

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahlab Blida 1

Faculté Des Sciences

Département De Chimie



Mémoire Présenté Par
Bellahmer Hanane et Sadki Hayet

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Chimie des Produits Naturels

THEME

**PHYTOSCREENING ET VALORISATION DES
PROPRIETES PHOTOSENSIBILISANTES DES
FUROCOUMARINES**

Soutenu le 17/09/2019

MEMBRES DU JURY :

Mme O.Touafek	MCA	Université Blida 1	Présidente
Mme Z.Zeffouni	MAA	Université Blida1	Examinatrice
Mr H. Boutoumi	PROF	Université Blida1	Promoteur

Promotion 2018/2019

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, nous remercions le Dieu pour être notre meilleur confident, merci de nous avoir guidés, de nous avoir donné aussi la volonté et la force pour dépasser toutes les difficultés pour la réalisation de ce modeste travail.

Nous tenons remercier tout d'abord à notre encadreur le Professeur Boutoumi Houcine et la Co-promotrice Docteur Asma Driouèche pour nous avoir proposées ce thème de recherche et pour le temps qu'ils ont consacré à nous apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche.

Ainsi l'enseignement dispensé par le Master « CPN » a également su nourrir nos réflexions, merci donc aux enseignants-chercheurs.

Nos remerciements s'adressent également aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Que tous ceux, et ils sont nombreux qui de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail trouvent également ici l'expression de mon très profonde gratitude.

Dédicaces

Je ne trouve aucun mot ou expression, qui vont exprimer mes vifs sentiments de gratitude et remerciements je dédie ce travail

A ma mère

«Tu m'a donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tous ce que je peux offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte. En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée.»

A mon père

«L'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu te préserve et te procure santé et longue vie. »

A mes chères sœurs

*Salima et son marie Ahmed
Et leurs enfants Oumaima, Rokaya et Mosaab
Malika et son marie Hichem*

A mes chers frères

*Hassen, Abed Elhek ET Imbed Eddin
Pour leur affection, compréhension et amour.*

A mes chères amies

Ismahene, Sabrina, Roumayssa

A mon binôme

*Hanane
A toute ma famille, Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour
Que ce travail soit possible, je vous dis merci.*

HAYET

Dédicaces

A mes chers parents

*Sources de mes joies, secrets de ma force
Vous serez toujours le modèle
Papa, dans ta détermination, ta force et ton honnêteté
Maman dans ta bonté, ta patience et ton dévouement pour nous
Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants grandissent et prospèrent
Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie
Merci d'être tout simplement mes parents
C'est à vous que je dois ce travail
Et je suis fière de vous l'offrir.*

A mes sœurs

*Sabrina, Dounia, Sarah.
En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.
Je vous dédie ce travail*

A Mon frère

*Le bijou de la famille : Abd elmoncif
Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de
Fraternité et d'amour.*

A mes fidèles amies

Hamida, Dalia, Samah, Siham, Rofaida.

A mon binôme

*Hayat.
Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers vous.*

Hanane

« Il n'y a que deux conduites avec la vie ou on la rêve ou on l'accomplit »

« René Char »

Résumé

L'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances thérapeutiques. Dans ce contexte l'extraction des furocoumarines à partir de deux espèces de la famille des rutacées (*Citrus Sinensis*, *Citrus Limon*) et une de la famille des Apiacées (*Daucus Carotta*) de la région de Blida a été effectuée par deux méthodes différentes (Soxhlet et macération), en utilisant deux solvants l'éther de pétrole et le méthanol. Les résultats obtenus durant notre expérimentation ont montré que l'extrait polaire d'orange par soxhlet a fourni le rendement le plus élevé 2,84% suivi par l'extrait apolaire de citron et l'extrait polaire de la carotte sauvage qui était 0.33% et de 0.22 % respectivement. Les furocoumarines sont caractérisées par des taches fluorescentes sur CCM révélées sous UV et un large spectre d'absorption par spectroscopie UV-vis ; les extraits ont été caractérisés par IR et par RMN ^1H et ^{13}C . Le xanthotoxine a été révélée comme constituant pure de citron avec un rendement de 0.33%, ce dernier a été utilisé pour l'élaboration d'une membrane photosensibilisante à base de chitosane, la membrane synthétisée a été caractérisée par IR, RMN et DRX. Les produits extraits ont montré une bonne activité antibactérienne contre deux souches bactériennes *E. Coli* et *Staphylococcus* alors que l'activité antifongique a montré une résistance vis-à-vis *Aspergillus .Brazilicus*.

Mots clés : Extraction, Furocoumarines, Photosensibilisante, Chitosane, Activité antimicrobienne.

Abstract

The investigation of plants represents an inestimable potential for the discovery of new therapeutic substances. In this context, the extraction of furocoumarins from Rutaceae (*Citrus Sinensis*, *Citrus Limon*) and Apiaceae (*Daucus Carotta*) of the region of Blida was carried out by two different methods (Soxhlet and maceration), using two solvents petroleum ether and methanol. The results obtained during our experiment showed that the polar extract of orange using soxhlet provided the highest yield 2.84% followed by the apolar extract of lemon than polar extract of wild carrot which was 0.33% and 0.22% respectively. Furocoumarins are characterized by fluorescent spots on TLC revealed under UV, and a broad spectrum of UV-vis spectroscopy; pure extracts were characterized by IR and ^1H and ^{13}C NMR. Xanthotoxine was revealed as a pure component from lemon with a yield of 0.33%, and was used for elaboration of a photosensitizing membrane based on chitosan; the synthesized membrane was characterized by IR, NMR and XRD. The extracted products showed good antibacterial activity against two bacterial strains *E. coli* and *Staphylococcus* while the antifungal activity showed resistance to *Aspergillus .Brazilicus*.

Key words: Extraction, Furocoumarins, Photosensitizing, Chitosan, Antimicrobial activity.

Liste des tableaux

Tableau I.1 : quelques structures des furocoumarines linéaires.....	3
Tableau I.2 : Les grandes classes de biopolymères	24
Tableau II.1 : Classification botanique des oranges.....	29
Tableau II.3 : Classification botanique de la Citronnier.....	30
Tableau II.3 : Classification botanique de la Carotte sauvage	31
Tableau II.4: Quelques propriétés physico-chimiques des produits utilisés.....	32
Tableau II.5 : Les souches microbiennes utilisé.....	41
Tableau III.1: Résultats des tests phytochimiques des espèces (citron, orange, carotte sauvage).....	43
Tableau III.2 : Caractéristiques physiques et organoleptiques des furocoumarines extraite à partir d'écorces d'oranges.....	44
Tableau III.3: Résultats de la CCM des extraits d'oranges.....	45
Tableau III.4 : Caractéristiques physiques organoleptiques des furocoumarines extraite à partir d'écorces de citron.....	49
Tableau III.5 : Résultats de la CCM des extraits de citron.....	50
Tableau III.6: Caractéristiques physiques et organoleptiques des furocoumarines extraite a partir de la carotte sauvage.....	56
Tableau III.7 : Résultats de la CCM des extraits de la carotte sauvage.....	57
Tableau III.8: Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) par la méthode de disques des extraits d'orange à différentes concentrations.....	62

Listes des figures

Figure I.1: Structure chimique des principales furocoumarines linéaires et angulaires.....	3
Figure I.2 : <i>Ruta graveolens. L.</i>	5
Figure I.3 : <i>Dictamnus albus. L.</i>	5
Figure I.4: <i>Ficus carica</i>	6
Figure I.5: <i>Psoralea corylifolia</i>	7
Figure I.6: <i>Petroselinum</i> (persil).....	7
Figure I.7: <i>Apiumgraveolen</i> (céleri).....	7
Figure I.8: Le rayonnement ultraviolet.....	9
Figure I.9: Inflammation.....	10
Figure I.10: Le phénomène de photosensibilisation.....	10
Figure I.11: Psoriasis du cuir chevelu.....	14
Figure I.12: Traitement par la balnéothérapie.....	14
Figure I.13: Maladie de vitiligo et le traitement.....	15
Figure I.14: Traitement par La photochimiothérapie extracorporelle.....	16
Figure I.15: Schéma d'extraction par macération.....	18
Figure I.16: Extracteur soxhlet	19
Figure I.17: Schéma d'extraction assistée aux ultrasons.....	20
Figure I.18: L'appareillage d'extraction assistée par microondes.....	21
Figure I.19: L'appareillage d'extraction accélérée par solvant.....	21
Figure I.21 : Structure chimique du chitosane, chitine.....	24

Figure I.22: Schéma de synthèse des bases de Schiff supportées par le chitosane.....	26
Figure I.23: Synthèse d'o-carboxyméthyle bases de Schiff et chitosane.....	27
Figure II.1 : <i>Citrus sinensis</i> (L'oranger).....	30
Figure II.2: <i>Citrus limon</i> (Le Citronnier).....	31
Figure II.3 : <i>Daucus carotta L.</i> (carotte sauvage).....	32
Figure II.4 : Extraction par soxhlet.....	37
Figure II.5 : Evaporation des solvants.....	37
Figure II.6 : Avant la purification.....	38
Figure II.7 : Après la purification.....	38
Figure II.8 : dilution des extraits.....	42
Figure III.1 : La présence des coumarines dans l'orange, citron et carotte sauvage.....	44
Figure III.2 : Spectre UV des extraits apolaires par macération et soxhlet.....	46
Figure III.3 : Spectres IRTF des extraits apolaires par macération et soxhlet.....	47
Figure III.4 : Spectres UV des extraits polaires par macération et soxhlet.....	48
Figure III.5 : Spectres IRTF des extraits polaires par macération et soxhlet.....	49
Figure III.6 : Spectres UV des extraits apolaires par macération et soxhlet.....	51
Figure III.7 : Spectre IRTF des extraits apolaires par macération et soxhlet.....	52
Figure III.8 : Spectre RMNC13 de Xanthotoxine dans le DMSO-d.....	53
Figure III.9 : Spectre RMN proton de Xanthotoxine dans le DMSO-d.....	54
Figure III.10 : Spectre UV de l'extrait polaire par macération.....	55
Figure III.11: Spectre IRTF de l'extrait polaire par macération.....	55
Figure III.12 : Spectres UV des extraits apolaire par macération et soxhlet.....	58

Figure III.13 : Spectre IRTF d'extrait apolaire par macération.....	59
Figure III.14 : Spectre UV de l'extrait polaire par macération et soxhlet.....	60
Figure III.15 : Spectres IRTF des extraits polaire par macération et soxhlet.....	61
Figure III.16 : Les zones d'inhibition des extraits OMS et OES.....	62
Figure III.17 : Membrane photosensibilisante à base de chitosane.....	63
Figure III.18 : Spectres IRTF de chitosane et le chitosane-xanthotoxine.....	64
Figure III.19 : Diagrammes de DRX de Chitosane et chitosane-xanthotoxine.....	64
Figure III.20 : Spectre RMN proton de Chitosane-xanthotoxine dans le DMSO-d.....	65
Schéma II.1 : Le Schéma représente le principe d'extraction des furocoumarines par macération et soxhlet.....	39

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AM : Apolaire macération.

ARN : Acide Ribonucléique.

AS : Apolaire soxhlet.

ASE : Extraction accélérée par solvant.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

EAS : Extrait apolaire obtenu par soxhlet.

HPLC : Chromatographie liquide haute pression.

IR : Spectroscopie infrarouge.

MASE : Extraction assistée par microondes.

MOP : Méthoxypsoralène.

PM : Polaire macération.

PCE : La photochimiothérapie extracorporelle.

PS : Polaire soxhlet.

PUVA : Psoralène + Ultraviolets A.

RMN : Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

SFE : Extraction par fluide supercritique.

USAE : Extraction assistée aux ultrasons.

UV : Ultraviolet.

UVA : Ultraviolets A.

UVB : Ultraviolets B.

