d'un soluté entre deux solvants en fonction de sa solubilité dans chacun d'entre eux (**Alvarez, 2010**).

L'extraction liquide-liquide est une technique de séparation largement utilisée à l'échelle industrielle, dans des domaines aussi variés que l'hydrométallurgie classique, l'industrie nucléaire, la pétrochimie, l'industrie pharmaceutique ou encore l'industrie agroalimentaire. Bien que le principe de cette technique soit relativement simple, les séparations qu'elle permet de réaliser sont en réalité le résultat de la conjonction d'un grand nombre de phénomènes physico-chimiques (**Gérard, 2017**).

1.3.1. Mode Opérateur :

Au laboratoire de travaux pratiques, on travaille sur des volumes de solution à extraire de l'ordre de la centaine de mL au plus. On utilise pour cela une ampoule à décanter de 1000 mL, en utilisant quatre solvants organiques de polarités différentes : l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol selon le protocole d'extraction résumé dans l'organigramme présenté ci-dessous :

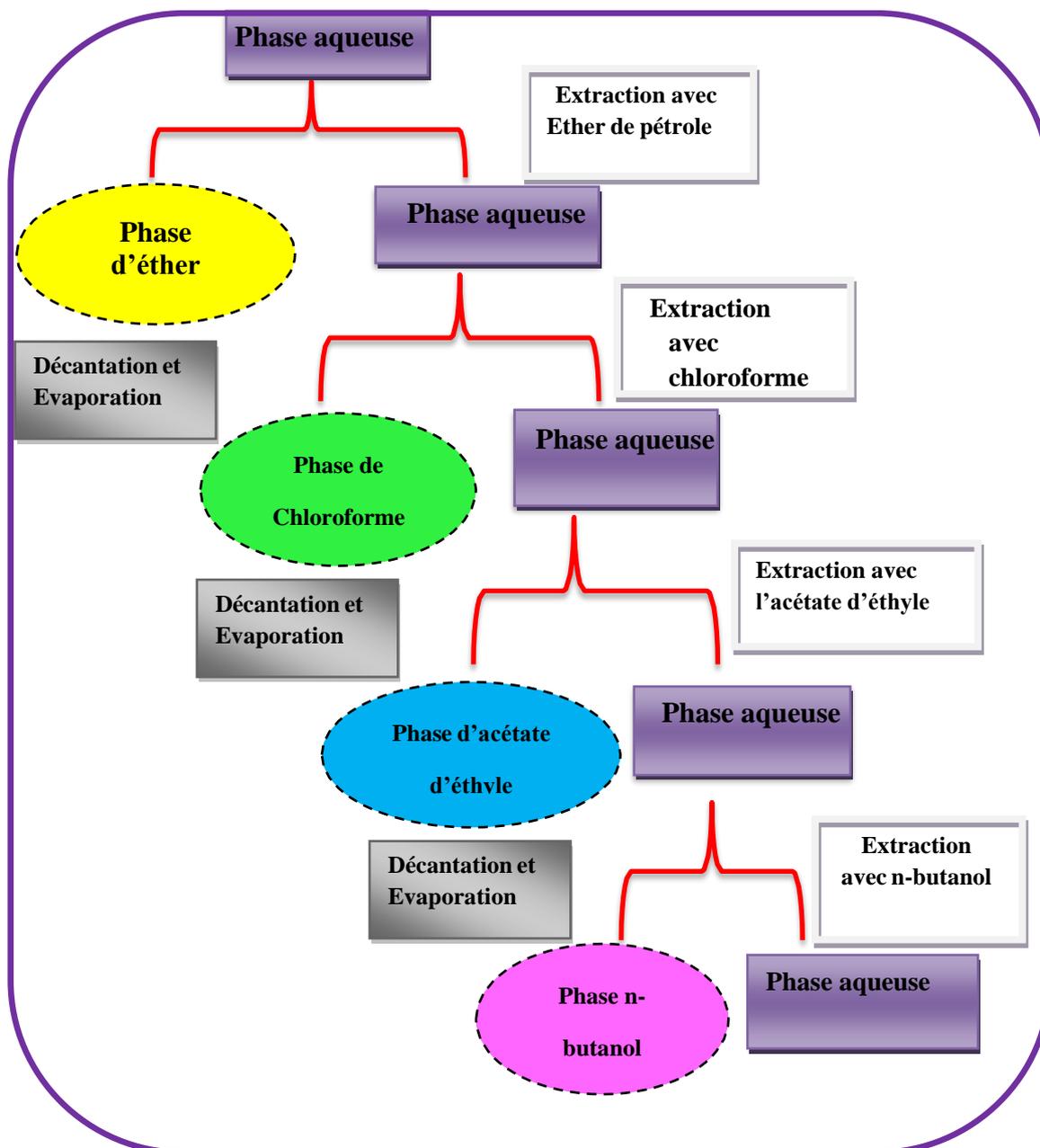


Figure 54 : Protocole d'extraction liquide-liquide de l'*Ocimum basilicum* L

Les quatre phases organiques récupérées sont évaporées sous pression au moyen d'un évaporateur rotatif (type BUCHI) et pesées pour calculer le rendement de chaque phase.

Après l'évaporation et le calcul de rendement, les phases (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol) sont dissoutes dans une quantité de méthanol.

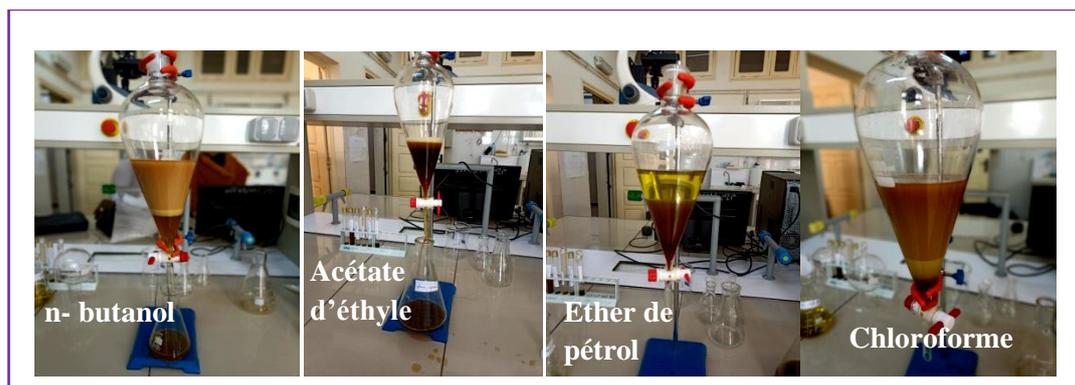


Figure 55 : L'extraction liquide-liquide de l'extrait brut.

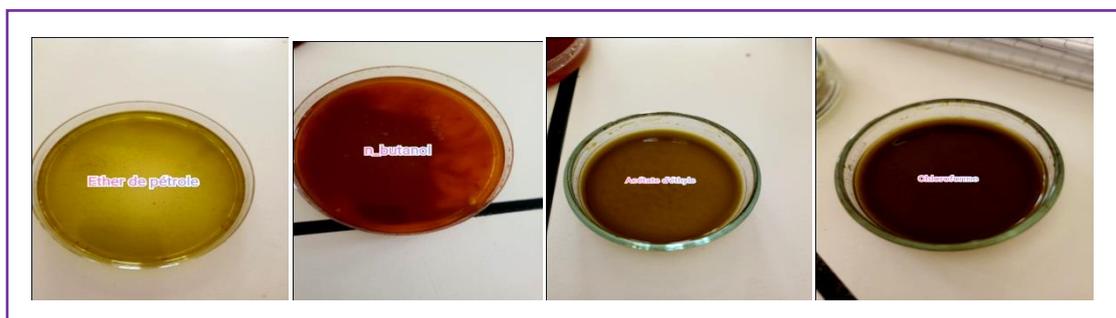


Figure 56 : Les quatres phases dissout dans le méthanol

2. Résultats et discussion

Les rendements sont extraits obtenus sont calculés selon la formule suivante :

$$R = \frac{m_{ext}}{m_{éch}} \times 100$$

Où : **R** : est le rendement %.

m_{ext} : est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg.

m_{éch} : est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

2.1. Les extraits méthanolique et aqueux :

Tableau 09 : Le rendement de l'extrait brut

Extrait	L'extrait hydrométhanolique		L'extrait aqueux
Aspect du matériel végétal	Poudre moitié fine (Lehdjazi et Tikouane, 2021)	Poudre très fine	Poudre moitié fine
La masse du matériel végétal	100g	100g	100g
Masse de l'extrait Obtenus	20,69g	13,14g	11,1g
Rendement	20,69%	13,14%	11,1%

➤ Le résultat s'exprime sous-dessus.

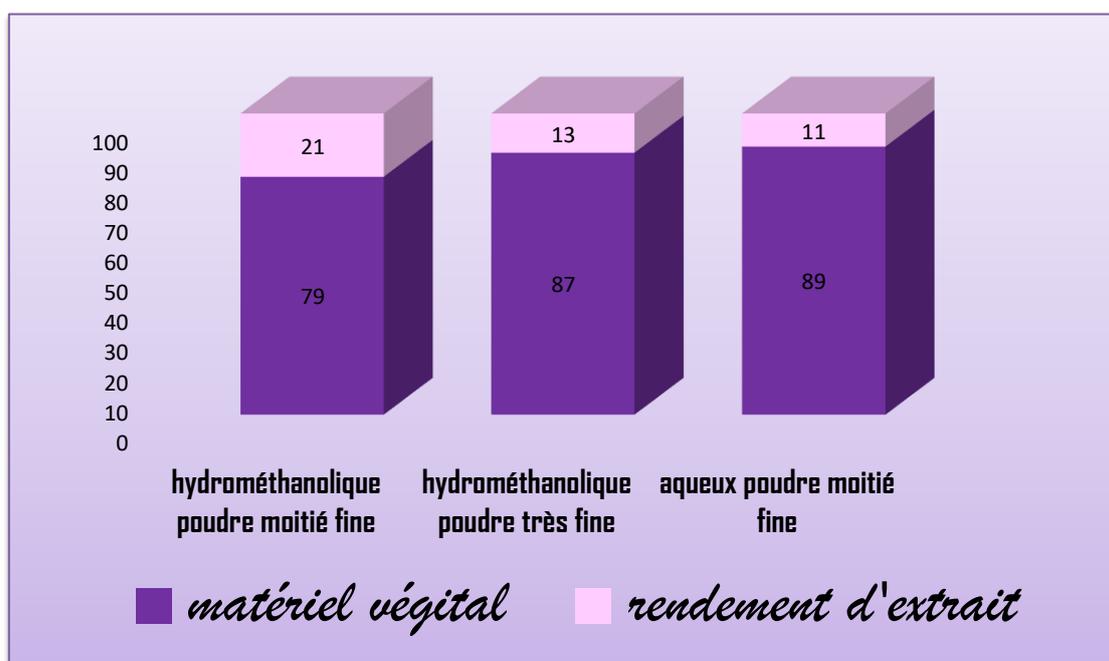


Figure 57 : Histogramme des rendements d'extrait brut.

2.2. Discussion :

L'opération de l'extraction par macération de la poudre très fine de la partie aérienne de la plante étudiée *O. Basilicum L* avec méthanol- eau distillée permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brut avec un rendement de 13,14%.

Ce taux est inférieur à celui trouvé par (**Lahdjazi et Tikoudane, 2021**) qui ont trouvent un rendement de 20,69% La taille du matériel végétal étudié intervient sur la valeur du rendement ; on remarque que la poudre très fine absorbe le solvant comme éponge, il nécessite donc une quantité très importante de solvant pour arriver à une valeur maximale du rendement.

Le rendement de l'extrait hydrométhanolique est plus élevé que l'extrait aqueux, malgré le chauffage, le solvant alcoolique reste le meilleur pour extraire la majorité des composés de la plante au cause de la polarité du l'alcool.

Tableau 10 : Les rendements, couleur et aspect des différentes fractions.