Table de matière

Résumé

Liste des tables

Liste des figures

Liste d'abréviations

Introduction générale.....1

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les furocoumarines.....02

1.1. Rappel historique.....02

1.2. Nature chimique.....02

2. les furocoumarines ans la règne végétal04

2.1. Ressources naturelles en furocoumarines.....04

2.2. Localisation au sein d'une plante.....08

3. Propriétés physico-chimiques des furocoumarines.....08

4. Propriétés biologiques des furocoumarines09

5. Usages des furocoumarines13

6. Méthodes d'extraction.....17

6.1. Les méthodes classiques.....18

6.2. Les méthodes alternatives19

7. Généralités sur les biopolymères.....22

8. la modification chimique.....25

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1. Matériel29

1.1 Matériel végétal	29
1.2. Produits chimiques.....	32
1.3. Matériels d'analyses	33
2. Extraction	34
2.1. Méthodes d'extraction	34
3. Screening Photochimiques.....	38
4. Activité antibactérienne et antifongique.....	40
5. Préparation d'une membrane photosensibilisante a base de chitosane	40

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude phytochimique.....	43
2. Extraction des furocoumarines	44
2.1. Extraction des furocoumarines à partir des écorces d'oranges.....	44
2.2. Extraction des furocoumarines à partir des écorces de citron	49
2.3. Extraction des furocoumarines à partir de la carotte sauvage.....	56
3. Résultats du test du pouvoir antibactérien et antifongique	61
4. Elaboration d'une membrane photosensibilisante à base de chitosane.....	63
Références.....	68
Annexe.....	73

Introduction générale

L'utilisation des plantes a toujours été une pratique courante dans notre vie, non seulement pour nos besoins alimentaires, mais aussi dans la médecine, l'élaboration de parfums, de colorants ou d'insecticides [1]. Pour se protéger en plus des barrières physiques, les plantes ont élaboré des systèmes de défense basés sur la production de molécules plus ou moins toxiques. Ces composés naturels sont issus du métabolisme de la plante et sont appelés métabolites secondaires ou encore métabolites spécialisés [2]. Parmi ces composés on retrouve les furocoumarines ; la synthèse de ces derniers est très difficile et coûteuse. Pour cela ces molécules photosensibilisantes ont été recherchées dans des espèces naturelles y compris certaines généralement consommées par l'homme (orange, citron). Elles ont été principalement décrites dans quatre familles de plantes, les Rutaceae, Moraceae, Apiaceae et Fabacées [3]. D'une autre part, les furocoumarines sont utilisées pour traiter le vitiligo, le psoriasis et d'autres affections cutanées par traitement au psoralène et aux UVA (PUVA). L'objectif du présent travail est l'élaboration d'une membrane photosensibilisante à base d'un biopolymère cristallin modifié par un furocoumarine dans le but de diminuer sa cristallinité et de l'utiliser dans différents domaines.

Ainsi ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres, dans le premier chapitre, une étude bibliographique est menée sur une présentation générale des furocoumarines et leurs propriétés physico-chimiques et biologiques, ensuite on présentera leurs différentes sources végétales et procédés d'extraction. La dernière partie est consacrée à des généralités sur les biopolymères. Dans le deuxième chapitre, nous détaillerons l'outil méthodologique utilisé :

- Extraction des furocoumarines à partir des écorces d'orange, de citron et de la carotte sauvage par deux méthodes différentes.
- caractérisation physico-chimique et organoleptique des extraits obtenus et l'étude de leur pouvoir antibactérien.
- Elaboration et caractérisation d'un film photosensibilisant à base de xanthotoxine extraite et du chitosane.

Dans le troisième chapitre nous discutons les résultats obtenus. À la fin nous terminons par une conclusion et des perspectives.

Partie théorique

1. LES FUROCOUMARINES

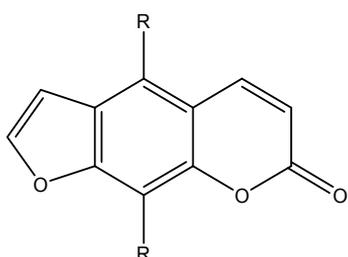
1.1. Historique

Les furocoumarines sont des molécules qui ont été utilisées depuis les temps les plus reculés de l'Antiquité pour le traitement de certaines affections de la peau. Le texte le plus ancien sur la question retrouvé à ce jour est un livre sacré hindou du nom d'Atharvaveda datant de 1500 ans avant J.C. On y trouve une thérapie du vitiligo (dépigmentation de la peau) à base d'une poudre de plante, maintenant répertoriée sous le nom de *Psoralea coylifolia* dont le principe actif désormais reconnu est une furocoumarine (le psoralène). Selon le même principe, la médecine populaire de la vallée du Nil a utilisée pendant des siècles l'espèce végétale *Ammi majus* contre la même affection. On peut retrouver la trace dans le livre d'un érudit arabe datant du 13^{ème} siècle [4]. Dans la culture occidentale, la référence la plus ancienne aux furocoumarines que l'on connaisse, fait allusion à certains de leurs effets nocifs. Il s'agit d'un conte allemand du 18^{ème} siècle dans lequel le "petit Muck" est atteint d'une photodermatite après avoir mangé des figues, dont la richesse en furocoumarines est aujourd'hui bien connue, et s'être exposé au soleil [5]. Cependant, même si les furocoumarines ont été employées traditionnellement par les médecines populaires, la renaissance de leur intérêt au sein de la science moderne n'a même pas cinquante ans. Lors d'une première étape en 1834, un chercheur du nom de Kalbrunner avait isolé la molécule de bergaptène (ou 5-méthoxypsoralène) à partir d'huile de bergamote mais aucune relation n'avait encore été établie entre ce nouveau composé et les propriétés médicales potentielles qu'il possédait. La véritable redécouverte des possibilités thérapeutiques des furocoumarines remonte aux années 1938-1940 où Kuske a pu les identifier comme agents chimiques responsables de photodermatites chez certains végétaux [6].

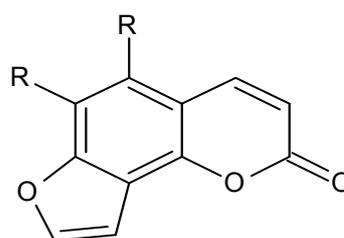
1.2. Nature chimique

Les furocoumarines ou furanocoumarines l'un de dispositif de défense chimique ingénieux produit par une variété de plantes, qui ont pour caractère de devenir toxique que lorsqu'elles sont exposées aux rayons ultraviolet cette classe de composés chimiques organiques sont des molécules tricycliques, obtenue par la fusion de deux hétérocycles, coumarine (ou benzo-alpha-pyrone) et furane. La position du cycle furane permet de distinguer deux types de furocoumarines (Fig. I.1) Les linéaires dont la forme de base est le psoralène et les angulaires représentées par l'angélicine) [4]. Constituent une classe de molécules abondantes, où chaque membre se distingue par la présence de divers groupements (hydroxy, alkoxy,

géranyloxy...) [4]. Les furocoumarines linéaires les plus communes sont des dérivés méthoxylés du psoralène Le (5-méthoxypsoralène ou bergaptène) (5-MOP), le (8-méthoxypsoralène ou xanthotoxine) (8-MOP) et le (5-8-diméthoxypsoralène ou isopimpinelline) (5-8-MOP) [4]. La plupart de ces molécules ont cependant des dénominations reprenant le nom des plantes dans lesquelles elles ont été décrites pour la première fois (le bergaptène présent dans *Citrus bergamia*, la rutarétine ou la rutarine dans *Ruta graveolens*), ou bien encore liées à leurs propriétés (la xanthotoxine pour sa couleur et son activité biologique) [5].



La forme linéaire

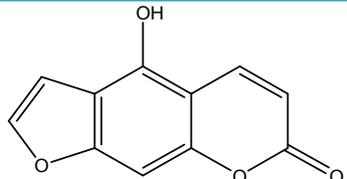
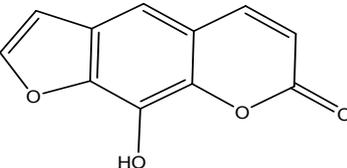
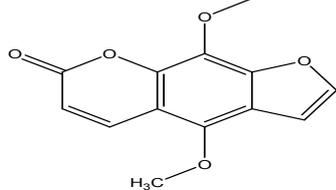
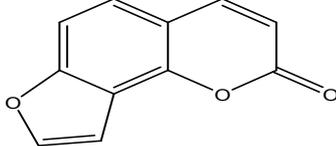
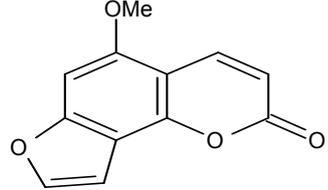
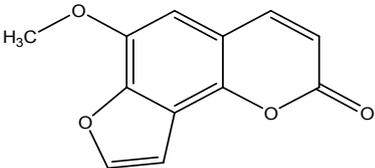


La forme angulaire

Figure I.1 : les deux formes des furocoumarines

Tableau I.1 : Structure chimique de quelques furocoumarines.

Nom de composé	Structure
Psoralène	
Bergaptène (5-MOP)	
Xanthotoxine (8-MOP)	

Bergaptol	
Xanthotoxol	
Isopimpinelline	
Angélicine	
Isobergaptène	
Sphondine	

2. LES FUROCOUMARINES DANS LE REGNE VEGETAL

2.1. Ressources naturelles en furocoumarines

La plupart des furocoumarines naturelles ont été isolées à ce jour à partir de végétaux, bien que quelques champignons aient également la possibilité d'en synthétiser [18]. On retrouve les furocoumarines majoritairement dans 4 familles taxonomiques: Légumineuses, les Moracées, les Rutacées et les Apiacées, La répartition en furocoumarines varie d'une famille à l'autre [19]. Les plantes ayant des profils enzymatiques similaires contiennent une quantité comparable de métabolites secondaires qui sont le produit de réactions chimiques induites par ces enzymes [20]. Ainsi, le contenu en furocoumarines, selon les espèces, variétés et formes, peut contribuer à meilleure distinction et une meilleure compréhension de la taxonomie des genres dans lesquels ils sont présents [21].

2.1.1. Rutacées

La famille des Rutacées est une famille de plantes dicotylédones. Selon Watson & Dallwitz, elle comprend 900 espèces réparties en 150 genres. Aujourd'hui la famille est plus grande. Ce sont des arbres, des arbustes ou plus rarement des plantes herbacées des régions tempérées à tropicales, producteurs d'huiles essentielles. Les agrumes appartiennent à cette famille [22]. On citera dans cette famille : le genre *Dictamnus*, le genre *Ruta*, des espèces du genre *Citrus*.



Figure I.2 : *Rutagraveolens.l.*



Figure I.3 : *Dictamnus albus.l.*

Parmi les espèces de *Citrus* les plus connus on peut également citer : le Bigaradier, le Bergamotier, le Citronnier, le Limettier, le Cédratier, le Clémentinier, le Mandarinier, l'Oranger doux et le Pomelo [22]. Toutes les huiles essentielles de famille des citrus extraites des zestes comporte une teneur élevée furocoumarines, à titre exemple, on peut citer les huiles essentielles extraites des zestes d'orange amère (*citrus aurantium*), de l'orange douce (*citrus sinensis*), de la mandarine (*citrus reticulata*), de bergamote (*citrus bergamia*), de la limette ou citron vert (*citrus limetta*), du pamplemousse (*citrus paradisi*) [23]. Dans le cas du genre *Ruta*, 4 furocoumarines linéaires ont été décrites : le psoralène, le 5-methoxy-psoralène (encore appelé 5-MOP ou bergaptène), le 8-methoxy-psoralène (8-MOP, ou xanthotoxine) et le 5-8-methoxy-psoralène (5-8-MOP ou isopimpinelline). D'autres furocoumarines plus anecdotiques ont été décrites chez *Ruta graveolens* comme l'oxypeucedanine. Les Citrus contiennent généralement du 5-MOP ainsi que d'autres furocoumarines linéaires (bergamotine et bergaptol dans la bergamote, phellopterine dans *Citrus limonum*, 5-8-MOP dans *Citrus acida*) [24]. La principale furocoumarine présente dans le pamplemousse (*Citrus paradisi*) comprennent la bergamottine [23]. L'huile de bergamote est la source la plus utilisée pour l'extraction de bergaptène (5-MOP), molécule ayant un intérêt thérapeutique majeur [23].