Fraction	Couleur	Masse(g)	R (%)
Ether de pétrole	Jaune foncé	0.51 g	3,8%
Chloroforme	Vert foncé	1.13 g	8,5%
Acétate d'Ethyle	Marron	0.21 g	1,59%
n- butanol	Marron foncé	5.69 g	43,30%

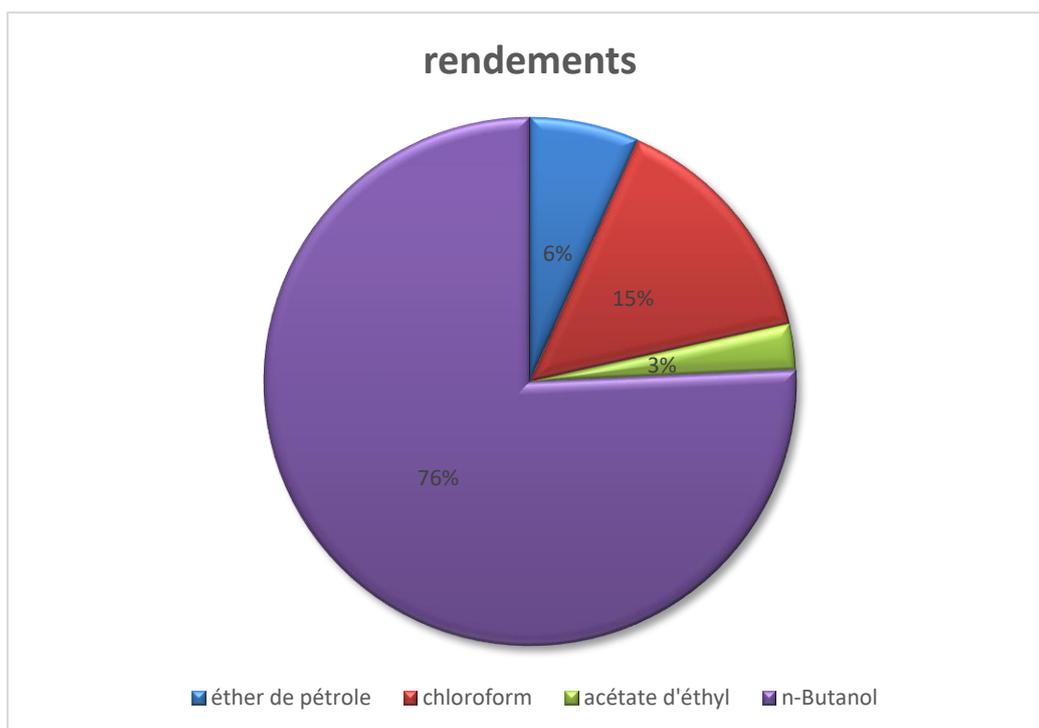


Figure 58 : Diagramme circulaire des rendements des fractions.

L'extraction liquide-liquide repose sur la répartition sélective des composés contenus dans l'extrait hydrométhanolique retenu selon leur solubilité entre les phases organiques utilisés. Nous constatons que la majeure partie des composés de l'extrait hydrométhanolique d'*O. basilicum* L ont tendance à se retrouver dans la fraction N-butanol, dont les taux d'extraction atteignent une moyenne de (43,30%), suivi par chloroforme (8,5%), puis la fraction d'éther du pétrole (3,8%), et finalement la fraction d'acétate éthyle (1,59%).



CHAPITRE II :
ÉTUDE QUALITATIVE

1. Matériels et Méthodes :

1.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique représente l'ensemble des techniques qualitatives permettant la détermination des différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques (métabolites secondaires). Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais les principaux sont les polyphénols y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les tannins les alcaloïdes, les saponines, les stéroïdes ... (**Lendvaib Zelles et al., 2002**). Les tests phytochimiques selon le protocole suivant :

1.1.1. Détection des Quinones libres :

1 gramme de poudre végétal sec est placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés et concentrés au rotavapeur. La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1%, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (**Dohou, 2004**).

1.1.2. Détection des composés réducteurs :

On ajoute 2 ml d'H₂O et 1 ml d'extrait aqueux puis 20 gouttes de liqueur de Fehling avec chauffage au bain marie, l'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (**Trease et Evans, 1987**).

1.1.3. Détection des glycosides cardiaques :

2 ml de l'extrait aqueux a été dissous dans 2 ml de chloroforme puis l'acide sulfurique concentré H₂SO₄ (95%) a été ajoutée avec précaution pour former une couche rougeâtre foncée. L'apparition d'une coloration brune à l'interface de l'anneau indique la présence de glycoside cardiaque (**Mibindzou Mouellet A, 2005**).

1.1.4. Détection des Tanins :

Dans un tube à essai, on ajoute 1 ml d'extrait aqueux avec 1 ml H₂O et 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ (1%), la présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre (tanins catéchiques) ou bleu-noirâtre (tanins galliques) (**Douhou et al, 2003**).

1.1.5. Détection des alcaloïdes :

Les alcaloïdes ont été mis en évidence par le réactif de Wagner (réactif de précipitation composé de 2g d'iodure de potassium KI + 1,27g d'iodure I₂+100 ml d'eau distillé) ; 1ml de l'extrait aqueux est mis dans un tube à essai puis, on y ajoute quelques gouttes de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité rouge orangé ou brun rougeâtre indique la présence des alcaloïdes (**Vijay et al., 2013**).

1.1.6. Détection des Flavonoïdes :

10 gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium sont ajoutés à 1 ml de l'extrait aqueux. La coloration rose-rouge ou jaune, après trois minutes d'incubation à température ambiante, indique la présence des flavonoïdes (**Chaouche et al., 2011**).

1.1.7. Détection des Mucilages :

Introduire 1 ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai, puis 5 ml d'alcool MeOH est ajouté. L'obtention d'un précipité floconneux après agitation indique la présence de mucilages (**Awor et Samseny , 2003**)

1.1.8. Détection des saponines :

Les saponines sont caractérisées par un indice de mousse il suffit de mettre en évidence leur pouvoir aphrogène en observant la mousse très fine qui se forme après une simple agitation énergique (pendant 15 secondes) (**Bruneton ,1999**).

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1 à 2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif

On introduit 1 g de poudre végétale dans des tubes à essais on ajoute 10 ml d'eau distillée, puis on chauffe l'extrait au bain marie à 85°C pendant 20 min, après refroidissement on agite manuellement de façon que le tube soit en position horizontale pendant 15 secondes. Après 15 minutes de repos une mousse se développe indiquant la présence des saponines.

1.1.9. Détection des Huiles essentielles :

1 g de matériel végétal a été introduit dans 10 ml de dichlorométhane puis l'extrait a été évaporé à sec. Le résidu a été ensuite dissous dans 3 ml d'éthanol. Puis, la solution a été évaporée à sec de nouveau. La sensation d'une odeur parfumée indique la présence des huiles essentielles (Ilboudo S, *et al*, 2009).

1.2. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM) :

La chromatographie est une méthode physico-chimique qui sert à séparer les différentes substances présentes dans un mélange.

1.2.1. Principe :

La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité. Un mélange de composés est placé sur un support solide (phase stationnaire) plongé dans un solvant (phase mobile) qui se déplace par capillarité le long de la phase stationnaire. La phase mobile va entraîner les composés qui migreront à une hauteur variable en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. On peut ainsi caractériser les composés selon leur Rf. (Abedini, 2013).

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- ✓ **La cuve chromatographique** : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- ✓ **La phase stationnaire** : Une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre ou métallique à l'aide d'un liant comme sulfate de calcium hydraté (plâtre de paris) l'amidon ou un polymère organique.
- ✓ **L'échantillon** : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5%) du mélange à analyser, déposé en un point repère située au-dessus de la surface de l'éluant.
- ✓ **L'éluant** : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de plaque en entraînant les composants de l'échantillon. Au début de l'éluant, on commence par solvant le moins polaire qui entraîne les substances les moins retenues par l'absorbant (les moins polaire). Ensuite on fait varier la composition de l'éluant en additionnant graduellement vers le bas de la colonne.

✓ **Le rapport frontal** : On appelle rapport frontal, RF (ou référence front, coefficient de migration), le rapport suivant : Distance parcourue par le soluté / Distance parcourue par le solvant

$$R_f = \frac{d}{D}$$

- **d** : Distance parcourue par le soluté.
- **D** : Distance parcourue par le front de solvant.

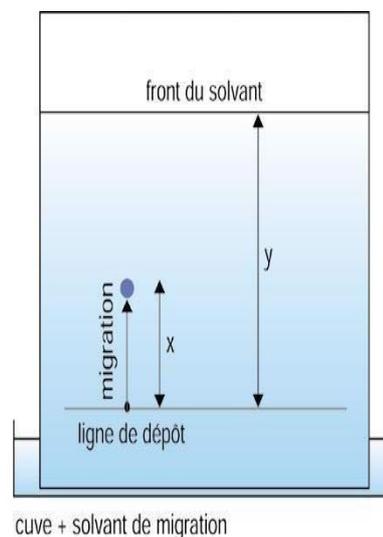


Figure 59 : Schémas d'une plaque CCM (Munier, 1968)

1.2.2. Mode opératoire :

Le criblage phytochimique a été réalisé sur des chromatoplaques (60 F₂₅₄, support-aluminium, 20×20, Fluka-silica gel/DC) suivant les méthodes décrites dans la littérature (Ladigina *et al*, 1983 ; Lhuilier, 2007). Deux systèmes de solvant ont été utilisés en qualité de développement : AME et NBA pour les fractions : éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyl et n-butanol.

1.2.2.1. La préparation des éluants

Pour 10ml de 1^{er} éluant on va mélanger (8 ml d'acétate- d'éthyle, 1.5 ml de méthanol et 0.5ml d'eau) et pour 10ml de 2^{ème} éluant on va mélanger (5ml de butanol et 5ml d'ammoniaque dilué).

- ✓ On verse environ 0,5 à 1 cm d'éluant dans la cuve à chromatographie que l'on referme avec un couvercle de manière à ce que l'éluant sature la cuve en vapeur.
- ✓ On marque par des croix ou des tirés l'emplacement correspondant à l'échantillon à déposer tout on garde un espace de 2cm entre les croix créées

- ✓ A l'aide des tubes capillaires on prélève l'échantillon et on le met sur les croix marquées
- ✓ Plus spécifiquement dans chaque croix on met 5 à 8 gouttes d'échantillon et on fait un séchage à l'air libre après l'ajout de chaque goutte
- ✓ On introduit délicatement et verticalement la plaque dans la cuve à chromatographie et on la ferme
- ✓ On laisse l'éluant migrer par capillarité et on sort la plaque lorsque ce dernier arrive à ~0,5 cm du haut de la plaque en y traçant un nouveau trait appelé front du solvant.
- ✓ On place la plaque sous la lampe UV et on observe l'apparition de différentes taches sur la plaque CCM (**Maxicours, site web**).

2. Résultats et discussion

2.1. Screening phytochimique

Le Screening phytochimique consiste à détecter des métabolites secondaires dans notre extrait par des réactions qualitatives. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette. Selon le screening phytochimique effectuée dans l'extrait aqueux :

- ✓ **Quinones libres** : la présence de la couleur jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.
- ✓ **Composés réducteurs** : la formation d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.
- ✓ **Glucosides cardiaques** : L'apparition d'une couche brune à l'interface de l'anneau indique la présence de glycoside cardiaque.
- ✓ **Tanins** : l'absence de la couleur bleu-noir indique l'absence des tanins gallique et la présence de la couleur brun verdâtre indique la présence des tanins catéchiques avec une réaction fortement positive.

- ✓ **Alcaloïdes** : L'apparition d'un précipité brun rougeâtre indique la présence des alcaloïdes.
- ✓ **Flavonoïdes** : L'apparition de la couleur rouge prouve la présence des flavonoïdes avec une réaction moyennement positive.
- ✓ **Mucilage** : L'obtention d'un précipité floconneux après agitation indique la présence de mucilages.
- ✓ **Saponines** : L'apparition d'une mousse persiste dans l'extrait aqueux indique la présence des saponines.
- ✓ **Huile essentielle** : La sensation d'une odeur parfumée indique la présence d'huiles essentielles.

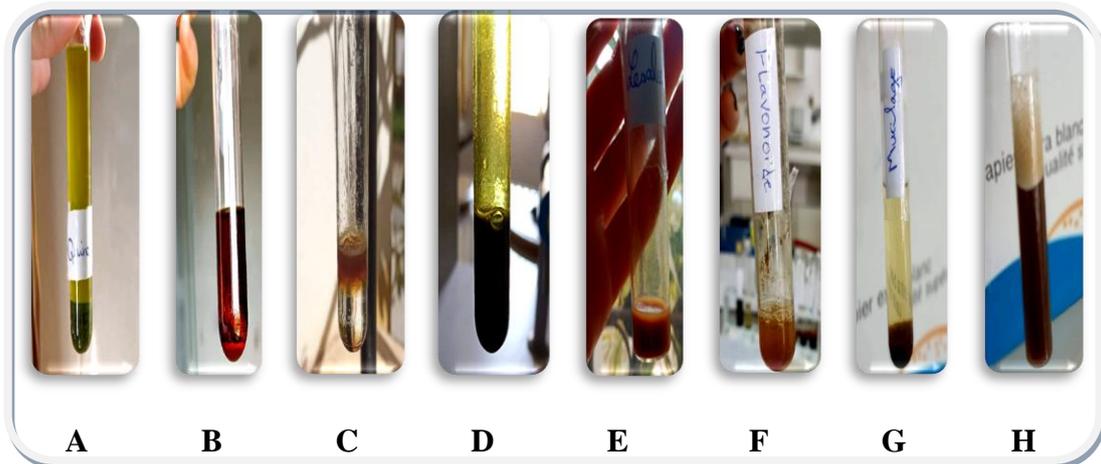


Figure 60 : résultat des tests : **A**/ quinones libres, **B**/composés réducteurs, **C** / glucosides cardiaques, **D**/ tanins, **E** / alcaloïdes, **F** /flavonoïdes, **G**/mucilages, **H**/ saponines.

Les résultats des tests phytochimiques sont indiqués dans les tableaux suivants :

Tableau 11 : Résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans l'extrait aqueux et l'extrait hydrométhanolique (Lehdjazi et Tikouane, 2021) de *L'Ocimum basilicum L.*

Les tests	Couleur et aspect	Extrait aqueux	Extrait hydrométhanolique
Quinone libre	Couleur verte	+	++
Composés réducteurs	Couleur Rouge brique	+++	
Glucosides cardiaques	Couche brune	+++	+++
tanins catéchiques	Couleur Brune verdâtre	+++	-
alcaloïdes (Wagner)	Précipité brun rougeâtre	+++	-
Flavonoïdes	Couleur Rouge	++	++
Mucilage	Mousse floconneux	+++	
Saponines	Mousse	+++	+
Huile essentielle	Odeur parfumé	+++	

D'après les résultats d'analyse phytochimique obtenus dans le tableau ci-dessus nous avons remarqué :

- La présence des quinones libres, les tanins catéchiques et les glucosides cardiaques dans les deux extraits (extrait aqueux et extrait hydrométhanolique).

- Les flavonoïdes sont présents dans les deux extraits avec une réaction moyennement positive.
- Les alcaloïdes sont absents dans l'extrait hydrométhanolique et fortement positive dans l'extrait aqueux.
- La présence des saponines avec une réaction fortement positive dans l'extrait aqueux et faiblement positive dans l'extrait hydrométhanolique.
- Une grande quantité des composés réducteurs, mucilage et des huiles essentielles détectés dans l'extrait aqueux et ne sont pas effectués dans l'extrait hydrométhanolique.

2.2. Chromatographie

L'analyse chromatographique a été réalisée dans le but de séparer les différents métabolites présents au niveau des extraits qui sont déjà préparés par l'extraction liquide-liquide (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, et n-butanol), cette étude a concerné la plante de *Ocimum basilicum* L,

Après développement et l'évaporation du solvant de migration les taches sont visualisées sous UV.

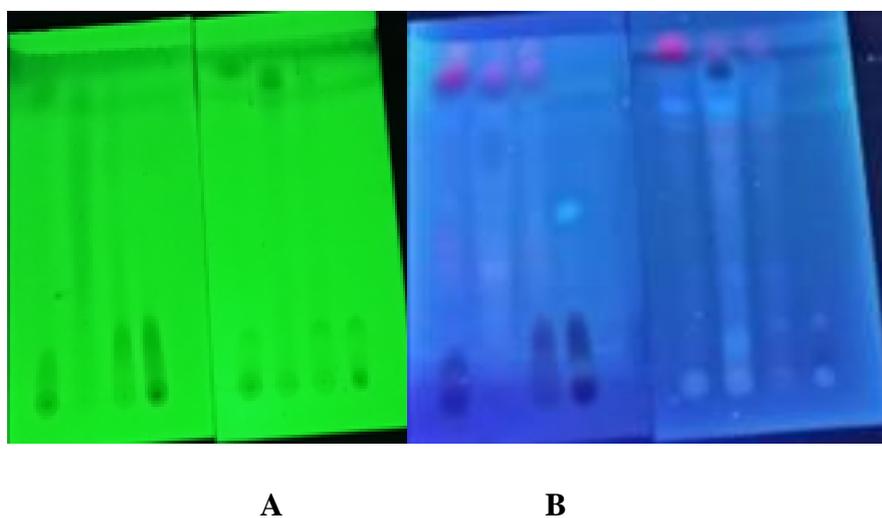


Figure 61 : résultats des plaques CCM prise après la révélation à lumière UV (A / 254nm et B/ 365nm) des quatre extraits de gauche à droite : éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol

2.2.1. Résultats :

Tableau 12 : les différents spot et valeurs de Rf des plaques CCM effectuée.

Extrait	L'éluant AME			L'éluant NBA		
	Rf	254 nm	365nm	Rf	254nm	365nm
Ether de pétrole	0	Gris	Violet Flavonoïdes	0	Gris	Gris foncé
	0,1	Gris clair	Bleu clair Flavones	0,11	Gris	Violet Flavone
	0,32	Invisible	Rouge Anthocyane anthraquinone	0,26	Invisible	Rouge Anthocyane anthraquinone
	0,79	Invisible	Orange Stérols	0,47	Invisible	Rose
	0,81	Gris clair	Vert fleurissant Alcaloïdes	0,6	Invisible	Bleu clair
	0,91	Noir	Rose foncé Chlorophylle	0,68	Invisible	Bleu foncé Acide phénolique
				0,91	Noir	Rose foncé Chlorophylle
Chloroforme	0	Gris clair	Violet Flavonoïdes	0,15		Rose clair
	0,14	Invisible	Bleu clair L'acide cinnamique			
	0,32	Invisible	Bleu Alcaloïdes			
	0,45	Invisible	Rose clair Anthocyane anthraquinone	0,36	Gris clair	Rouge Anthocyane anthraquinone
	0,55	Invisible	Rouge Anthocyane anthraquinone			

	0,71	Invisible	Orange Stérols			
	0,81	Invisible	Bleu vert Alcaloïdes			
	0,86	Gris foncé	Noir Anthocya Nidine	0,86	Gris	Noir Anthocya Nidine
	0,91	Invisible	Rose chlorophylle	0,91	Invisible	Rose Chlorophylle
Acétate d'éthyle	0	Gris clair	Violet Flavonoïdes	0	Gris clair	Sombre
	0,15	Gris clair	Jaune-orange Terpène et Tritèrpène	0,15	Gris	Sombre
	0,81	Invisible	Bleu vert Alcaloïdes	0,36	Gris clair	Invisible
	0,86	Gris clair	Invisible	0,68	Invisible	Noir Anthocya Nidine
	0,91	Invisible	Rose Chlorophylle	0,77	Invisible	Rose Chlorophylle
n-Butanol	0	Gris	Bleu Alcaloïdes	0	Noir	Noir
	0,1	Invisible	Noir	0,04	Invisible	Violet Flavonoïdes
	0,15	Gris clair	Jaune-orange Tritèrpène	0,15	Noir	Noir
	0,86	Gris clair	Invisible Méthylxanthine ou diterpène	0,42	Invisible	Bleu vert Coumarines

2.2.2. Discussion :

L'observation des plaques CCM a montré la présence de plusieurs taches plus en moins distinctes et qui diffèrent d'un éluant à l'autre. Les distances de migration des taches nous permettent de mesurer les R_f et les comparer avec ceux des métabolites connus dans la littérature.

- **L'extrait éther de pétrole :** la phase contient 6 taches dans l'éluant AME et 7 taches dans l'éluant NBA, cette phase contient des flavonoïdes, flavones (0,1 férulate)', anthocyanes et anthraquinones, on a détecté un spot de $R_f=0,36$ est le même R_f anthocyanidine glycoside, les alcaloïdes de $R_f =0,81$ même R_f pour l'acide caféol-5-quinine et des acides phénoliques avec la chlorophylle.
- **L'extrait chloroforme :** la phase contient 9 taches dans l'éluant AME : flavonoïdes, alcaloïdes ($R_f=0,32$ monocaféoylquinique, et $R_f= 0,81=$ acide chlorogénique) anthocyanane, anthraquinone stéroïdes, chlorophylle et d'autres taches non identifiées. Cependant, dans le deuxième éluant NBA, on trouve 4 taches inconnues à part une tache noire de $R_f 0,68$ il peut être l'Anthocyanidine.
- **L'extrait acétate d'éthyle :** 5 taches dans chaque représentent les flavonoïdes, terpènes, alcaloïdes anthocyanane avec la chlorophylle.
- **L'extrait n-butanol :** dans l'éluant AME, on détecte 4 taches représente les alcaloïdes, triterpène, méthylxanthine ou diterpène alors que dans le système NBA on observe une tache violette (flavonoïdes) et une tache bleu vert représente le coumarine ($R_f=0,42$ O-coumarate), et 2 autres taches non identifier, on remarque que la tache de la chlorophylle est absente dans cette phase.

Le présent travail a montré que la plante est riche en métabolite secondaires malgré on n'arrive pas à identifier tous les spots, la phase chloroformique contient la plupart de ces produits, alors que la phase n-butanol ne contient que les flavonoïdes et terpène ou triterpène malgré le n-butanol a le rendement le plus élevé.



CHAPITRE III :
DOSAGE DES ALCALOÏDES

1. Introduction :

Le but d'un dosage est de déterminer la quantité de matière contenue dans un échantillon. Comme les alcaloïdes se trouvent le plus souvent sous forme de sels d'acides minéraux ou organiques, et parfois leur combinaison (dont les tanins en particulier).

Leur mode d'extraction est très variable selon la nature de l'alcaloïde, mais on trouve typiquement deux schémas d'extraction : par un solvant apolaire en milieu alcalin ou par un solvant polaire en milieu acide. On a choisi la première méthode.

2. Mode opératoire

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir de la poudre moulue de l'Ocimum Basilic L sont obtenues par une extraction liquide-liquide, basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et alcalin (**Bruneton, 1999**).

10 g de la partie aériennes de la plante, sont finement broyées par un mortier, la poudre obtenue est délipidée par 50 ml d'éther de pétrole par macération sous agitation mécanique et à température ambiante pendant 3heures.

Après filtration, le marc (la poudre moulue débarrassée de la matière grasse) est alcalinisé par une solution d'ammoniacque (0.5N) pendant au moins 97 heures à température ambiante, permettant ainsi aux alcaloïdes, de passer de la forme sel en forme organique. La poudre alcalinisée est placée dans une cartouche en cellulose, celle-ci est placée à son tour dans l'appareil de Soxhlet.

L'extraction par soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec le solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première Ce dernier est monté sur un ballon contenant 100 ml de dichlorométhane. Les alcaloïdes en première étape sont extraits à chaud sous re contenant 100 ml de dichlorométhane pendant 3 à 4 heures (au moins 5 cycles sont nécessaires pour un épuisement total de la poudre).