2.1.2. Les moracées

C'est une famille de plantes ligneuses majoritairement tropicales et subtropicales. La Plupart des espèces sont du genre *Ficus*. La caractéristique commune aux Moracées est la présence de latex blanchâtre ou transparent dans les tissus, Les fleurs, petites et unisexuées, sont disposées en capitule sur des réceptacles creux ou aplatis, ou en chatons, Les fruits sont souvent composés (syncarpes) charnus suite au développement de leur réceptacle. On s'intéressera dans ce paragraphe à une espèce cultivée pour ses syncarpes comestibles, les Figuiers [22].



Figure I.4 : *Ficus carica* (figuier).

La présence de Bergaptène (5-MOP) a été décrite pour toutes les espèces de Moraceae étudiées tandis que le Psoralène n'a été mis en évidence que dans 7 des 11 espèces analysées. D'autre part, la présence de Xanthotoxine (8-MOP) n'a été montrée que chez *Ficus carica*. De ce fait, le 5-MOP et le Psoralène sont les furocoumarines les plus représenté [24].

2.1.3. Les fabacées ou légumineuses

C'est une famille de plantes ligneuses en région tropicale et de plantes herbacées dans nos régions, Les feuilles sont souvent alternes avec des stipules a la base. Elles sont le plus souvent composées. Les fleurs généralement disposées en grappes sont spécifiques. Le calice et la corolle comprennent cinq divisions. On va s'intéresser à une espèce de cette famille : Le Psoralier, dérivé du coumestrol [22].



Figure I.5 : *Psoralea corylifolia*.

Dans la famille très étendue des légumineuses, seuls deux genres de plantes sont réputées contenir des furocoumarines : *Psoralea* et *Ruta Chalepensis* .*L. oralène*. Ces plantes contiennent les furocoumarines linéaires et angulaires les plus simples, à savoir le psoralène et l'angélicine. Alors que ces deux molécules ont été mises en évidence dans la plupart des espèces de *Psoralea* étudiées, certaines *Coronilla*, comme *C. juncea* et *C. scorpioides*, ne contiennent pas d'angélicine [24].

2.1.4. Apiacées

C'est une famille de plantes herbacées, parfois arbustives, cosmopolites, plus communes dans les régions montagneuses tempérées. Les Apiacées sont caractérisées par un port particulier : les fleurs sont disposées en ombelles simples ou composées. L'inflorescence est rarement réduite à une fleur. Cette structure comprend une ombelle de premier ordre à l'extérieur du pédoncule et chaque rayon porte une ombellule (ombelle de second ordre) [16]. On citera dans cette famille : Carotte sauvage, Le céleri, Le persil, panais sauvage, L'Angélique vraie, La Berce du Caucase ou Berce geante, *Heracleum sosnowskyi* Manden [22].



Figure I.6: *Petroselinum* (persil)



Figure I.7 : *Apiumgraveolen* (céleri).

Des chercheurs ont examiné la distribution relative des furocoumarines dans le céleri (*Apium graveolens* L). La concentration totale dans les tiges de céleri dépasse rarement 1,3 mg / kg de poids frais [18]. Des concentrations plus élevées de furocoumarines ont été trouvées sur des feuilles et des lames de céleri à l'aide de chromatographie liquide en phase inverse à hautes performances pour séparer et quantifier les composés. Les quantités détectées étaient de 0,15 et 0,11 mg / kg de psoralène frais, et 3,5 et 2,1 mg / kg de 8-méthoxypsoralène et 1,5 et 0,32 mg / kg de 5-méthoxypsoralène, le premier des chiffres se rapportant à chaque fois aux feuilles et le dernier aux lames. Des furocoumarines similaires, identifiées comme 4, 5,8-triméthylpsoralène, 5-méthoxypsoralène et 8-méthoxypsoralène, sont également présentes dans *Pastinaca sativa* (racine de panais) [26]. C'est chez les Apiaceae que les furocoumarines sont le plus représentées. A l'heure actuelle, ces molécules ont été identifiées dans plus de 35 espèces différentes, le profil de distribution des furocoumarines est très complexe dans cette famille de plantes. La plus part de ces plantes renferment 4 furocoumarines linéaires : le 5-MOP, le 8-MOP, le 5-8-MOP, et l'imperatorine. Le psoralène, qui est un précurseur de toutes ces molécules, n'a été détectée qu'en faible quantité dans certaines espèces, ceci étant vraisemblablement lié aux méthodes de détection utilisées par les auteurs Berenbaum et Feeny. D'autres furocoumarines linéaires ont également été mises en évidence dans certaines espèces. La présence d'Angélicine a été montrée dans *Angelica archangelica*, plante qui a donné son nom à la molécule [24].

2.2. Localisation des furocoumarines dans la plante

Les furocoumarines sont principalement localisées au niveau des jeunes feuilles, des racines, des fruits et des graines. Le rôle de protection des furocoumarines explique principalement cette localisation au niveau des organes sujets à la prédation. Cette synthèse de furocoumarines est inductible chez certaines espèces comme le céleri (*Apium graveolens*). Un stress environnemental ou un bioagresseur engendre rapidement la synthèse de furocoumarines chez le céleri. Chez d'autres plantes, la synthèse de furocoumarines se fait de manière constitutive, comme chez la rue [18].

3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES FUROCOUMARINES

Les furocoumarines présentent une meilleure solubilité dans les solvants aprotiques apolaires tels que le chloroforme, ainsi que dans certains solvants aprotiques polaires tels que le méthanol le diméthylsulfoxyde (DMSO) [3]. Il est possible de caractériser de manière précise

les différentes furocoumarines par des techniques de chromatographie sur couche mince (CCM), de chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou de spectrométrie de masse (SM) [3]. Les cycles aromatiques constituant les furocoumarines attribuent à celle-ci une forte absorbance des longueurs d'onde comprises entre 250 et 320 nm [6].

4. PROPRIETES BIOLOGIQUES DES FUROCOUMARINES

En raison de leurs activités biologiques, les furanocoumarines sont des composés très intéressants et largement étudié.

4.1. La photosensibilisation

Le Soleil émet une énergie sous forme d'un rayonnement électromagnétique qui est transmis à la Terre au moyen d'ondes. Cette énergie est véhiculée par des particules sans masse appelées «photons » [8].

4.1.1. Le rayonnement ultraviolet

Il s'agit d'un rayonnement électromagnétique non ionisant, constitué de photons, et caractérisé par des longueurs d'ondes comprises entre 200 et 400 nm. On distingue classiquement :

- Les UV-C de longueurs d'ondes comprises entre 200 et 290 nm.
- Les UV-B de 290 à 320 nm.
- Les UV-A aujourd'hui subdivisés en UV-A2, de 320 à 340 nm et en UV-A1, de 340 à 400 nm [5].

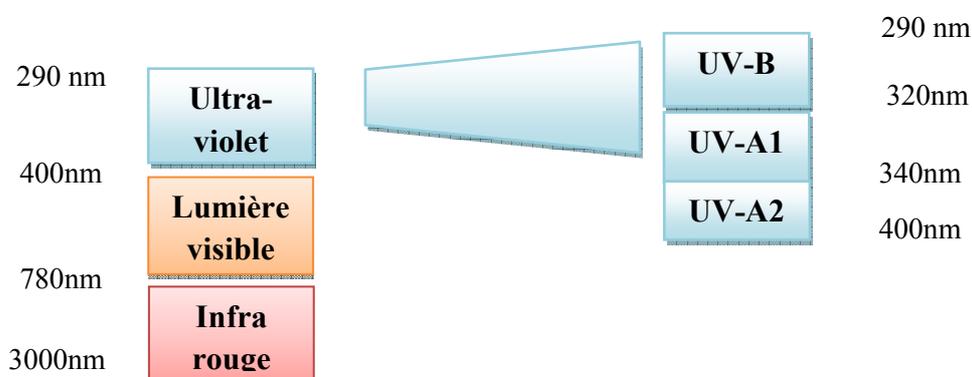


Figure I.8: Le rayonnement ultraviolet.

4.1.2. Le phénomène de photosensibilisation

C'est la sensibilisation de la peau par l'ensemble des phénomènes pathologiques suite De l'interaction entre le rayonnement solaire et une substance photosensibilisante contenue dans la peau. C'est le cas des furocoumarines sont des substances capable d'absorber des photons, encore appelée chromophore, peut provenir de la prise de médicaments (voie systémique) ainsi que d'une application locale (cosmétiques, médicaments, végétaux...) [4]. Une molécule photosensibilisante nécessite, pour être activée, une lumière de longueurs d'ondes efficaces (pénétrant profondément la peau) situées dans l'UV-A, l'UV-B et le visible. Généralement, ce sont les rayons de longueurs d'ondes supérieures à 310 nm, pénétrant la peau en profondeur [8].



Figure I. 9: l'inflammation.

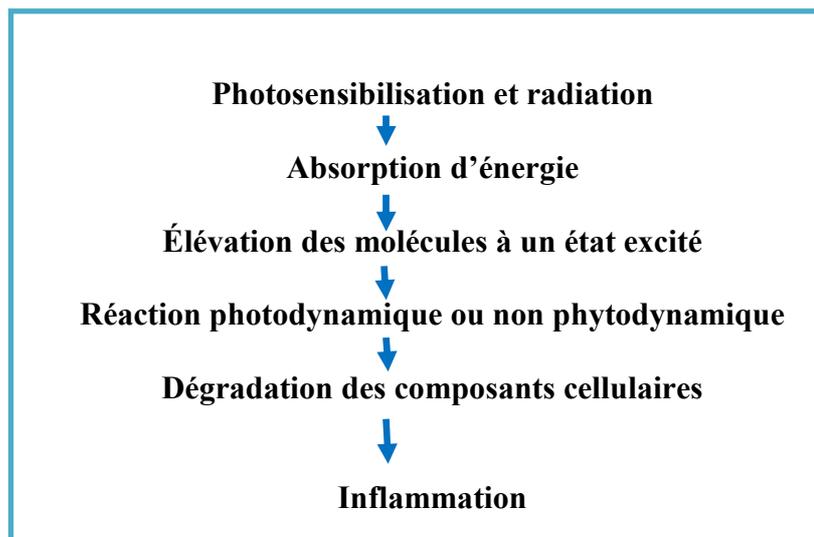


Figure I.10 : Le phénomène de photosensibilisation.

4.2. Molécules protectrices contre les pathogènes et les herbivores

Les furocoumarines sont des agents protecteurs contre les herbivores et pathogènes. De nombreuses études *in vitro* ont confirmé la nocivité des furocoumarines pour les pathogènes et microorganismes. Par exemple, des furocoumarines contenues dans les graines d'*Heracleum laciniatum* inhibent la croissance *in vitro* du champignon *Cladosporium*. La présence de furocoumarines dans ces graines présente un avantage adaptatif certain face aux micro-organismes qui menacent l'embryon au moment de la germination [9]. Ces molécules sont encore retrouvées en plus grande quantité dans les plantes infectées par des micro-organismes ou des virus, c'est le cas par exemple, lors de l'inoculation de *Glehnia littoralis* par *Pseudomonas cichorii*, ou de l'infection du céleri par le virus de la mosaïque du céleri [9]. Les furocoumarines sont également efficaces contre les insectes. Cependant, ces derniers ont parfois acquis la capacité à contourner le système de détoxification enzymatique d'insectes [9]. En effet, les furocoumarines linéaires sont reconnues pour être plus efficaces en mélange car il semble que les enzymes de détoxification soient spécifiques d'une furocoumarine. Si une autre furocoumarine se fixe sur cette enzyme, elle bloque irréversiblement la métabolisation de la première. De plus, le mélange de furocoumarines linéaires et d'une faible part de furocoumarines angulaires est plus efficace contre insectes qui métabolisent les furocoumarines linéaires. Les furocoumarines angulaires ne montrent pas de bi-additions avec l'ADN comme les furocoumarines linéaires. Cependant, elles semblent agir en synergie pour contrer l'adaptation aux furocoumarines linéaires par des insectes spécialisés [9].