A l'issue de cette opération, l'extrait brut est passé à la purification par trois extractions successives par une solution de 150ml d'acide sulfurique (0.5N), les fractions sont reprises dans une ampoule à décantation, alcalinisées jusqu'à pH 9 par ajout de quelques ml d'ammoniacque (0.5N). Nous épuisons ensuite la solution par 150ml de chloroforme, en agitant doucement l'ampoule (l'opération a été répétée trois fois).

Nous récupérons les trois fractions organiques dans un erlenmeyer et l'extrait recueilli dans le ballon taré est évaporé à sec sur un rotavapeur. Après refroidissement, nous pesons à nouveau le ballon. Le résidu sec représente les alcaloïdes totaux.



Figure 62 : L'appareil de soxhlet

Le protocole opératoire est schématisé dans la figure suivante :

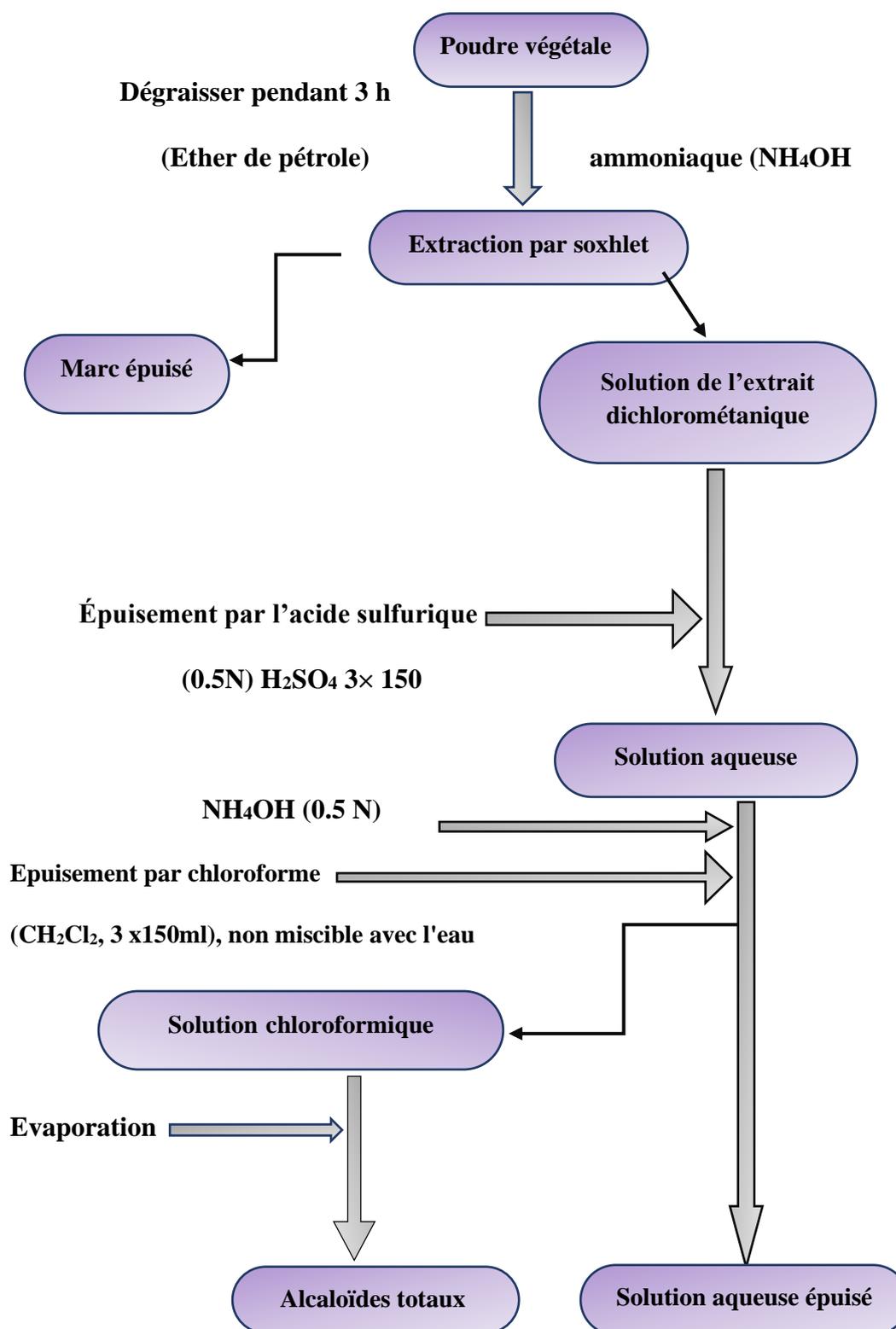


Figure 63 : Extraction des alcaloïdes totaux de l'*Ocimum Basilicum L.*

3. Résultat et discussion :

On a pesé le ballon avant d'y placer l'extrait, puis on a mis l'extrait à vaporiser dans un rotavapeur, Après refroidissement nous pesons à nouveau le ballon après l'évaporation à sec.

Le résidu sec final représente les alcaloïdes totaux. Les résultats montrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 13 : la masse et rendement obtenus.

Masse du matériel végétal	Masse des alcaloïdes totaux	Rendement des alcaloïdes
10g	0,19	19%

Le taux des alcaloïdes final est 0,19g par 10g de la plante, et ceci interprète l'utilisation de l'*Ocimum basilicum* comme pesticides, il existe également de nombreuses plantes qui ont la même propriété pesticide comme la citronnelle, la mélisse, le tanaisie, l'absinthe, l'aspérule, la lavande...etc.

Par conséquent, il ne doit pas être utilisé de manière massive et non réglementée.



CHAPITRE IV :
LES ACTIVITES BIOLOGIQUES

1. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits :

L'évaluation de l'activité antioxydante d'un composé ou un mélange de composé consiste à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres. Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats différents selon l'essai utilisé. Par conséquent, des analyses pourrait être effectuer pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits (**Athamena S, 2010**).

Le test proposé pour la mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits est : Test d'évaluation DPPH. Dans ce test les antioxydants réduisent le diphenylpicrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphenylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu a donné des protons (**Hatano T, 1997**).

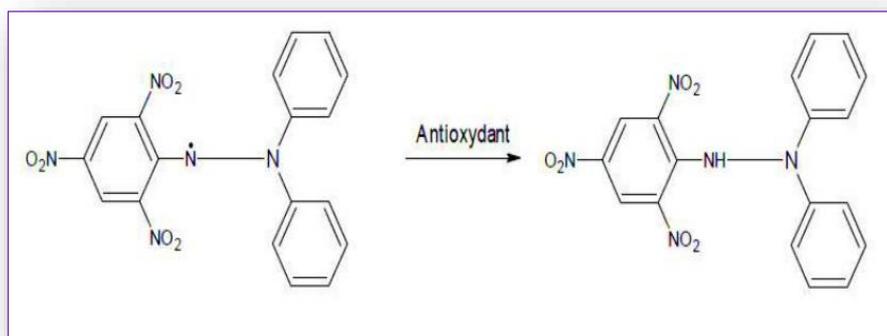


Figure 64 : Réduction du radical libre DPPH (**Tang, 2002**).

1.1. Méthodes et matériels

1.1.1. Préparation de la solution de DPPH :

La solution de DPPH a été préparé par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.



Figure 65 : préparation du DPPH (photo originale).

1.1.2. Préparation des solutions mères de concentration 5mg/ml :

On mélange 50 mg de la phase n_butanol avec 10 ml de MeOH absolu dans un tube à essai.

1.1.3. Préparation des dilutions de l'extrait :

- L'expérience effectuée sur 5 concentrations différentes d'échantillon de l'ordre décroissant, dilués dans le méthanol.
- A partir de chaque solution mère, on prépare les dilutions suivantes selon la relation suivante :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

* C_1 : concentration de la solution mère (5mg/mL).

* V_1 : volume de la solution mère (mL).

* V_2 : volume de MeOH ajouté (mL).

* C_2 : concentration finale (mg/mL).

Tableau 14 : les différentes concentrations de produit

Concentrations (mg/ml)	Volume de la Solution mère (ml)	Volume de MeOH (ml)
3	3	2
2	2	3
1	1	4
0,5	0,5	4,5
0,25	0,25	4,75

1.2. Mesures spectrophotométriques :

- On mélange 3 ml de la solution méthanolique du DPPH préparé avec 30 μ l de l'extrait.
- On laisse à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 15 minutes.
- On mesure l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre (UV 1800 SHIMADZU) à 517 nm.
- On mesure l'absorbance de chaque concentration par rapport à un blanc constitué uniquement par le méthanol pur.

1.3. Résultats et discussion :**Tableau 15** : L'absorbance des concentrations de la phase Ether de pétrole

Concentration (mg/ml)	5	3	2	1
Absorbance (nm)	0.170	0.812	1.020	1.109
PI%	83.57	21.54	1.44	-

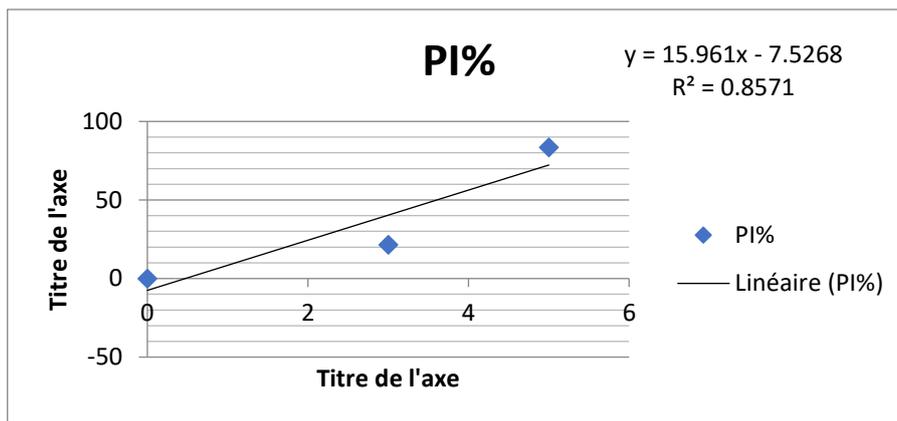


Figure 66 : Courbe d'étalonnage de la phase d'Ether de pétrole

Tableau 16 : L'absorbance des concentrations de la phase Chloroforme

Concentration (mg/ml)	5	3	2	1
Absorbance (nm)	0.193	0.476	0.730	0.902
PI%	81.35	54.00	29.46	12.85

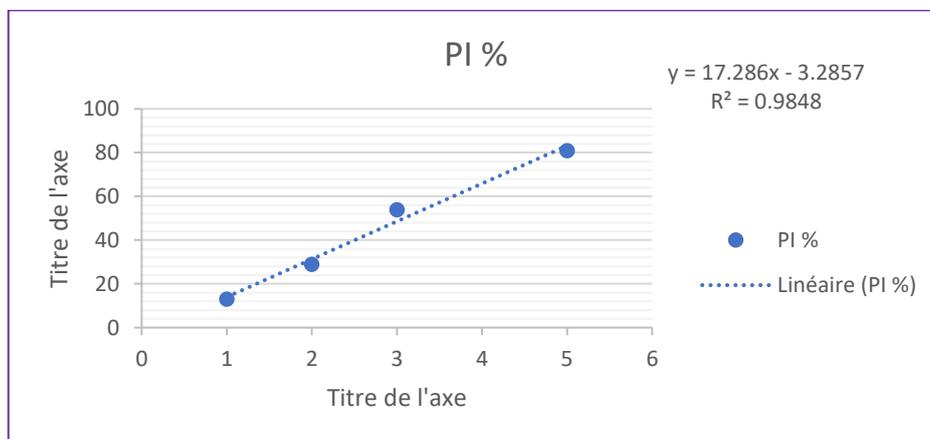
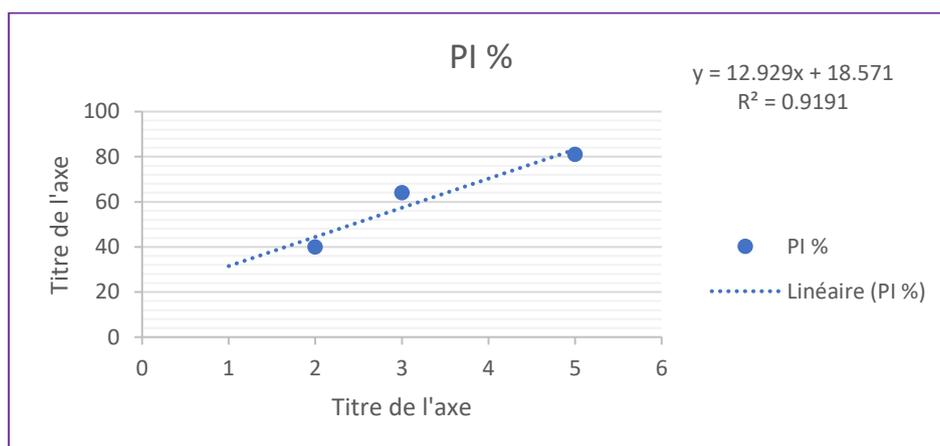