4.3. Effets allélopathiques des furocoumarines

BASKIN et son équipe ont été les premiers à étudier les effets allélopathiques des furocoumarines, notamment en montrant les propriétés anti-germinatives des furocoumarines situées dans les graines de *Psoralea subacaulis*. Beaucoup d'études ont été ensuite réalisées pour montrer que les furocoumarines confèrent des propriétés allélopathiques aux plantes qui les produisent. Par exemple, les furocoumarines de la Rue officinale (*Ruta graveolens* .L) retardent la germination de graines de radis et diminuent le taux de germination, surtout en présence de lumière. La xanthotoxine et le bergaptène ont notamment été testés, c'est le bergaptène qui montre le plus fort pourcentage d'inhibition de germination. L'isopimpinelline et le bergaptène de graines d'*Heracleum aciniatum* ont aussi inhibé la germination de graine de laitue. Dans ce cas, l'action synergétique des différentes furocoumarines présentes a été testée, mais aucun effet spécifique n'a été observé [9].

4.4. Activité anticancéreuse

Les furocoumarines présentent également des activités anticancéreuses contre de nombreux types de cancer, y compris le cancer du sein, cancer de la peau et leucémie. Le cancer du sein est la seconde principale cause de décès chez les femmes du monde entier, la Société Américaine de cancer a rapporté environ 231 840 nouveaux cas de cancer mortel pour les femmes d'États-Unis. Le traitement typique du cancer du sein comprend la chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. Des études ont suggéré que les composés phytochimiques isolés à partir des agrumes présentent un potentiel prometteur pour la prévention ou le retard du développement du cancer du sein. Le principal dérivé de furanocoumarines de pamplemousse est le psoralène, présente un effet inhibiteur sur la croissance des cellules cancéreuses du sein [10].

4.5. Activité antioxydante

Un radical libre est une molécule, un atome ou un ion qui possède un ou plusieurs électrons non appariés. Au cours de la pathogenèse de maladies chroniques, la surproduction de radicaux libres dans les tissus provoque une oxydation dommages causés aux lipides, aux protéines et à l'ADN en raison de sa réactivité élevée vers d'autres molécules. Ainsi, la réduction des oxydants stress par balayage de radicaux libres est reconnu comme une stratégie prometteuse de produits phytochimiques pour prévenir ou retarder la apparition de maladies chroniques. Les activités antioxydantes des flavonoïdes et coumarines ont été comparées dans différentes expériences in vitro [10]. Bien que le bergaptène a montré des activités antioxydantes plus faibles que les flavonoïdes dans un dosage de blanchiment à l'acide b-carotène-linoléique et au superoxyde, cependant il a des activités contre les lipoprotéines de basse densité, induites par l'oxydation de cuivre chez le hamster. Il a également été signalé que le L'effet de Bergaptène sur la peroxydation des lipides dans le cerveau du rat était semblable à son précurseur, Le temps d'initiation de bergaptène pour la formation de diène conjugué à base de cuivre était comparable à celle de la naringine et de son aglycone [10].

4.6. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un processus biologique complexe en réponse lésion tissulaire, agents pathogènes ou stimulation chimique. L'inflammation chronique est positivement liée à plusieurs maladies chroniques, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète et

les maladies neurodégénératives. En 2015, les chercheurs ont comparé les activités anti-inflammatoires de constituants isolés des parties aériennes ou racines d'*Angelica acutiloba* en utilisant le modèle cellulaire RAW 264.7 stimulé par les lipopolysaccharide. En utilisant Chromatographie sur colonne, quatre composés Zligustilide, falcarindiol et bergaptol ont été identifiés. Par comparaison, le bergaptol présentait de bonnes activités anti-inflammatoires dans les cellules RAW 264.7 par l'atténuation de la production de nitrites, de prostaglandine. L'activité anti-inflammatoire du bergaptol a pris son origine dans une partie de la régulation à la hausse de l'hème oxygénase-1, qui joue un rôle protecteur contre les réponses inflammatoires en élevant l'activité antioxydante [10].

4.7. Photooxydation et photolyse

En présence d'un rayonnement UVA (320-400 nm), les furocoumarines sont susceptibles de subir des réactions de Photooxydation, pouvant générer des espèces oxygénées réactives ($1O_2$, HO_2 , H_2O^*) impliquées dans l'apoptose cellulaire. Il a également été montré que le psoralène et la xanthotoxine peuvent subir des réactions de photolyse engendrant la formation de produits toxiques tels que des aldéhydes, des acides carboxyliques et du peroxyde d'hydrogène. La formation de ces produits et en particulier des aldéhydes, pourrait être à l'origine du caractère phototoxique des furocoumarines [7].

4.8. Photoactivation et photocycloadditions

L'une des principales caractéristiques des furocoumarines est leur capacité à réagir sous l'action de la lumière. Ces molécules peuvent être photoactivées par certaines radiations U.V. proches du domaine du visible cependant, la propriété biologique la plus remarquable résultant de la photo activation est leur fixation sur les bases pyrimidiques des acides nucléiques (ADN et ARN) ont aussi la capacité de se fixer à différentes macromolécules dans la cellule [7].

5. LES USAGES DES FUROCOUMARINES

Les furocoumarines présentent un large spectre d'utilisation, depuis des siècles les anciens égyptiens et indiens médecins utilisaient des extraits de feuilles, de graines ou de racines de plantes contenant des furocoumarines pour la guérison du vitiligo. Ces préparations ont été appliqués sur la peau ou ingérés et le patient a ensuite été exposé au soleil [11].

5.1. Photothérapie par UVA dans le traitement de psoriasis

La Psoriasis est le renouvellement accéléré de l'épiderme du point de vue histopathologique, avec des modifications des ARN et ADN, les furocoumarines ont la capacité de se fixer sur l'ADN en présence d'un rayonnement UV, modifiant alors sa structure, ce qui empêche sa réplication et donc la prolifération des cellules. Ce phénomène a été détourné dans le but de traiter cette maladie. Cette thérapeutique est appelée Puvathérapie pour Psoralène UVA thérapie elle est indiquée chez les patients de plus de 16 ans, pour traiter des psoriasis étendus ou des psoriasis sévères. Elle n'est possible qu'avec la prise d'un médicament photosensibilisant la MELADININE® ou le PSORADERM V®. Ces molécules photomutagènes s'intercalent dans les sites hydrophobes de l'ADN, et quand elles absorbent un photon, elles créent une liaison covalente puis un pont entre les deux brins, inhibant ainsi la mitose d'où leur action antiproliférative. Les UVA sont libérés par des lampes à vapeur de mercure basse pression avec émission d'UVA dit long (320-400 nm) dont un pic est situé à 365 nm. Ces lampes sont placées dans des cabines pour une irradiation corporelle totale [12]. La prise de psoralène peut-être administrée sous forme d'un bain à 37°C contenant la solution. On parle alors de balnéo-PUVA thérapie de plus, c'est la seule Puvathérapie qui pourra être utilisée chez les patients présentant une insuffisance hépatique ou rénale grave [12].



Figure I.11 : psoriasis du cuir chevelu.

Figure I.12 : Traitement par la balnéothérapie.

5.2. Photothérapie par UVA dans le traitement de vitiligo

Le Vitiligo est une dermatose multifactorielle, caractérisée par l'apparition des zones de peau plus ou moins dépigmentées, l'apparition de ces zones de peau dépigmentées est le résultat d'une disparition progressive des mélanocytes. La PUVA thérapie consiste en l'administration par voie orale de Psoralène qui est un photosensibilisant, et l'irradiation à un rayonnement

UVA de 320-340 nm, la séance de photothérapie par rayonnement UVA peut débuter ; pour cela le patient est placé dans une cabine avec des ampoules qui émettent le rayonnement UVA. L'intensité du rayonnement UVA auquel le patient est exposé, est augmentée progressivement ; on débute le rayonnement à 2.5 Joules/cm² et on peut l'augmenter jusqu'à 4,5 Joules/cm². La photothérapie repose sur l'interaction entre le psoralène et le rayonnement UVA qui forme au niveau de l'épiderme des adduits d'ADN. La formation de ces adduits provoque un ralentissement de la prolifération des kératinocytes, une immunosuppression au niveau cutané [13].



Figure I.13 : la maladie de vitiligo avant et après la photothérapie par UVA.

5.3. La photochimiothérapie extracorporelle

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) consiste en une manipulation ex vivo de cellules humaines. Les cellules mononuclées du malade sont prélevées, traitées ex vivo par méthoxypsoralène et irradiation UVA, avant d'être réinjectées. Un double abord veineux périphérique est mis en place au niveau des avant-bras du malade. Puis le sang veineux est prélevé par centrifugation et, après passage dans un séparateur cellulaire, les leucocytes sont recueillis dans une poche. Les globules rouges, les plaquettes et le plasma sont réinjectés en continu au malade. La poche de leucaphérèse est ensuite traitée par addition de 8-méthoxypsoralène soluble et irradiation UVA avant d'être réinjectée au malade. Ce traitement est pratiquement une auto vaccination contre les mêmes lymphocytes; parce qu'ils sont spécifiques à la maladie[14].

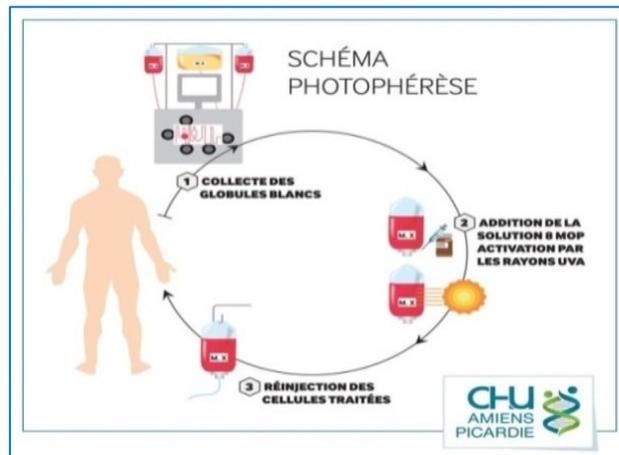


Figure I.14 : Traitement par la photochimiothérapie extracorporelle.

5.4. Désinfection de l'eau par photosensibilisation

Tout en étant libéré de la contrainte liée à la saturation du milieu en oxygène, l'étude des huiles essentielles extraites de plantes de la famille des Rutacées a montré une inhibition Complète des coliformes fécaux présents dans l'eau après deux heures d'ensoleillement pour *Citrus reticulata* et *Citrus limonum* et une heure d'ensoleillement pour *Citrus bergamia*. L'examen de cette dernière huile en spectrométrie de masse a mis en évidence la présence de méthoxy-5 psoralène (5-MOP), responsable de l'activité photosensibilisatrice utilisé en solution dans l'eau, le (5-MOP) a confirmé son rôle de photosensibilisateur et son efficacité désinfectante avec un abattement de 4 unités logarithmiques pour les Coliformes fécaux après une heure d'exposition et de 3 unités logarithmiques pour les Entérocoques fécaux après seulement 5 minutes d'exposition. La fixation du (5-MOP) sur un support solide a permis de récupérer le photosensibilisateur après usage tout en conservant son pouvoir désinfectant supérieur à la forme libre. Le dispositif (5-MOP) polystyrène a permis d'observer une inhibition complète des Coliformes fécaux après seulement six minutes d'exposition et deux minutes pour les Entérocoques fécaux [11].

5.5. Autres usages des furocoumarines

D'autres essais cliniques semblent montrer que les produits photolysés du psoralène à faible concentration, mis en contact avec les précurseurs des cellules érythroïdes, stimulent la formation d'hémoglobine A et F. Cette découverte pourrait être à l'origine d'une alter native dans le traitement de la β -thalassémie, et d'autres Plusieurs études ont montré les Propriétés anticancéreuses des furocoumarines le rôle bénéfique des furocoumarines dans la prévention

et même la guérison de certains cancers. Par exemple, le 8-géranxyloxy-psoralène, la bergamottine et la 5-géranxyloxy-7-méthoxycoumarine interviennent dans des phénomènes d'inhibition de la carcinogénèse, via l'inhibition de la synthèse d'oxyde d'azote, toxique pour les cellules. L'inhibition de certains cytochromes P450 par des furocoumarines comme l'impératorine et l'isopimpinelline, a aussi un effet inhibiteur sur la carcinogénèse dans des glandes mammaires de souris [15]. À côté des propriétés photosensibilisantes des furocoumarines utilisés en dermatologie les psoralènes notamment le 5-MOP ont montré des propriétés stimulantes sur la sécrétion de mélatonine par la glande pénale en fondant les travaux de Chen et ses collaborateurs. Sur l'hypothèse chronobiologique de la dépression ils ont montré que l'administration de 5-MOP chez des sujets dépressifs entraînant une amélioration sensible de leurs symptômes [16]. En particulier les furocoumarines linéaires bifonctionnelles sont également été utilisées dans l'étude des structures secondaires de l'ADN circulaire de l'acide ribonucléique (ARN) [17].