Figure 67 : Courbe d'étalonnage de la phase de Chloroforme

Tableau 17 : L'absorbance des concentrations de la phase Acétate

Concentration (mg/ml)	5	3	2	1
Absorbance (nm)	0.194	0.365	0.624	1.119
PI%	81.25	63.80	39.71	-

**Figure 68** : Courbe d'étalonnage de la phase d'Acétate**Tableau 18** : L'absorbance des concentrations de la phase n-Butanol

Concentration (mg/ml)	5	3	2	1	0.5	0.25
Absorbance (nm)	0.097	0.106	0.096	0.249	0.541	0.667
PI%	90.62	89.75	90.72	75.94	47.72	35.55

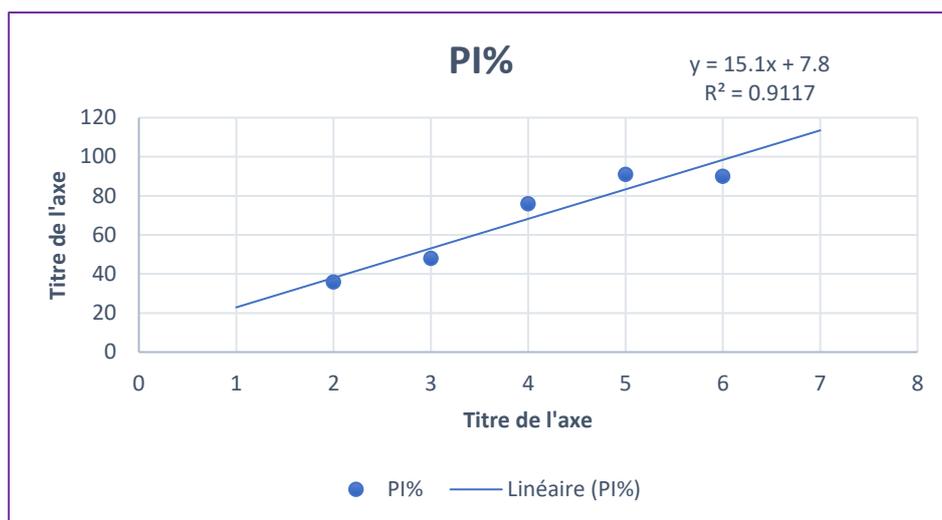


Figure 69 : courbe d'étalonnage de la phase du n-Butanol

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC₅₀, il définit comme étant la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 19 : les CI₅₀ des différents extraits

Ether de pétrole	3,60 mg/ml
Chloroforme	3,08mg/ml
Acétate	2,43 mg/ml
n-Butanol	2,79mg/ml

On résulte que la concentration efficace pour réduire 50% de radical DPPH est celle d'Acétate avec une activité très importante (2.43 mg/ml). Suivi par l'extrait n-butanol (2.79mg/ml), et l'extrait chloroforme avec (3.08 mg/ml). Alors que l'activité la plus faible concentration est celle d'Ether de pétrole.

Par comparaison des CI₅₀ des quatres extraits avec celle de l'acide ascorbique comme antioxydant de référence, on trouve que l'Acétate et le n-butanol sont plus actifs que l'acide ascorbique. Alors, le Chloroforme et l'Ether de pétrole sont moins actifs par rapport à l'acide ascorbique.

2. Activité antifongique de l'*Ocimum basilicum*

La plante *Ocimum basilicum* sujette de l'étude, a fait l'objet de plusieurs manipulations, parmi ces manipulations c'est l'étude de l'activité antifongique, la présente partie décrit les méthodes et le matériel utilisés.

2.1. Matériel et méthode

Les différentes étapes de l'étude ont été réalisés au niveau du centre de recherche biotechnologie (CRBT, Constantine) Le matériel fongique utilisé est constitué d'une seule souche de champignon *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*.

Le milieu PDA a été choisi pour assurer la culture des champignons. Il s'agit d'un milieu à base de pomme de terre. Cette dernière constitue un milieu complexe qui sert à l'isolement et la culture des champignons, et la durée d'incubation de l'antifongigramme est de 6 Jours.

2.1.1. Préparation des disques :

A l'aide d'une pipette pasteur stérile, on a préparé des disques de notre souche utilisé de 0.5 cm de diamètre, ensuite on les a déposés au centre de chaque boîte contenant de milieu de culture sur la surface de la PDA.

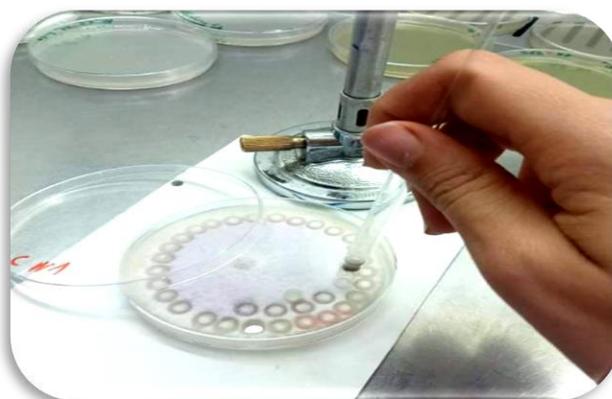


Figure 70 : La préparation des disques

2.1.2. Préparation de milieu culture :

Pour tester l'activité antifongique de nos extraits de la plante *Ob. L.*, nous avons procédé au premier lieu à la préparation du milieu de culture PDA (pommes de terre, dextrose, agar)

sur lequel se développe le champignon utilisé. Pour 1200 ml, on a besoin de 280 g de pommes de terre et 28 g de dextrose et 21 g de l'agar.

Le milieu de culture obtenu a été distribué dans des erlenmeyer a raison de 100 ml par erlenmeyer, ces derniers ont été stérilisés à l'aide de l'autoclave pendant 20 min à 121°C, en même temps on a préparé les concentrations correspondant à chaque extrait.

1 ml de chaque extrait a été versé dans l'erlenmeyer contenant 100 ml du PDA stérile puis mélanger manuellement jusqu'à l'homogénéisation, ensuite chaque 100 ml a été coulé dans quatre boîte de pétri de 90 mm (4 répétitions), chaque disque a été déposé au centre de chaque boîte. L'incubation de toutes les boîtes contenant le champignon a été fait pour une durée de six jours dans une étuve réglée à 25 °C.

La mesure du diamètre de la colonie fongiques a été établie à l'aide d'une règle, ensuite le calcul de la moyenne de champignon a été fait pour calculer le taux d'inhibition

Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne a été mesuré quotidiennement comparativement au témoin négative pour le n-Butanol (contient le PDA seulement) et au témoin positive pour le chloroforme (contient le PDA et le DMSO). Ce taux a été calculé selon la formule de (Leroux et Credet, 1978) :

$$T\% = \frac{D - d}{D} \times 100$$

T : taux d'inhibition

D : croissance mycélienne dans les boîtes Témoins

d : croissance mycélienne dans les boîtes Essais

2.1.3. Préparation des concentrations

Tableau 20 : les concentrations des extraits (chloroforme et n-butanol)

	Chloroforme mg /ml	n-Butanol mg/l
C ₁	3,8	500
C ₂	3	250
C ₃	2	125

2.2. Résultats et discussions

- Pour l'extrait N-butanol :

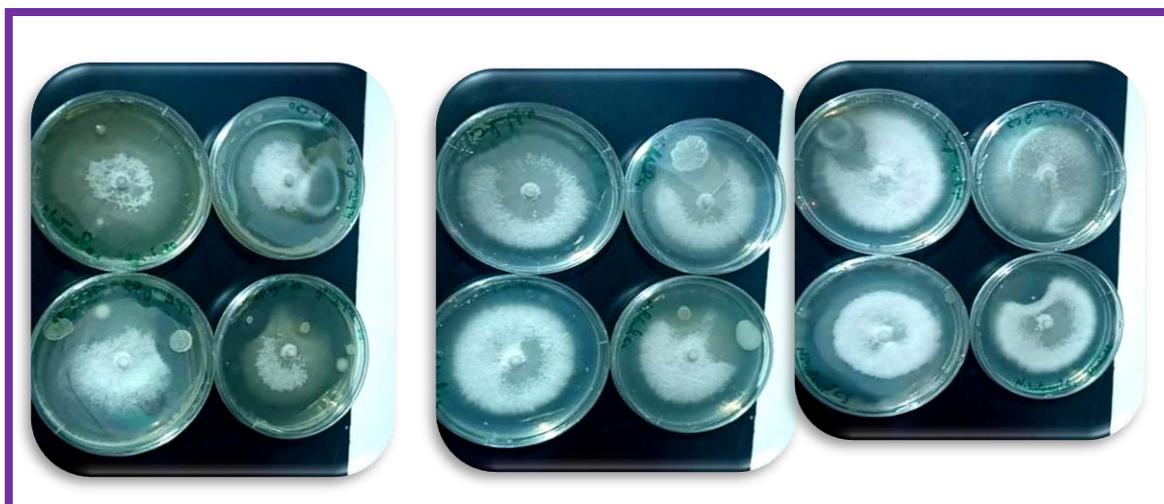


Figure 71 : la zone d'inhibition de l'extrait n-Butanol de chaque concentration testée par la souche *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* ([C¹], [C²], [C³]).

- Pour l'extrait chloroformique :



Figure 72 : la zone d'inhibition de l'extrait chloroformique de chaque concentration testée par la souche *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* ([C¹], [C²], [C³]).

La lecture des résultats a été effectuée après 6 jours d'incubation à 25° C par la mesure du diamètre de la zone de croissance du champignon. Parallèlement, nous avons déterminé le diamètre de la souche fongique en absence de l'extrait.

L'effet antifongique est déterminé par la mesure la moyenne du pourcentage d'inhibition de la croissance minimale le résultat sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Pour le témoin positive et le témoin négatif on a :

Tableau 21 : la moyenne de T⁺ et T⁻

	Témoin positif (PDA + DMSO)	Témoin négatif (PDA)
Boîte 1 (cm)	6,75	6,5
Boîte 2 (cm)	6,5	6,5
Boîte 3 (cm)	6,5	6,5
Boîte 4 (cm)	6,75	6,5
Le moyenne (cm)	6,6875	6,5

On remarque que le moyenne de témoin positif est élevée que le témoin négatif alors que l'effet du solvant est positif pour la croissance des champignons et la plante a une propriété antifongique.

Tableau 22 : Les moyennes d'inhibitions des extraits n-butanol et le chloroforme

	n-BuOH [C ¹]	n-BuOH [C ¹]	n-BuOH [C ³]	ChCl ₃ [C ¹]	ChCl ₃ [C ²]	ChCl ₃ [C ³]
Boîte 01	5,75	6,5	7	6,5	7	6,5
Boîte 02	6	6,5	6,5	6,5	6,5	6
Boîte 03	5,5	6,5	6,5	5	6,5	6
Boîte 04	5,7	6,5	6	5,6	6	6,2
Le moyenne	5,7375	6,5	6,5	5,9	6,5	6,175

Les résultats du calcul des taux d'inhibition sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 23 : Taux d'inhibition des extraits n-butanol et chloroforme.

T %	n-Butanol	Chloroforme
C ₁	11,73	11,73
C ₂	0	2,80
C ₃	0	7,66

Les résultats obtenus montrent que l'extrait chloroformique montre une bonne activité antifongique avec une taux d'inhibition de 11,73%, 2,80 % et 7,66 pour chaque concentration C₁, C₂ et C₃ successivement. Alors que l'extrait n-Butanol ne donne aucune activité sauf avec une concentration de 500mg/ml avec un taux 11,73%.

Pour inhiber des champignons de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* égale à 11,73% nécessite une concentration de 0,95 mg de l'extrait chloroformique, cependant que pour l'extrait n-Butanol il faut prendre 125mg de l'extrait.

Selon le résultat, l'extrait chloroformique est plus actif contre la souche. Cette différence peut être à l'origine de la composition chimique différent entre les deux extrait, le chloroforme permettant une meilleure extraction des composés phénoliques.

L'activité antifongique des extrait apparait plus importante que celle de (**Adiguzel et al., 2005**) qui ont montré que les trois extrait de basilic testées (éthanol, le méthanol et l'hexane) n'ont présenté aucune activités antifongique contre *F.oxysporum*.

En revanche, (**Bidarigh et al., 2012**), ont montré que la concentration de l'extrait éthanolique de basilic contre *Fusarium* sp est à l'ordre 0,12 µl/ml.

3. Activité anticoagulante des extraits de l'*Ocimum Basilic* L.

L'activité anticoagulante de la plante *O.basilicum* L. a été évaluée in vitro (effectué dans laboratoire d'analyse médicale Mirouh, ferjioua), vis-à-vis les 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 globaux et chronométriques ; le temps du céphaline-kaolin (TCK) et temps de Quick (TQ).

3.1. Méthodes et matériels

Le plasma pool est un mélange de plasma déplaquetés des volontaires sains non traités, dont les TCK et les TQ sont normaux et comparables, le sang de chaque volontaire est prélevé par prélèvement veineux dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium (tube citraté à la coloration bleu)



Figure 73 : prélèvement de sang

Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquette, le mélange de ces plasma déplaquetés (plasma standard) est conservé dans un tube sec à basse température (-10°C) jusqu'à son utilisation. (Athukorala Y, *et al.*, 2007).



Figure 74 : résultats du sang après centrifugation et la récupération du plasma.

3.1.1. Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

Principe :

Le temps de céphaline kaolin (TCK) est un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs (VIII, IX, XI et XII de la voie intrinsèque (endogène)). Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) en présence de céphaline

(substitut phospholipidique du facteur 3 plaquettaire), de kaolin (activateur du système contact et de calcium comme un facteur déclenchant (caen *et al*, 1975), (caquet R, 2004).

Mode opératoire :

❖ L'extrait hydrométhanolique :

On prépare six tubes à essai avec contenu différent, trois contiennent l'extrait et trois sont des témoins selon :

Tube 1 (extrait). \Rightarrow 10 μ l d'extraits hydrométhanolique + 90 μ l du plasma.

Tube 2 (extrait). \Rightarrow 20 μ l d'extrait hydrométhanolique + 80 μ l du plasma.

Tube 3 (extrait). \Rightarrow 30 μ l d'extrait hydrométhanolique + 70 μ l du plasma.

Tube 1(témoin). \Rightarrow 10 μ l méthanol + 90 μ l du plasma.

Tube 2 (témoin). \Rightarrow 20 μ l méthanol + 80 μ l du plasma.

Tube 3 (témoin). \Rightarrow 30 μ l méthanol + 70 μ l du plasma.

(Pour les tubes témoins, l'ajout du plasma est fait après le séchage de méthanol)

On laisse les 6 tubes incubés à 37 C° au bain marie pendant 2 min. après incubation, 100 μ l d'une solution de céphaline- kaolin (TCK) sont additionnés puis les six tubes est réincubé à 37 C° pendant 3 min et la coagulation est alors déclenchée par l'addition de 100 μ l d'une solution aqueuse de CaCl₂ à l'aide du chronomètre, jusqu'à la formation du caillot de fibrine (arrêt du chronomètre)

❖ L'extrait aqueux :

❖ Tube 1 (extrait). \Rightarrow 10 μ l d'extraits aqueux + 90 μ l du plasma.

❖ Tube 2 (extrait). \Rightarrow 20 μ l d'extrait aqueux + 80 μ l du plasma.

❖ Tube 3 (extrait). \Rightarrow 30 μ l d'extrait aqueux + 70 μ l du plasma.

❖ Tube 1(témoin). \Rightarrow 10 μ l eau physiologique + 90 μ l du plasma.

❖ Tube 2 (témoin). \Rightarrow 20 μ l eau physiologique + 80 μ l du plasma.

❖ Tube 3 (témoin). \Rightarrow 30 μ l eau physiologique + 70 μ l du plasma.

On laisse les 6 tubes incubés à 37 C° au bain marie pendant 2 min. après incubation, 100 µl d'une solution de céphaline- kaolin (TCK) sont additionnés, puis les tubes sont réincubé à 37 C° pendant 3 min et la coagulation est alors déclenchée par l'addition de 100 µl d'une solution aqueuse de CaCl₂ à l'aide d'un chronomètre, jusqu'à la formation du caillot de fibrine (arrêt du chronomètre).

Principe

Le temps de Prothrombine (TP) ou le temps de Quick (TQ) qui permet d'une exploration globale des facteurs de la voie extrinsèque (exogène) de la coagulation (la proconvertine VII, le facteur Stuart X, la prothrombine II, la Proaccéléline V et aussi Fibrinogène). Ces tests consistent à mesurer le temp de coagulation à 37°C d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP), en présence d'un mélange du facteur tissulaire 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 (**Caquet R, 2004**)

Mode opératoire

❖ L'extrait hydrométhanolique :

La préparation des tubes est identique à celle utilisé sans la partie précédente. On laisse les 6 tubes incubés à 37 C° au bain marie pendant 2 min. après incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200 ul de TQ préincubé à 37 C° pendant 15 min, et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot fibrineux est alors mesuré à l'aide d'un chronomètre.

❖ L'extrait aqueux :

On laisse les 6 tubes incubés à 37 C° au bain marie pendant 2 min. après incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200 ul de TQ préincubé à 37 C° pendant 15 min, et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot fibrineux est alors mesuré à l'aide d'un chronomètre.

3.2. Résultats et discussion



Figure 75 : la formation du caillot

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 24 : Le temps de formation des caillots de l'extrait hydrométhanolique (voie endogène)

	Tube 1 (Ex)	Tube 2 (Ext)	Tube 3 (Ext)	Tube 1 (Tm)	Tube 2 (Tm)	Tube 3 (Tm)
temps de formation (s)	31	-	-	37	44,46	50

Tableau 25 : Le temps de formation des caillots de l'extrait aqueux (voie endogène)

	Tube 1 (Ex)	Tube 2 (Ex)	Tube 3 (Ex)	Tube 1 (Tm)	Tube 2 (Tm)	Tube 3 (Tm)
temps de formation (s)	122	-	-	31,65	35,51	42,40

Tableau 26 : Le temps de formation des caillots de l'extrait hydrométhanolique (voie exogène)

	Tube 1 (Ex)	Tube 2 (Ex)	Tube 3 (Ex)	Tube 1 (Tm)	Tube 2 (Tm)	Tube 3 (Tm)
temps de formation (s)	13	-	-	13,59	16,19	17,43

Tableau 27 : Le temps de formation des caillots de l'extrait aqueux (voie exogène)

	Tube 1 (Ex)	Tube 2 (Ex)	Tube 3 (Ex)	Tube 1	Tube 2	Tube 3
temps de formation (s)	20	-	-	16,84	20,29	22

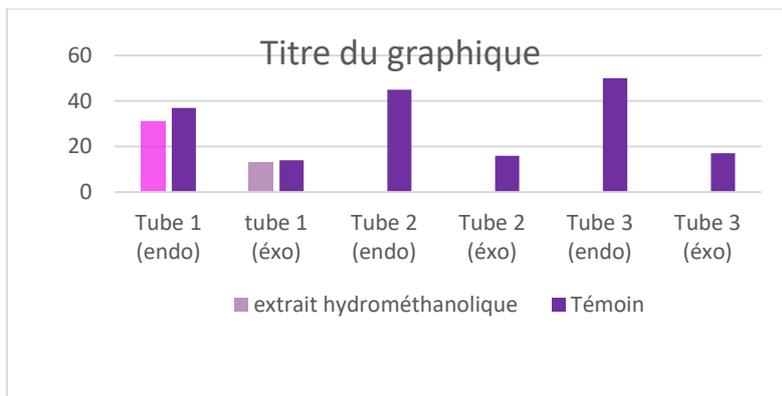


Figure 76 : Histogramme du temps de formation des caillots de l'extrait hydrométhanolique

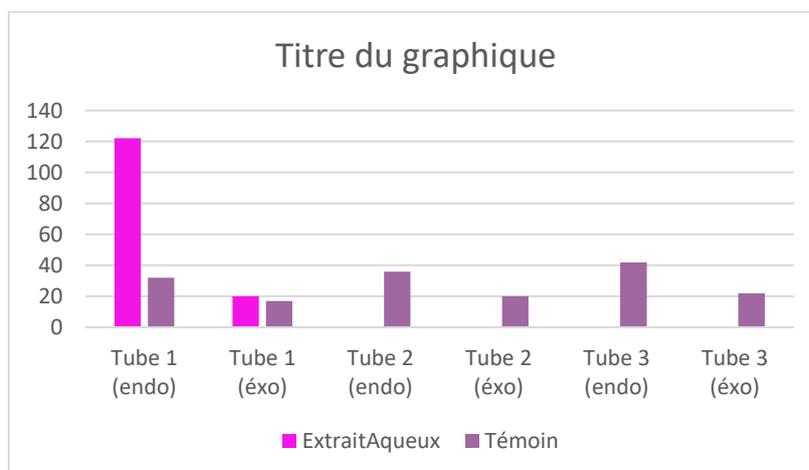


Figure 77 : Histogramme du temps de formation des caillots de l'extrait aqueux

Globalement, l'évaluation de la capacité anticoagulante des extraits hydrométhanolique et aqueux de la plante *O.basilicum L*, établi par les deux tests chronométriques d'exploration de la coagulation, le TCK et le TQ démontre que les deux extraits exercent une activité anticoagulante importante vis-à-vis des deux voies de la coagulation. D'après les résultats obtenus on distingue que l'extrait aqueux comprend une activité anticoagulante presque identique à celle de l'extrait hydrométhanolique.



CONCLUSION GENERALE

Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines, parmi ces plantes nous avons choisi l'*Ocimum basilicum* L. En raison de ses propriétés thérapeutiques.

Au cours de ce mémoire nous avons étudié quelques paramètres phytochimiques (taux des alcaloïdes) et biologique (activité antioxydant, antifongiques, et anticoagulants) de la partie aérienne de l'*Ocimum Basilicum* L. cultivée dans la région de Mila (Chalgoum el Aid).

L'extraction des substances bioactives de la partie aérienne d'*O. basilicum* L a été effectuée par macération de la poudre de la plante (le rendement de l'extrait hydrométhanolique est plus élevé que l'extrait aqueux).

Qualitativement, l'évaluation préliminaire de la composition phytochimique, permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires, notamment, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines, les tanins catéchiques, quinones libres, glucosides cardiaques, composé réducteur, mucilage et les huiles essentielles. Ces substances sont généralement responsables de l'activité biologique des extraits (aqueux et hydrométhanolique)

La chromatographie sur couche mince a montré la présence de plusieurs composés parmi : flavonoïdes, flavones, anthocyanes, anthraquinones, anthocyanidine glycoside, les alcaloïdes, stérol, acide chlorogénique, terpènes, diterpène, triterpène, méthylxanthine, coumarine, flavones et l'acide cinnamique.

Quantitativement, l'évaluation de la teneur en alcaloïdes totaux, par l'extraction liquide-liquide en milieu alcalin, l'analyse de ces alcaloïdes est basée principalement sur leurs propriétés physicochimiques, le taux final des alcaloïdes est 0,19/10 g de la plante.