6. METHODES D'EXTRACTION

L'extraction est la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs, traditionnellement l'eau, les huiles végétales ou les graisses animales. Les produits ainsi obtenus sont relativement impurs sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales [27]. Les différentes méthodes d'extractions sont :

6.1. Les méthodes classiques

Les techniques classiques pour l'extraction par solvants de molécules actives à partir des matrices végétales sont basées sur le choix du solvant couplé à la température et/ou à l'agitation. Les techniques classiques existantes permettant d'extraire ces principes actifs incluent : Soxhlet et la macération avec différents solvants [28].

6.1.1. Macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de

l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction. La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint [27].

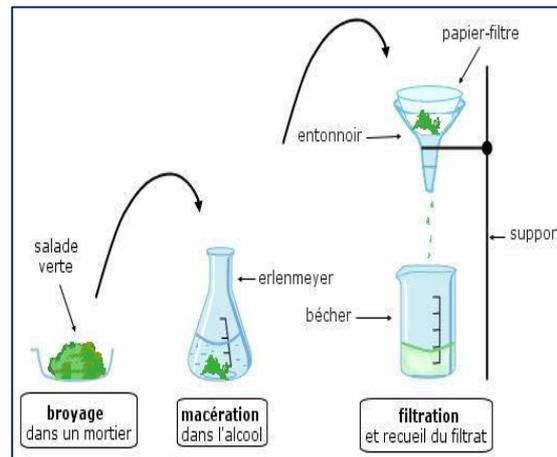


Figure I.15 : schéma d'extraction par macération.

6.1.2 L'extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Le Soxhlet est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à l'épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt [29].

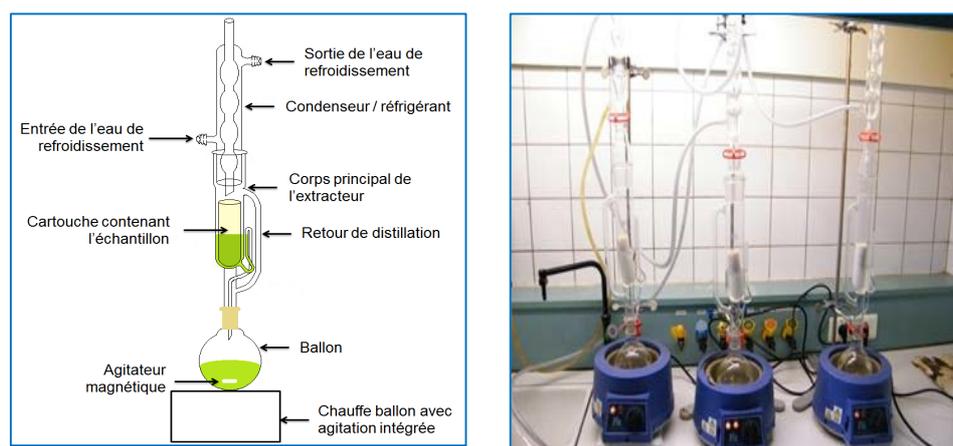


Figure I.16 : Un extracteur Soxhlet.

6.2. Les méthodes alternatives

L'extraction de molécules issues du matériel végétal ou ligneux par les techniques conventionnelles se révèle être une étape souvent délicate et très longue qui nécessite une consommation importante de solvant. Cela a pour conséquence d'engendrer des dégradations des matières traitées (à chaud par exemple) et de diminuer le rendement d'extraction. Une demande croissante de nouvelles techniques d'extraction permettant de réduire à la fois, le temps d'opération, la consommation de solvant et la quantité d'effluents. Les techniques modernes telles que l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons, l'extraction par fluide supercritique et l'extraction par solvant accélérée sont des techniques rapides et efficaces pour extraire des composés chimiques des matrices solides de plantes. Ces techniques peuvent fonctionner à haute température et/ou haute pression améliorant nettement la but de palier la cinétique d'extraction [30].

6.2.1. Extraction assistée aux ultrasons (USAE)

L'extraction par ultrasons est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Ses avantages les plus significatifs sont liés à l'augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Cette technique est facile à mettre en œuvre. Comme le Soxhlet, l'extraction par ultrasons permet d'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels. Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale [27].



Figure I.17 : Schéma d'extraction assistée aux ultrasons.

6.2.2. Extraction assistée par microondes (MASE)

L'extraction assistée par microondes est un processus par lequel l'énergie microonde accélère l'extraction. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales [31]. Au cours du traitement par microonde, le chauffage provoque la rupture des liaisons hydrogène faibles par la rotation dipolaire des molécules. Une quantité considérable de pression s'accumule à l'intérieur du biomatériau, qui modifie les propriétés physiques des tissus biologiques et améliore la porosité de la matrice biologique. Ceci permet une meilleure pénétration du solvant d'extraction à travers la matrice et facilite l'extraction des composés entre autre les composés phénoliques [31]. Elle utilise de plus petites quantités de solvant, n'est pas couteuse et est considérablement rapide. Cependant, la température opératoire de cette technique est relativement haute (100 – 150 °C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants. Les autres inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extrait [31].

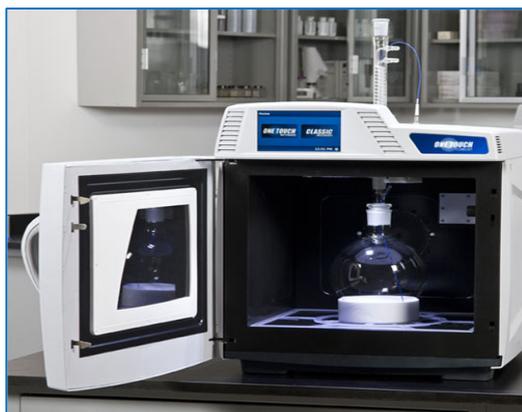


Figure I.18: l'appareillage d'extraction assistée par microondes.

6.2.3. Extraction accélérée par solvant (ASE)

Technique brevetée de la société DIONEX qui utilise les solvants conventionnels à des températures (50 – 200 °C) et des pressions 100 – 150 bar) élevées. La pression exercée est assez élevée pour maintenir le solvant à l'état liquide à température élevée. Pendant l'ASE®, le solvant reste toujours en dessous de ses conditions critiques. Ses avantages vs les techniques conventionnelles sont qu'on évite les échauffements locaux et qu'on consomme de plus petites quantités de solvant (l'extraction par Soxhlet et par batch avec agitation). Ses inconvénients sont liés à son coût élevé et surtout à son non sélectivité, ce qui impose des procédures supplémentaires de nettoyage des extraits. Les températures opératoires élevées peuvent aussi mener à une dégradation des solutés thermolabiles [27].



Figure I.19 : l'appareillage Extraction accélérée par solvant.

7. GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOPOLYMÈRES

Les biopolymères sont considérés par certains auteurs comme étant uniquement des polymères biodégradables. En pratique, ils rassemblent les polymères biosourcés issus de ressources renouvelables, les polymères biodégradables et même parfois les polymères biocompatibles. La chimie des biopolymères est née de la connaissance d'un biopolymère courant : la cellulose. Elle appartient à la famille des polysaccharides. Les biopolymères sont des polymères issus exclusivement d'organismes vivants ou de polymères synthétisés à partir de ressources renouvelables. Ces polymères connaissent depuis quelques années un réel essor du fait de leurs origines biologiques et surtout de leurs caractères biocompatibles, biodégradables, biorésorbables et perméables à la vapeur d'eau. Leurs utilisations en substitution aux polymères synthétisés à partir d'hydrocarbures offrent donc des applications intéressantes. En effet, dans un monde où les matériaux recyclables ou biodégradables prennent peu à peu plus de place, les biopolymères sont de plus en plus valorisés [33].

7.1. Définition d'un biopolymère

L'UIPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) définit Les biopolymères comme étant des biomacromolécules synthétisées par des organismes vivants, et selon l'ADEME (Agence de l'Environnement et De la Maîtrise de l'Energie), les biopolymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux [33].

Tableau I.2 : Les grandes classes de biopolymères [34].

Classes	Descriptions	Exemples de biopolymères
Polysaccharides (plantes/animaux)	Glucides ou sucres complexes constitués de plusieurs monosaccharides	Amidon, Cellulose, Alginate, Chitosane, Agar, Pectine, Gommés, Carraghénane.
Polysaccharides (issus des bactéries)	(glucides ou sucres simples) liés entre eux.	Xanthane, Dextrane, Gellane, Curdlan, Pullulane, Elsinane.

<p>Protéines Et polypeptides</p>	<p>Macromolécules biologiques composées d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques.</p>	<p>Polyacide aminé, Collagène Gluten, Caséine, Soja, Glycoprotéine, Zéine.</p>
<p>Polyesters (synthétisés par des bactéries)</p>	<p>Polymères dont les motifs répétitifs de la chaîne principale contiennent la fonction ester.</p>	<p>Poly (acide lactique) (PLA) Polyhydroxyalcanoate (PHA)</p>
<p>Polyphénols</p>	<p>Molécules présentant plusieurs groupements phénoliques.</p>	<p>Lignines, Tanins, Acides humiques</p>
<p>Polynucléotides Etnucléotides</p>	<p>molécules composées de plusieurs nucléotides. Certains nucléotides forment la base de l'ADN et l'ARN.</p>	<p>Adénosine-5'-triphosphate (ATP) Adénosine-5'-monophosphate (AMP)</p>

7.2. Le Chitosane

C'est un copolymère linéaire flexible de 2-acétamido-2-déoxy-β-D-glucopyranose et 2-amino-2-déoxy-β-D-glucopyranose liés en β (1-4), Cette macromolécule est obtenue par N-désacétylation d'un des polymères naturels les plus abondants, la chitine, extraite des carapaces de crustacés tels que les crabes et les crevettes [2]. La Figure 04 représente les motifs de la de la chitine et du chitosane. Leurs structures diffèrent uniquement au niveau des groupements en position C2 acétamide pour la chitine et amine pour le chitosane [33].

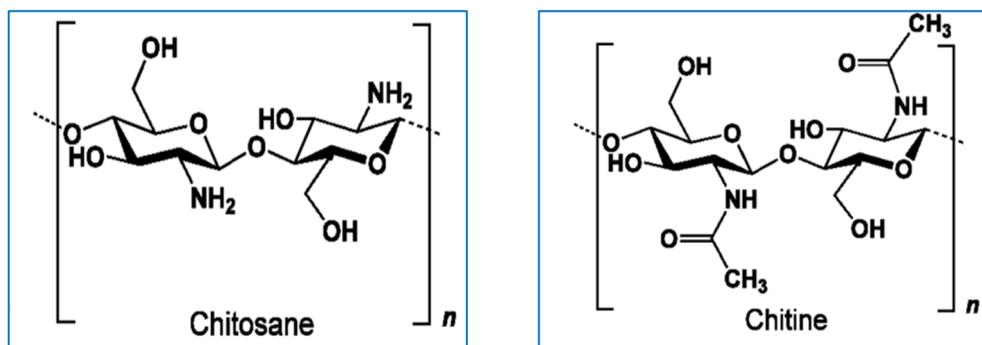


Figure I.21 : Structure chimique du chitosane, chitine.

7.3. Propriétés physico-chimiques du chitosane

7.3.1. Degré de Déacétylation (DD)

Le degré de déacétylation (DD) est l'une des propriétés les plus importantes du chitosane. Il influe sur les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution comme la solubilité du chitosane, la flexibilité des chaînes macromoléculaires, la conformation du polymère et par conséquent la viscosité des solutions [35].

7.3.2. Cristallinité

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles. La cristallinité est, en général, déterminée par des mesures de diffraction de rayons X. Le chitosane est généralement une substance semi-cristalline. Il cristallise dans le système orthorhombique et deux types de produits sont connus : le chitosane I (faible DD, sous forme de sel) est plus désordonné que le chitosane II (fort DD, forme amine libre) [35].

7.3.3. Solubilité

En général, la solubilité du chitosane dépend de la valeur de DD, de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire. Il est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses fonctions amines. Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, et cela favorise donc la solubilité de chitosane. Ce dernier est, en effet, insoluble dans l'eau et dans les

solutions alcalines concentrées ou diluées. Il est également insoluble dans les solvants purs et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau. L'acide le plus utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué (0,1-1 %) [35].

7.3.4. Polyélectrolyte en milieu acide

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques et il est une base faible présentant un pKa voisin de 6,3. Il se dissout en milieu acide par protonation des fonctions amine présentes sur la macromolécule. En dessous de ce pKa, les groupements amines sont protonés et font du chitosane un polyélectrolyte cationique, soluble dans l'eau acidifiée. Au-dessus du pKa, les groupements amines sont déprotonés et le chitosane est insoluble dans l'eau. Le pKa du chitosane dépend du degré de neutralisation des groupes NH_3^+ et du DD. En général, la valeur du pKa augmente quand le DD diminue [35].

7.3.5. Viscosité

La viscosité du chitosane dépend du degré de désacétylation de ce polymère. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, le chitosane est donc plus soluble et par conséquent sa viscosité est plus importante. La viscosité dépend également : de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction du poids moléculaire) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée). Ce paramètre est déterminé par viscosimètre [35].

8. LA MODIFICATION CHIMIQUE

La modification chimique décrit la modification, l'addition ou le retrait, par réaction chimique, d'une variété de macromolécules, y compris les protéines et les acides nucléiques. Il fait référence à l'utilisation de réactifs chimiques in vitro plutôt qu'à la modification post-traductionnelle de molécules biologiques au cours de la biosynthèse in vivo. Le biopolymère Chitosane offre d'immenses possibilités structurelles de modification chimique et mécanique du générer de nouvelles propriétés, fonctions et applications en raison de la présence de OH et de NH hautement réactifs groupes fonctionnels [36].

8.1. Bases de Schiff greffées sur le chitosane

Le développement dans le domaine de la chimie bio-organique a augmenté l'intérêt pour les composés de base de Schiff greffées sur le chitosane, car il a été reconnu qu'un grand nombre

de ceux-ci peuvent servir de modèles pour les espèces biologiquement importantes. Il existe plusieurs travaux de recherche réalisés ; afin de présenter la synthèse et la caractérisation de ces produits. On peut distinguer deux catégories de greffage du chitosane : une voie directe de synthèse et une autre indirecte [37].

8.2. Synthèse de bases de Schiff

8.2.1. Par voie directe

La voie directe et la plus simple, il suffit de mettre en réaction une cétone ou un aldéhyde (qui est le cas de notre étude) avec le chitosane. On prend comme exemple la synthèse présentée dans l'article publié dans le journal américain de la technologie alimentaire [37].

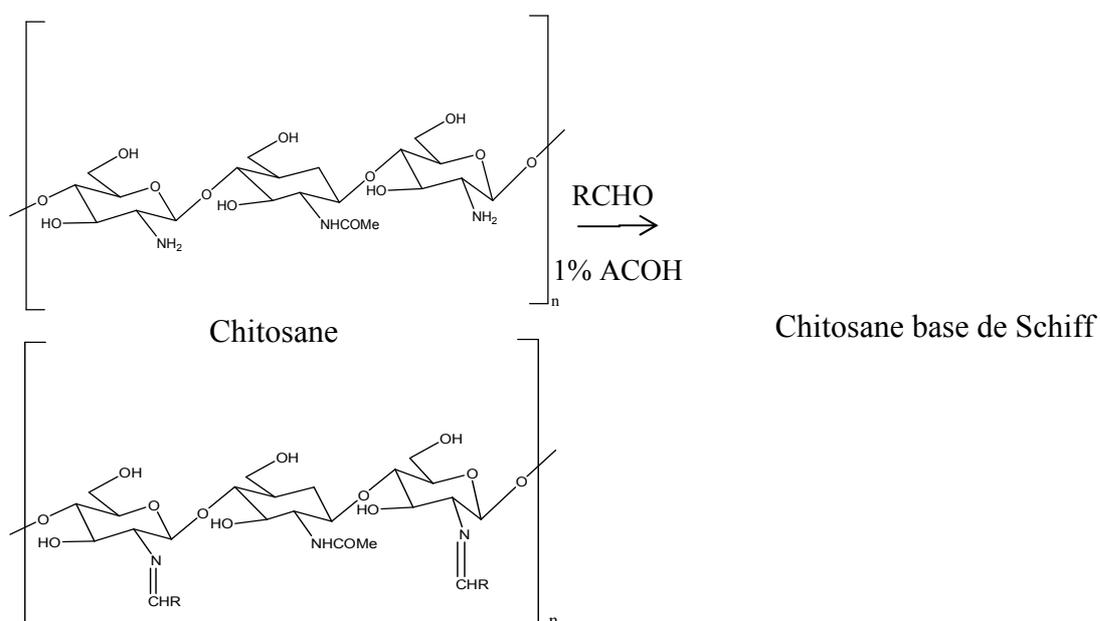


Figure I.22 : Schéma de synthèse des bases de Schiff supportées par le chitosane.

La conception et la synthèse de quatre Schiff composés basiques supportés par chitosane ont été étudiés dans le travail mentionné par réaction du chitosane de faible masse moléculaire avec différents aldéhydes aromatiques comprenant benzaldéhyde et trois de ses dérivés, le p-chlorobenzaldéhyde, N-diméthylaminobenzaldéhyde et P-méthoxybenzaldéhyde (anisaldéhyde, l'aldéhyde d'origine naturelle). Dans cette étude les propriétés chimiques et structurales de ces composés ont également été caractérisés par différentes méthodes, telles que les UV, IRFT et la spectroscopie de ^1H -RMN et de microscopie électronique à balayage

MEB. Le travail est également étendu pour évaluer l'activité antibactérienne de ces composés de Schiff de base à base de LMWC-contre deux espèces de bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogènes*) et deux espèces de bactéries Gram négatif (*Escherichia coli* et *Shigella dysenteriae*) [37].

8.2.2. Par voie indirecte

La voie indirecte consiste à synthétiser une simple base de Schiff au départ, par réaction entre un dicétone et une amine, puis à greffer la base obtenue sur le chitosane, on obtiendra à la fin de cette réaction, deux bases de Schiff au lieu d'une seule, une qui est simple, et l'autre greffée sur le chitosane. On prend comme exemple la réaction présentée dans l'article publié dans le journal international des macromolécules biologiques et illustrée dans la figure suivante [37].

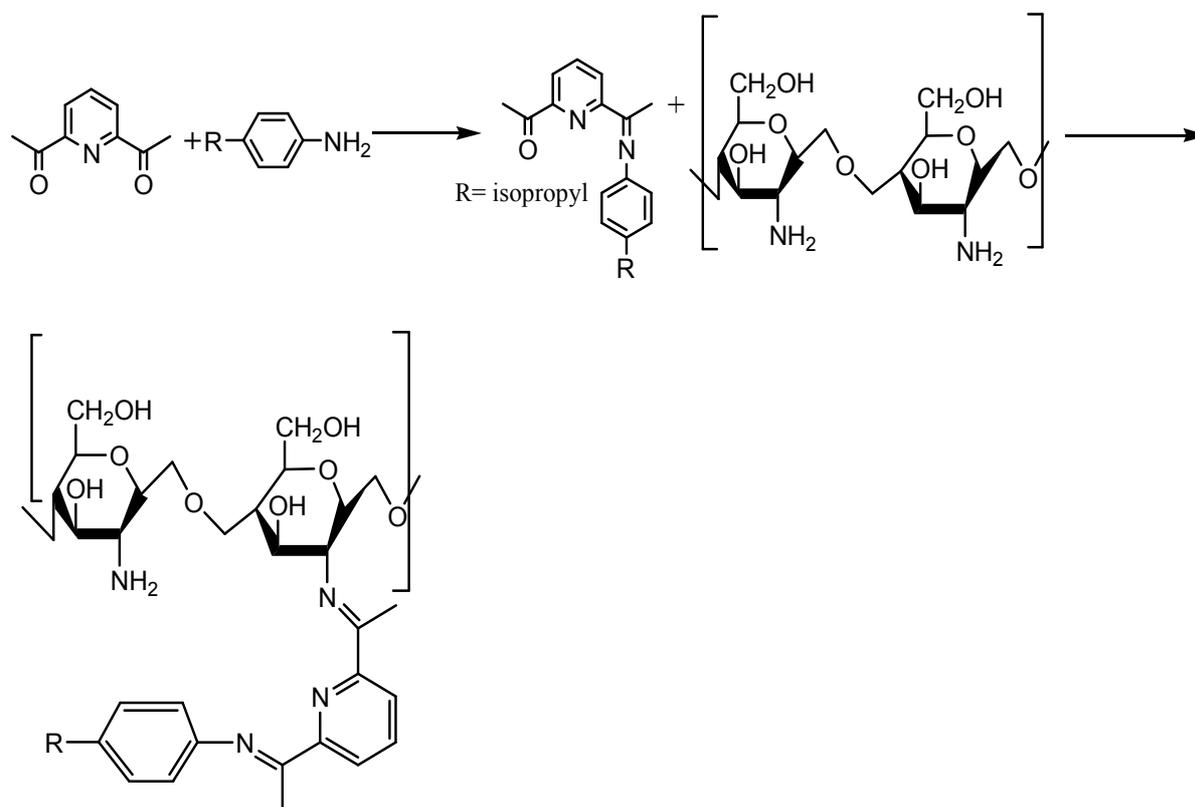


Figure I.23: Synthèse d'o-carboxyméthyle bases de Schiff et chitosane.

Matériel et méthodes

1. MATERIELS

1.1. Matériels végétal

Au cours de notre travail on a utilisé 3 plantes, riche en furocoumarines ; deux fruits de la famille des Rutacée (*Citrus sinensis* et *Citrus limon*) et une plante de la famille des Apiacées (*Daucus carota L.*). Les écorces d'orange et de citron récoltés au cours de l'hiver 2018 de la région Blida ont été découpées et conservés au congélateur à -15 °C avant l'extraction. La partie aérienne (fleurs) de *Daucus carota L.* (Carotte sauvage) de la famille des Apiaceae ont été collectées au cours de la Période de floraison à l'université Saad Dahlab Soumaa, wilaya Blida en mai 2019, séché dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires puis découpées en petits morceaux.

1.1.1. Systématique et description botanique

1.1.1.1. L'oranger

L'oranger (*Citrus sinensis*) appartient à la famille des rutacées selon le **tableau (II.1)** :

Tableau II.1 : Classification botanique des oranges.

Règne	Plantae
Ordre	Sapindales
Classe	Magnoliopsida
Famille	Rutacées
Genre	Citrus sinensis

L'oranger est un petit arbre sempervirent, pouvant atteindre 10 mètres de haut, avec des branches épineuses et des feuilles de 4 à 10 cm de long. Le fruit du *Citrus sinensis* est appelé orange douce pour le distinguer de l'orange amère, les fleurs du quel on tire l'essence de néroli et l'eau de fleur d'oranger. Tous les fruits d'agrumes sont considérés comme des baies, parce qu'ils sont charnus [38].



Figure II.1 : *Citrus sinensis* (L'oranger).

1.1.1.2. Citronnier

Le citronnier (*Citrus limon*) appartient à la famille des rutacées a été introduit dans le bassin méditerranéen vers la moitié du XIIe siècle, et en Afrique de l'Est a été faite par les commerçants arabes et hindous vers le XIVe siècle [39]. Selon le **tableau (II.2)**.