L'évaluation de l'activité antioxydant des extraits d'*O. basilicum* L par le test DPPH révèle que la plante possède un pouvoir antioxydant important.

L'activité antifongique des extraits (n-butanol, chloroforme) de notre plante montre que l'extrait chloroformique a une bonne activité antifongique Alors que l'extrait n-Butanol ne donne aucune activité sauf avec le (C₁) Selon le résultat, l'extrait chloroformique est plus actif contre notre souche *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*.

Conclusion générale

L'activité anticoagulante à été évaluée par les testes du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ), démontre que les deux extraits exercent une activité anticoagulante importante vis-à-vis des deux voies de la coagulation.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne consiste qu'une première étape dans notre recherche et nécessite des études complémentaires approfondies dans ce domaine. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Développer des médicaments antiradicalaires à base de plante, doués d'une activité antioxydante
- Activité enzymatique, anti-inflammatoire.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abedini. A. (2013). Évaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat. Université du Droit et de la Santé, LilleII. HAL. 2014. p 84- 85.

Adiguzel A., Gulluce M., Sengul M., Ogutcu H., Sahun F et karaman I., (2005). Antimicrobiale Effect of ocimum basilicum (Labiatae) Extract. Turk J Biol, 29, 155-160.

Agisho H., Osie M., et Lambore T. (2014). Traditional Medicinal Plants Utilization, Management and Threats in Hadiya Zone, Ethiopia. Journal of Medicinal Plants Studies. Vol (2). P: 94-108.

Aït-Youcef M., (2006). « Plantes médicinales de Kabylie », Ed. Ibis Press, Paris. P: 350.

Ali, A.; Akhtar, N.; Khan, B. A.; Khan, M. S.; Rasul, A.; Zaman, S.-U.; Khalid, N.; Waseem, K.; Mahmood, T.; Ali, L., (2012). *Acacia nilotica*: A plant of multipurpose medicinal uses. J. Med. Plants Res., 6 (9): 1492-1496.

Alia B., Nasreen J., Ajjj A., Saima Naaz B., Shahida H., et SyedaH., (2012). Phytochemical and Pharmacological Studies on Ocimum basilicum linn Review. (India). Vol (04) issue 23. P: 74.

Ali-Delille L., (2010). Les plantes médicinales d'Algérie. 2ème Edition. Berti. Alger.P:239.

Anaëlle Chaudier., (2021). PasseportSanté /Nutriments/ Alcaloïde.

Anderson L W., (2001). A hydrohalcone derived from cinnamom function as a mimetic for insulin in 3 T3_L1 adipocytes “ vol 20 N ‘ p 327-36.

Aniszewski T., (2007). *Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role*, Elsevier.

Arabici O., et Bayram E., (2004). The effect of nitrogen and different plant density on some agronomic and technologic characteristic of *Ocimum basilicum* L. (Basil); Asian Network for Scientific Information. Vol: 3(4). P: 255-262.

Ascioglu S., Rex J.H., de Pauw B., Bennett J.E., Bille J., Crokaert F., et al.,(2002). Defining opportunistic invasive fungal infection in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants : an international consensus Clin Infect Dis 34:7__14

Atefeibu ESI.,(2002). *Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibacterienne d'Acacia Nilotica Var Andesonii* .Thèse de Doctorat, université cheikh Anta Diop de Dakar. p33.

Athamena S., Chalghem1 I., Kassah-Laouar 2 A., S. Laroui 3 et S. Khebri 4., (2010). ACTIVITE ANTI-OXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE D'EXTRAITS DE CUMINUM CYMINUM L. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Batna, Algérie. Lebanese Science Journal, Vol. 11, No. 1.p 13.

ATHmania S., (2009)." Etude Quantitative Des Flavonoides Des Graines De Cuminum cyminum et Les Feuilles De Rosmarinus officinalis Et L'évaluation De L'activité Biologique. "These de Magiste, Université EL-Hadj Lakhdar-Batna, p36.

Athukorala Y., Lee KW., Kim SK., Jeon YJ., (2007). Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from jeju island in korea. Bioresource technology ; 98:1711-1716.

Awor., et Samseny R-R., (2003). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante traditionnellement utilisée comme poison d'épreuve au Gabon : le *Strychnos Icaja* Baillon (Mbundu), Loganiacée. Thèse, Université de Bamako, Faculté de Médecine, de Pharmacie Et d'Odonto - Stomatologie, Mali.

Balakrishnan purushothaman, ramalingam prasannasrinivasan, purushothaman suganthi, balu Ranganathan, jolius gimbun ana kumaran shanmugam.(2018). A Comprehensive Review on *Ocimum Basilicum*. University malaysia. Journal of Natural Remedies ISSN: 2320-3358.

Barboni T., (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Corse, p26.

Barlow SM., (1990). " Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. "Ed. Hudson, B.J.F, Food Antioxidants.

Behrooz AB., Tabatabaei Yazdi F., Mortazavi A., Zendeboodi F., Gholian MM., et Vasieel A., (2013). Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms —in vitro. Journal of Paramedical Sciences (JPS). Vol.4, No.3 ISSN 2008-4978.

Benarba B., Belabid L., Righi K., Bekkar A., Elouissi M., Khaldi A. et Hamimed A., (2015). Ethnobotanical Study of Medicinal Plants used by Traditional Healers in Mascara (North West of Algeria). Journal of Ethnopharmacology. Vol (175). P: 626-637.

Bessas A., Benmoussa L., et 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.

Beta T., Nam S., Dexter JE., et Sapirstein HD., (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, *Creal Chem*: 390 -393.

Bezanger L., Beauquesne L., Pinkas M., et Torckmeotroutin F., (1990). Plantes médicinales des régions tempérées; Ed. Maloine.

Bhat, S. V. ; Nagasampagi, B. A. ; Sivakumar, M., (2005). *Chemistry of Natural Products.* Narosa, New Delhi, India, Ch. 4, 237.

Bidarigh S., Massiha A., Mohammed R. M. Pahlaviani K., Issazadeh K., Muradov P Z et Azarpour E.,(2012). Antimicrobial (Screening) properties of various plant extracts from *Ocimum basilicum* L. and *nerium oleander* L. against fungal Common Rots of potato in vitro. *Bioassay J. basic. Appl. Sci. Res*, 2 (7), 6810-6815.

Boggia R., Zunin P., Hysenaj V., Bottino A., et Comite A., (2015). Dehydration of Basil Leaves and Impact of Processing Composition. Processing and Impact on Active Components in Food. P: 645–653.

Bottine D.E., (2011). Bacillus cereus, a Volatile Humain Pathogen. Rev . April clin. Microbiol, 23(2), 382-398.

Bouzabata A ., (2018). *Pharmacognosie*, Libres d'écrire, p. 87.

Bravo L., (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr Rev*, 56: 317– 33.

Bruneton J., (1993). Pharmacognosie et Phytochimie. Plantes médicinales. 2ème édition. Lavoisier Techniques Et Documentation, Paris.

Bruneton J., (1999). Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p 1120.

Bruneton J.,(2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales Lavoisier Tec et Doc (4ème Ed.), p1268.

Caen J., Lrrieu MJ., et Samama M., (1975). L'hémostase : méthode d'exploration et diagnostic pratique (2^{ème} ED), Expansion scientifique française (paris) ; pp :15-20.

Caquet R., (2004). 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation (9^{ème} Ed), Masson (paris) ; pp :388-389.

Casley-Smith JR., Morgan RG., et Piller NB., (1993). « Treatment of lymphedema of the arms and legs with 5,6-benzo-[alpha]-pyrone. », *The New England journal of medicine*, vol. 329, n° 16.

Chalchat J C., et Özcan M., (2008). Food Chem. Vol (110). P: 501–503.

Chaouche TM., Haddouchi F., Atik-Bekara F., (2011). Phytochemical study of roots and leaves of the plant Echium pycnanthum Pomel. *Der Pharmacia Lettre*, 3 : 1-4

Choi YM., Noh Do., Cho SY., Suh HJ., Kim KM., et Kim JM., (2006). Antioxydants and antimicrobial activities of propolis from several of regions of korea. *LWT-Food science and technology*. Vol (39). P : 756-761.

Colvin BT.,(2004). Physiology of haemostasis. *Vox Sanguinis*; 87(Suppl. 1): S43–S46.

Commission du Codes Alimentaire, (2006).

COWAN MM., (1999). plant product as antimicrobial agents clinical microbiology review.

Cuendet M., (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydantes à partir d'une plante d'Indonésie « *Fagraea blumer* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitudes : « *Bartsia alpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* » (Ericaceae) et camp, Thèse de doctorat, p18.

Cuendet M.,(2000)." recherche de nouveaux composés capturs de radicaux libres et antioxydants à partir d'un plant d'indonésie". Thèse de doctorat.

Dacosta Y., (2003). Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta(Ed). Paris. P317.

De Feo V., De Simone F., Senatore F.,(2002). Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 61:573-578.

Delille L., (2007). « Les plantes médicinales d'Algérie », Ed. Berti. Alger. P: 47–48.

Dennis C et Webstert J (1971) propriétés antagonistes des groupes d'espèces de *Trichoderma*....Hyphale interaction. *Trans. Br ,mycol,Soc.* 57(3) :363_369.

Dewick, P. M.,(2001). ; *Medicinal Natural Products*. Wiley, Ch. 6, 291.

Diplok AT (1991)."Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview." *Am J Clin Nutr*: 53 (suppl): 189S-93S.

Dohou N., (2004). Approche Floristique, Ethnobotanique, Phytochimique et Etude de l'Activité Biologique de *Thymeleae lythroïdes*. Thèse de Doctorat. Université de Maroc. P:59.

Douhou N., Yani K., Thahrouch S., Idrissi Hassani L. M., Badoc A., et Gmira N., (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thynelaea lythroides*. Bull.Soc. Pharm.Bordeaux. Vol (142). P: 61-78.

Elad Y., Fogel M., Silverman D., Biton S., Yitzhak S., Harari D., et Adler U., (2015). White mould of sweet basil: conditions influencing its development in greenhouses and cultural measures for disease management. *Plant Pathol* Vol (64). P: 951–960.

Farnsworth NR., Akerele O., Bingel AS., Soejarto DD., et Guo Z., (1986). Place des plantes médicinales dans la thérapeutique, *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 64(2), 159-164.

Favier A., (2003). "Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la Compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique." *L'Actualité Chimique*; 108-117.

Fisher, N.L., Burgess, L. W., Toussoun, T.A., and Nelson, P.E.,(1982). Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*,72:151-153

Frezza Claudio, Alessandro Venditti, Mauro Serafini, Armandodoriano Bianco. (2019). Phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology, and nutraceuticals of Lamiaceae. *Studies in natural products chemistry* 62 ,125-178.

Garibaldi A., Gullino ML., et Minuto G., (1997). Diseases of basil and their management. *Plant Dis.* Vol (81). P: 124–132.

Gentry P A.,(2004). Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterinary Journal* 168: 238–251.

Georg G.C., Richard W.H., et Takashi Y.,(1999). *Plant Polyphenols : Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*, Springer, p. 877.

Ghedira K., (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutiques. *Phytothérapie*, Vol 3(4) ; p162-169.

Gonzalez AG., et Estevez-Braun A., (1997). Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, 14 : p 465-475.

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

Guentri-ayari S., (2019). Identification des métabolites secondaires d'*Hyscymus muticus* L.subsp. *falezlez* (cos) Maire, Solanaceae de la région d'Adrar et étude de leurs activités antioxydante et antifongique. Thèse de doctorat. Université Houari Boumediene. P :25-32.

Gunckel, S. Santander, P.G., Cordano, J., Ferreira, S., Munoz, L.J., Vergara, N., Squella, J.A. (1998),"Chemico-Biological Interactions." 114; 45–59

Hammerich O., Svensmark, B., (1990). "Anodic oxidation of oxygen-containing compounds." in: H. Lund, M. Baizer (Eds.), *Organic Electrochemistry*, Marcel Dekker, New York, p 615.

Harborne, J. B., & Herbert B., (1995). *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Bristol: Taylor & Francis.

Hesse, M.,(2002). *Alkaloids – Nature's Curse or Blessing ?*, VHCA, Zürich

Hatano, T., Takagi, M., Ito, H., et Yoshida T., (1997). Phenolic constituents of liquorice. VII. A new chalcone with a potent radical scavenging activity and accompanying phenolics from liquorice. *Chemical and pharmaceutical bulletin.*; 45(9): 1485-1492.

Hay R.,(1999). The management of superficial candidiasis; *J. Am Acad. Dermatol.* 40:S35_42

Helmut G., (1978). On the mechanism of the chorismate mutase reaction , *Biochemistry*, vol. 17, n° 18, p. 3700-3705

Hiltunen R., et Holm Y., (1999). (Essential Oil of *Ocimum*), Basil: the genus *Ocimum*, Harwood Academic Publishers, The Netherlands P: 77.

Hochedez P., Darty A., Caumes E., (2007). *Mycoses superficielles* EMC PP: 4-1380.

Hofmann M., (2003). thèse , etude du metabolisme des phenylpropanoide , analyse de l'interaction caféoyl- coenzyme A 3 o methyltransferase avec son substrat et caracterisation fonctionelle d'une nouvelle acyltransferase page 05 université louis pasteur – strasbourg I franais .

Ibrahim IS., et Alim Zage AU., (2016). Phytochemistry of methanolic and aqueous extracts of Eucalyptus camaldunensis leaves, seeds and stem back. International Journal of Advanced Academic Research | Sciences, Technology & Engineering | ISSN: 2488-9849 Vol (2). Issue 12.

Igor passi L B.,(2002). étude des activités biologiques de fagara zanthoxylo des lam (RUTACEA) these pharmacie , Bamako ; 133 P.

Ilboudo S., Ouedraogo M., Some N., et Guissou PI.,(2009). Criblage phytochimique et évaluation de la toxicité aigüe de Pisolithustinctorius (Basidiomycète). *Journal des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques.* 10(2):6-13.

Jacques E. POISSON., (2022). ALCALOIDE ,Encyclopoedia universalis [en ligne].

Jeun JM., Annie F., et Chrystian JL., (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes. P: 203-204.

Kang J., C Xie., Z Li, S. Nagarajan., A G Schauss, T Wu et X Wu (2011). "Flavonoïde from acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp and their antioxidant and antiinflammatory activities." Food Chemistry 128(1): 152-157

Kansole M.M.R., (2009). Etude ethnobotanique,Phytochimique et activité biologiques de quelques Lamiaceae du Burkina-Faso :Cas de Leucas martinicansis (D.E.A) en sciences biologiques appliquées,Burkina-Faso.

Kelly m et al., (2006). Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway, Current Cancer Drug Targets, vol. 6, n°1, p. 15-37(23).

Khan I., Ahmad K., Talha Khalil A., Khan J., Ali Khan Y., Shahab Saqib M., Naveed Umar M., et Ahmad H., (2015). Evaluation of antileishmanial, antibacterial and brine

shrimp cytotoxic potential of crude methanolic extract of Herb *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Journal of Traditional Chinese Medicine*.15 :35(3). P:316-322.

Klaas CA., Wagner G., Laufer S., Sosa S., Loggia RD., Bomme U., Pahl HL., et Merfort I., (2002). Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers, *planta. Med.* Vol (68). P:385-391.

Knox, J.P et Dodge A.D., (1985). "Singlet Oxygen and Plant", *Phytochemistry*, V.24, 889-96.

Krief S., (2003) *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées.* HAL. Thèse de doctorat "Ecologie et chimie des substances naturelles". Muséum national d'histoire naturelle. p31-32.

Kutchan, T. M ., (1995).*Plant Cell.* 7,1059.

Kwee EM., et Niemeyer ED., (2011). Variation phenolic composition and antioxidant properties among fifteen basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chem.* Vol (128). P:1044–1050.

Lahdjazi et tikouane., (2021). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne *Ocimum basilicum*.

Lake BG., (1999). « Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment », *Food and Chemical Toxicology*, n° 37, p. 423-453.

Ldigina E.Y., Safronish L.N., Otracheva V.E., Balandina I.A., Grinkevich N.I., Sorokina A.A., Molodojnikova L.M., Mitin Y.S., Samilina I.A., et Ermakova V.A. (1983). Analyse chimique des plantes médicinales, édition Moskva vischaya chkola : 172 pp (traduit du russe).

Lebham., (2005). Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Lendvaib Zelles T., Rozsa B., et Vizie S., (2002). Vinca alkaloid exchanges morphological dynamics of dentric neocortical Layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Research Bulletin*. Vol: 59 (4). P: 257-260.

Leroux P. et Credet A.,(1978). Document sur l'étude de l'activité des fongicides. INRA. Versailles France, 12 P

Leveau S. B. & Bouix M., (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apira. P .110-163.

Lhuilier A., (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Olivier, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monomiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de faculté des sciences pharmaceutiques-université Paul Sabatier-Toulouse III, 214pp.

Lisu W., Jui-Hung Y., Hsiao-Ling, L.,Ming-Jiuan., et W., (2003). "Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn)." *Journal of food and drug analysis*, 11(1): 60-66.

Lotito SB., et Frei B., (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?. *Free Radic. Biol. Med.* 41 (12): 1727-46.

Lucienne Ali-Delille. (2013). Les plantes médicinales d'Algérie.p239.

Macheix JJ., Fleuriet A., et Jay-Allemand C.,(2005). *Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.* Suisse.

Mackee HS., (1994). Catalogue des plantes introduites et cultivées en Nouvelle-Calédonie. Deuxième édition. Flore de Nouvelle-Calédonie et Dépendances. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. Hors-série. P: 164.

Malik MS., Sattar A., Khan SA., (1989). The fatty acids of indigenous resources from possible industrial applications. Part XVII: The fatty acid composition of the fixed oils of *Ocimum basilicum* and *Ocimum album* seeds. Pakistan J Set Ind Res. Vol (32). P: 207, 208.

Mann, J. ; Davidson, R. S. ; Hobbs, J. B. ; Banthorpe, D. V. ; Harborne, J. B., (1994) . *Natural Products*. Longman. Ch. 7, 389.

Marc T., Gerard W., et Denis L., (2001). Classification des antiinflammatoires. Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4ème Edition. P: 426.

Meriane F., (1991). Manuel d'hémostase (2ème Ed), Office des publications universitaires (Alger) ; pp: 35-36.

Messiaen, C.M., Blancard, D., Rouxel, F., and Lafon, R., (1991). Les maladies des plantes maraichères. 3e. Ed. INRA.P. 183-194,200-201.

Metzler DE., (2003). Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells, vol. 2, Elsevier Science ([ISBN 0-12-492541-3](#)), p. 1420–1471.

Mibindzou Mouellet A., (2005). Screening phtochimique de deux espèces de plantes : *Crotalia retusa* L (Papilionaceae) et *Hallea ciliata* Aubrev & Pellegrer (Rubiaceae) récoltées au Gabon. Thèse de Doctorat. Université de Bamako. Mali. P: 58-211.

Morelle J., (1988). "Peroxydes Lipidiques, Radicaux Libres, Vieillessement et Lipoaminoacide", Parf. Cosm. Arômes, V.80, 91-904.

Munier LR., (1968). La chromatographie sur couche mince : Principe et possibilités. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*. 16 (1-4). 12-34. P : 17.

Murase H., Nagao A., et Terao J., (1993). "Antioxidant and Antiemulsifying Activity of N-(Long Chain Acyl)-Histidine and N-(Long Chain Acyl)-Carnosine." *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V.41, 1601-04.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1997) Publication M27-A: Reference Methode for broth dilution antifongial susceptibility Testing of yeasts; Approved standard: Wayen, PA: NCCL,17:1__28.

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., & Killington R., (2000). L'essentiel en microbiologie. Betri. Paris .P. 210-216.

Novelli, G. P., (1997), "Role of free radicals in septic shock. J." *Physiol. Pharmacol*, 48: 517-527

O'Kennedy R., et Thomas RD.,(1997). coumarins: Biologie, application and mode of action. John Wiley & Sons, New York.

Oloyede O., (2005). Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4(6): 379-381.

Omulokoli E., Khan B., et Chhabra SC., (2000). Antiplasmodial activity of four kenyan médicinal plants. *J .pharmacol*, 133-137.

Ouibrahim A., (2015). Evaluation of antibacterial activity of *Laurus Nobilis L.*, *Rosmarinus officinalis L.*, and *Ocimum Basilicum L.* from Northeast of Algeria. *African Journal Of Microbiology Research*. Vol. 7(42) P: 4968-4973.

Peronny S., (2005) . *La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta)*. Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. Discipline Eco-Ethologie, p151.

Pousset. (2004). *Ocimum Basilicum*.

Pushpangadan P., et George V., (2012). Basil. *In: Handbook of Herbs and Spices*. Woodhead Publishing. P: 55-72.

Qing X.Li, Chiou L.Chang. (2016). Basil (*Ocimum basilicum* L.) Oils. Chapter 25. Pages 231-238.

Quideau S., Deffieux D., ;Casassus-Douat C., et Pouységu L.,(2011) .Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50(3):586–621.

Revel T., et Doghmi K., (2004). Physiologie de l'hémostase. *Encyclopédie Médico Chirurgicale*; 22-009-D-20

Riaz M., Qamars S., Choudhary FM., et Pack J., (1999). *Sci. Ind – Res*; Vol.6, P: 332.

Ribereau GP., (1968). Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris, p254.

Schauenberge P., (2006). Guide des plantes médicinales : Analyse, description et utilisation de 400 plantes ; Ed. Ferdinand ; Paris. P: 396.

Shasany AK., et Kole C., (2018). The *Ocimum* Genome, *Compendium of Plant Genomes*.ISSN 2199-4781. P : 1.

Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., et Liu,X .,(2004) .Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system, *crop.protect.* 23,243-247. doi: 10.1016/j.cropro. 2003.08.007

Sousa RR., Queiroz KC., Souza AC., Gurgueira SA., Augusto AC., Miranda MA., Peppelenbosch MP., Ferreira CV., Aoyama H., (2007). "Phosphoprotein levels.

Sreevidya, Narasimhan & Mehrotra.,(2003). Spectrophotometric Methode for Estimation of Alkaloids precipitable with dragendorff's Reagent in Plant materials.*J.AOAC.*;86, 1124_1127.

Tang, S.Z., Kerry, J.P., Sheehan, D., Buckley, D.J, (2002),"Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems". *Food Chem.*, 76(1): 45-51.

Thomas O.P., (2009). Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Université Nice Sophia Antipolis.

Trease E., et Evans W.C., (1987). Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13th ed.

Vermeris W., (2006).*Phénolic compound biochemistry*, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).

Verpoorte R., et Alferman AW., (2000). Métabolic engineering of plant secondary métabolisme,Ed :Kluwer academic,p :1-23.

Vijay P., Nivedita B., et Bellundagi A., (2013). Ethanobotany and Qualitative Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 4. P: 59-63.

Vogler AE., Siedlecki AC.,(2009).Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials* 30:1857–1869.

Walton NJ et Brown DE., (1999). chemicals from plants : perspectives on plant secondary products .

Wink, M.,(1999). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Sheffield, UK, and Boca Raton, FL: Sheffield Academic Press and CRC Press.

Yang J., Guo J., and Yuan J., (2008). In vitro antioxydant properties of rutin.LWT.41:1060-1066. (cited in Djemai Zoueglache S).

Yu R., Mandlekar S., Tony Kong., et A N., (2000). "Molecular mechanisms of butylated hydroxylanisoleinduced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c." *Molecular Pharmacology*, 58.

Webographie

<https://www.maxicours.com/>

(http://indexmedicus.afro.who.int/iah/fulltext/Thesis_Bamako/04P17.PDF)

<http://amoseeds.COM2022-06-29>

https://fr.wikipedia.org/wiki/Tanin-cité_note-isyeb-24

<http://www.istockphoto.com>

Inventaire national du patrimoine naturel <https://inpn.mnhn.fr/>