Tableau II.2 : Classification botanique de Citronnier.

Règne	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Térébenthales
Famille	Rutaceae
Genre	Citrus limon

Le citronnier, un membre de la famille des Rutacées, est un petit arbre (arbuste) vert et aromatique dont la taille peut varier de 2 à 10 m de haut, porte 5-6 branches charpentières très fournies en rameaux, les racines superficielles forment un réseau dans les 80 premiers centimètres de sol. Les feuilles des citronniers sont des feuilles vertes, alternatives et persistantes, très adurantes en raison des multiples poches à essence qu'elles contiennent, qui sont visible à l'œil nu [39].



Figure II.2: *Citrus limon* (Le Citronnier).

1.1.1.3. Carotte sauvage

La carotte sauvage (*Daucus carotta*) est une espèce de plantes à fleurs dicotylédones de la famille des apiaceae, originaire des régions tempérées de l’ancien monde [40].

Tableau II.3 : Classification botanique Citronnier.

Règne	Plantae
Classe	Equisetopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	Daucus

La carotte sauvage (*Daucus carota* L.), c’est une plante annuelle ou bisannuelle de taille variable (25 à 100 cm). La tige est solide et souvent ridée. Les feuilles sont très découpées bi- ou tripennées, coriaces ; celles situées à la partie supérieure de la plante ont souvent l’aspect de bractées. L’involucre est important, forme de folioles découpées en lanières. Les fleurs de l’ombelle sont de couleur blanche sauf au centre où il y a une fleur stérile, généralement pourpre. Les ombelles à nombreux rayons se contractent à l’époque de la fructification. La floraison a lieu entre juin et août. Les fruits sont couverts d’aiguillons rectilignes. La racine de la Carotte sauvage est blanche, ligneuse et de saveur acre [40].



Figure II.3 : *daucus carotta L.* (carotte sauvage).

1.2. Produits chimiques

Tous les produits utilisés dans ce travail ont été obtenu au laboratoire de chimie des produits naturels comme il est indiqué dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.4: Quelques propriétés physico-chimiques des produits utilisés.

Produits chimique	Θ_{eb} (°C)	Pureté	Société produite
Ether de pétrole	44-60°C	95%	Sigma-aldrich
Hexane	68,73°C	95%	Sigma-aldrich
Méthanol	64,7 °C	99.7%	Sigma-aldrich
Dichlorométhane	39,6 °C	99.5%	Sigma-aldrich
Acétate d'éthyle	77,1°C	99.5%	Honeywell
Acide acétique	118,1 °C	99.5%	Honeywell
HCl	-85,05 °C	37%	Sigma-aldrich
NH4OH	24,7 °C	10%	Sigma-aldrich
FeCl3	315 °C	41%	Honeywell
Ethanol	78,37 °C	96%	Honeywell
Chitosane	Issue de l'extraction des carapaces de crevette		

1.3. Matériels d'analyses

1.3.1 Point de fusion

Les points de fusion des produits obtenus ont été mesurés à l'aide d'un appareil de point de fusion de marque STUART Au laboratoire pédagogique de département de Chimie.

1.3.2 Chromatographie sur couche mince CCM

Sur une plaque de gel de silice de 3*5 cm on trace au crayon un trait horizontal à une distance de 0.5cm du bord inférieur et à 0.5 cm du bord supérieur on dilue les extraits dans l'éther de pétrole et on dépose une goutte sur le trait du bord inférieur la plaque alors introduite dans un bécher contenant l'éluant hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle (5 :5 :1). Lorsque l'éluant atteint le front de la plaque, cette dernière est retirée de bécher et puis séchée les taches florissantes apparaissant à l'aide d'UV sont caractérisés par un facteur de rétention (Rf) qui est défini comme étant le rapport de distance parcourue par la substance (X) sur la distance parcourue par l'éluant (Y)

$$R_f = X / Y$$

1.3.3. Spectrométrie Infra rouge

Les échantillons préparés préalablement en pastille de KBr en ont été analysés à l'aide d'un spectrophotomètre IR de marque Jas.co FT/IR-4100.

1.3.4. Spectroscopie UV-visible

Les absorbances des extraits ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de marque JASCO à double faisceaux à des longueurs d'onde de 200nm et 600 nm, on utilisant une cuve en quartz de 1 cm d'épaisseur. Les extraits analysés ont été mis dans des fioles et complétés par de l'éther de pétrole et méthanol jusqu'au trait de jauge selon leurs solubilité.

1.3.5. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN a été effectuée au niveau de centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimique de Bousmail wilaya de Tipaza. Les spectres RMN du ^1H et du ^{13}C sont enregistrés sur un appareil *Brucker AC-400*, qui fonctionne à une fréquence de 400 MHz. Les échantillons sont dissous dans un solvant de DMSO-d, ce solvant possède un déplacement chimique spécifique. Le tube contenant l'échantillon est soumis au champ magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à l'identification structurale.

1.3.6. Analyses par Diffraction des rayons X

L'appareil utilisé est un diffractomètre de poudre de marque BRUKER PHASER D2 équipé d'un tube à rayons X à anticathode en cuivre ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). Les diffractogramme ont été enregistrés de $2\theta = 1^\circ$ à 120° , avec un pas de $0,01^\circ$.

2. EXTRACTION

2.1. Méthodes d'extraction

Dans le cadre de ce projet deux méthodes d'extraction ont été sélectionné pour la récupération des furocoumarines. Les extractions ont été réalisées avec éther de pétrole et le méthanol. La première méthode était une extraction par soxhlet pour la deuxième méthode était une macération pendant 48 H. les rendements des furocoumarines ont été calculés selon l'équation suivante :

$$R_{ex}(\%) = \left(\frac{m}{m_0}\right) \times 100$$

Où :

R_{ex} : rendement en furocoumarine (%).

m : masse de furocoumarine en gramme.

m_0 : masse de la matière végétale en gramme.

2.1.1. Extraction par soxhlet

L'extraction par l'éther de pétrole et le méthanol pour extraire les furocoumarines a été réalisée avec un appareil de type soxhlet. Cette technique assure une extraction à chaud des furocoumarines. Les échantillons des plantes ont été placés dans une cartouche en cellulose (une matière pénétrable pour le solvant), le ballon contenant l'éther de pétrole est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus du quel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant. Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur

accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche. Après filtration et séchage des matières végétales, l'extraction avec les mêmes échantillons a été réalisée par le méthanol. A la fin des extractions les solvants ont été évaporés par un évaporateur rotatif.



Figure II.4 : Extraction par soxhlet.



Figure II.5 : Evaporation des solvants.

2.1.2. Macération

Des masses bien déterminées d'écorces d'orange et de citron et de fleurs de carotte sauvage ont été grossièrement découpées puis immergées séparément pendant 48 H dans de l'éther de pétrole à l'abri de la lumière avec agitation de temps en temps. Après filtration et séchage des matières végétales, l'extraction avec les mêmes échantillons a été réalisée par le méthanol. A la fin des extractions les solvants ont été évaporés par un évaporateur rotatif.

2.2. Purification des extraits

Après l'évaporation des solvants, tous les extraits ont été mis dans des tubes à essais ; après 24h, les furocoumarines commencent à précipiter, ces derniers ont été lavés par le méthanol et l'éther de pétrole aux extraits correspondant plusieurs fois à la fin les produits ont été filtrés, séchés et pesés.



Figure II.6 : Avant la purification d'extrait d'orange.



Figure II.7 : Après la purification d'extrait d'orange.

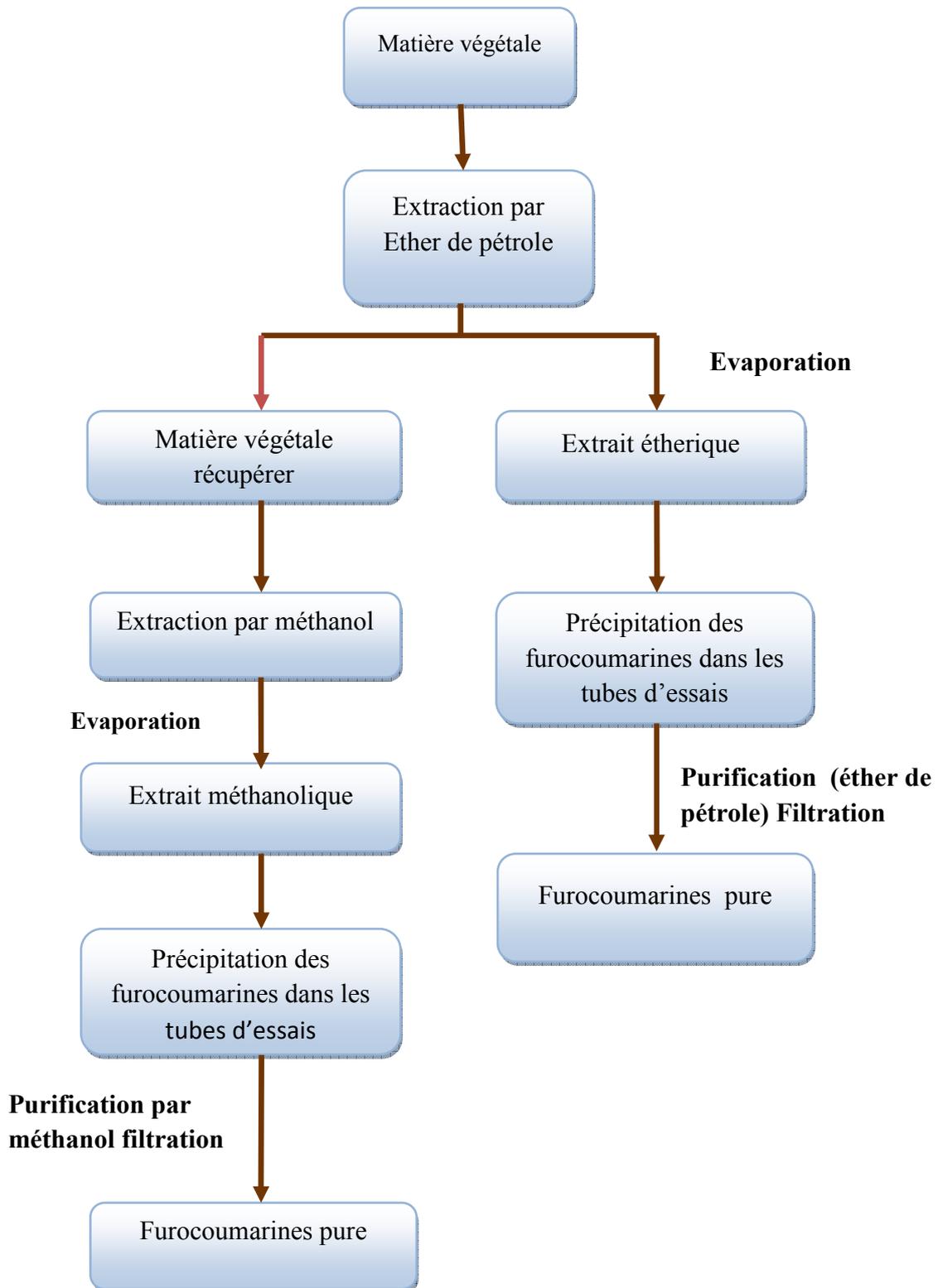


Schéma II.1: Protocole d'extraction des furocoumarines par macération et soxhlet

3. SCREENING PHYTOCHIMIQUES

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les extraits préparés par des différentes parties écorces et fleurs des trois plantes étudiées en milieu hydro alcoolique et en milieu organique éther par macération. Les extraits obtenus ont été soumis à divers tests phytochimiques en vue de mettre en évidence les différents métabolites secondaires sont présents par des réactions de coloration, de précipitation et des observations sous lumière ultra-violette.

3.1. Les coumarines fluorescence UV

Dans deux tubes à essai, introduire 2.5 mL de l'extrait étherique. Prendre le premier comme Témoin et ajouter à l'autre 0,5 ml de NHOH (25%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines [45].

3.2. Les tanins

Dans un tube à essai, introduit 2.5 mL d'extrait méthanolique et on a ajouté 0,25 mL d'une solution Aqueuse de FeCl₃ (1%), le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre [45].

3.3. Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, on a introduit 2.5 mL d'extrait méthanolique et on a ajouté 1 mL de HCl concentré. L'apparition d'une coloration rouge Prouve la présence de leucoanthocyanes [45].

3.4. Les Flavonols et flavanones

Dans un tube à essai, on a introduit 2.5 mL d'extrait méthanolique et on a ajouté 1 mL de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration qui vire vers le rouge pourpre (flavonols) ou le rouge violacées (flavonols et flavanones) rose ou rouge ou jaune Prouve la présence des flavonoïdes [45].

3.5. Les quinones

Dans un tube à essai, introduire 2.5 mL d'extrait étherique et ajouter 0,4 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH à 10%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres [45].

4. L'ACTIVITES ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE

Pour la détermination de l'activité antimicrobienne des extraits, deux souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) et une moisissure *Aspergillus .Brazilieusont* été choisies. Ces bactéries sont pathogènes et sont connues pour leur forte antibiorésistance et leur pouvoir invasif et toxique chez l'Homme. La moisissure choisie est toxique et pathogène. Ce sont des agents de pourriture fréquente des denrées alimentaires et des fruits et peuvent être toxiques pour l'Homme et les animaux. Les tests microbiologiques ont été effectués au laboratoire de l'hygiène de wilaya de Blida.

Tableau II.5 : Les souches microbiennes

Etat frais	Souches	Gramme
Bacille	<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	Négative
Cocci	<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	Positive
Moisissure	<i>Aspergillus .Brazilieusont</i>	-

4.1. Mode opératoire

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, 0.1mg d'extraits ont été dissoutes dans 1ml de DMSO, ensuite 0.2 ml est prélevé de chaque solution et complété par le DMSO jusqu'à 1 mL. Après avoir décongelé les milieux Mueller-Hinton et Sabouraud dans un poupinel, on le colle dans les boites de pétri on laisse ces dernières refroidir pendant 20 à 30 min. On prépare les suspensions microbiennes en prélevant à l'aide d'une anse stérile, une petite quantité de colonie microbienne, puis on l'émerge dans le tube contenant l'eau physiologie. On laisse le mélange pendant 15 min, ensuite on étale le contenu des tubes à la surface du milieu de culture, après on imbibe les disques par les produits dilués et les déposés à la surface de la boite. Enfin on fait une incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 5 jours pour le champignon avec la mesure de diamètre de zone d'inhibition.

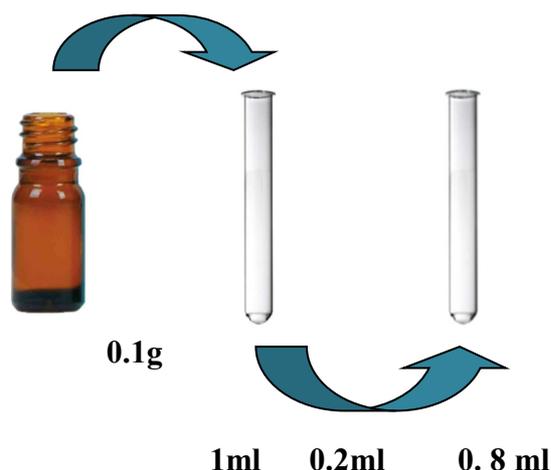


Figure II.8 : dilution des extraits.

Lecture :

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des furocoumarines [46].

- **Non sensible (-)** ou résistante : diamètre < 7mm.
- **Sensible (+)** : diamètre compris entre 7 à 14 mm.
- **Très sensible (++)** : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre > 20 mm.

5. Préparation d'une membrane photosensibilisante à base de chitosane

D'abord 0.5g de chitosane a été dissoute dans 25 ml d'acide acétique 2% sous agitation 5h à température ambiante, ensuite une solution 0.93mmol de xanthotoxine dans 5ml d'éthanol a été ajouté à la première solution progressivement. Le mélange réactionnel est porté sous reflux à 50°C, suivi par CCM et puis filtré. Le produit final a été lavé avec l'éthanol plusieurs fois puis neutralisé avec une solution de bicarbonate de sodium (5%) ; après séchage un film fin a été formé, récupéré et analysé par les différentes méthodes spectroscopiques.

résultats et discussion

présence des coumarines en quantité plus importante dans le citron et les oranges par rapport à la carotte sauvage.

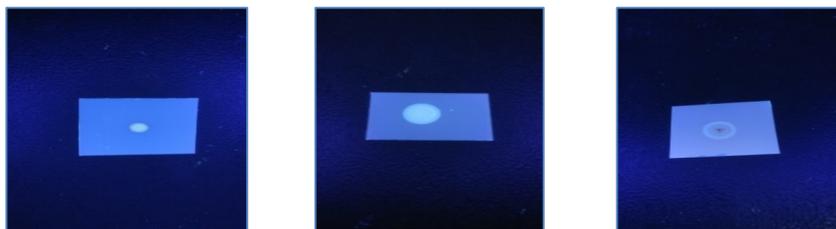


Figure III.1 : La présence des coumarines dans l'orange, citron et carotte sauvage respectivement.

2. Extraction des furocoumarines

2.1. Extraction des furocoumarines à partir des écorces d'oranges

2.1.1. Teneurs et propriétés physiques et organoleptiques

Quatre extraits ont été obtenus selon le protocole d'extraction décrit dans la partie expérimentale. Les caractéristiques physiques et organoleptiques des extraits sont reportées dans le **tableau(III.2)**.

Tableau III.2 : Caractéristiques physiques et organoleptiques des furocoumarines extraite à partir d'écorces d'oranges dans le système de solvants hexane/ Cl_2CH_2 /AcoEt (5/5/1).

Méthode	Phase d'extraction	Aspect	Couleur	Point de fusion	Rendement
Soxhlet	Ether de pétrole	Solide	Jaune	80-82	0,02%
	Méthanol	Solide	Orange	257	2,84%
Macération	Ether de pétrole	solide	Orange	78-80	0,0085%
	Méthanol	Semi-solide	Marron	--	0,021%

Les résultats représentés dans le **tableau (III.2)** montrent qu'après la purification de l'extrait apolaire d'orange obtenu par les deux méthodes, on a récupéré un produit solide jaune avec un point de fusion de 80-82°C et 78-80°C ; un écart de 2°C peut être justifié par la possibilité de l'existence d'impuretés responsables de ce abaissement. Il a été reporté que l'extraction par soxhlet a donné le rendement le plus élevé, 0,02 % par rapport à ce de macération 0,0085%.

L'extraction par soxhlet en utilisant le méthanol a abouti à un produit solide orange pur avec un point de fusion de 257°C et un rendement de 2,84% nettement le plus élevé par rapport aux autres extraits alors qu'on n'a pas pu séparer le mélange semi solide extrait par le même solvant par macération.

2.1.2. Caractérisation par chromatographie surcouche mince CCM

L'analyse des extraits obtenus par CCM révélé sous la lumière UV à 254 nm a donné les résultats suivants tableau.

Tableau III.3: Résultats de la CCM des extraits d'oranges dans le système de solvants hexane/Cl₂CH₂/AcoEt (5/5/1).

Méthode	Solvant d'extraction	Spot	Rf	Couleur
Soxhlet	Ether de pétrole	1	0,33	Bleu fluorescent
		2	0,45	Bleu fluorescent
	Méthanol	1	0,93	Jaune fluorescent
Macération	Ether de pétrole	1	0,15	Jaune fluorescent
		2	0,31	Bleu fluorescent
	Méthanol	1	0,38	Orange
		2	0,51	Jaune
		3	0,91	Jaune fluorescent

L'analyse qualitative après CCM, révélation chimique et visualisation sous UV à 254 nm, a permis de mettre en évidence de nombreuses taches (spots) colorées surtout en bleu et jaune fluorescent, cette fluorescence confirme la présence des furocoumarines. D'après ces résultats on peut noter les remarques suivantes :

Le spot 1 [Rf=0,33] pour l'extrait **AS**, est proche de spot 2 [Rf=0,31] pour l'extrait **AM**. Cela indique que c'est le même composé. Pour l'extrait **PS** on observe une seule tache de rapport frontal de [Rf=0,93] indique que le produit est pur, une similitude avec l'extrait **PM** despot3 [Rf=0,91], à l'exception de deux taches supplémentaires qui révèlent que ce dernier est impur et comporte un mélange de produits.

2.1.3. Caractéristique chimique des extraits apolaire

2.1.3.1. Caractérisation par UV-vis

Les spectres UV-vis des extraits **AS** et **AM** sont pratiquement identiques révélant trois λ max caractéristique à : 212, 270 et 320 nm. Ce dernier est caractérisé par une large bande située à 320 nm du noyau benzénique. La première bande située à 212 nm de l'excitation π - π^* est responsable de la liaison C=C et la deuxième bande à 270 nm (C=O, transition n- π^*).

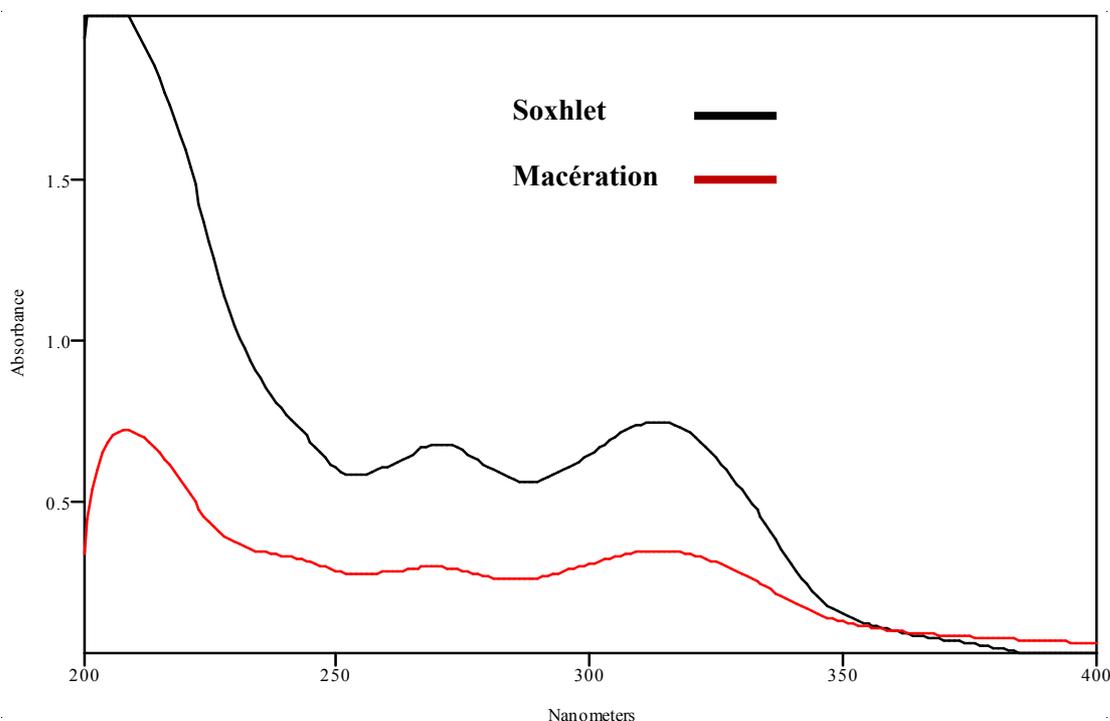


Figure III.2 : Spectres UV des extraits apolaires d'orange par macération et Soxhlet.

2.1.3.2. Caractérisation par infrarouge(IRTf)

Les spectres IR des deux extraits **AS** et **AM** représenté sur la **figure(III.3)** sont superposables et elles permettent de distinguer la présence de trois pics à 2955 ; 2919,14 et 2848,51 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation des liaisons **CH₃**, **CH₂** et **CH** de la chaîne aliphatique plus les pics de déformation à 1478,71, 1463 et à 1368,59 cm^{-1} confirmant la présence de ces liaisons. Un pic est situé à 1712,60 cm^{-1} représentant le groupement carbonyle **C=O** d'une lactone.

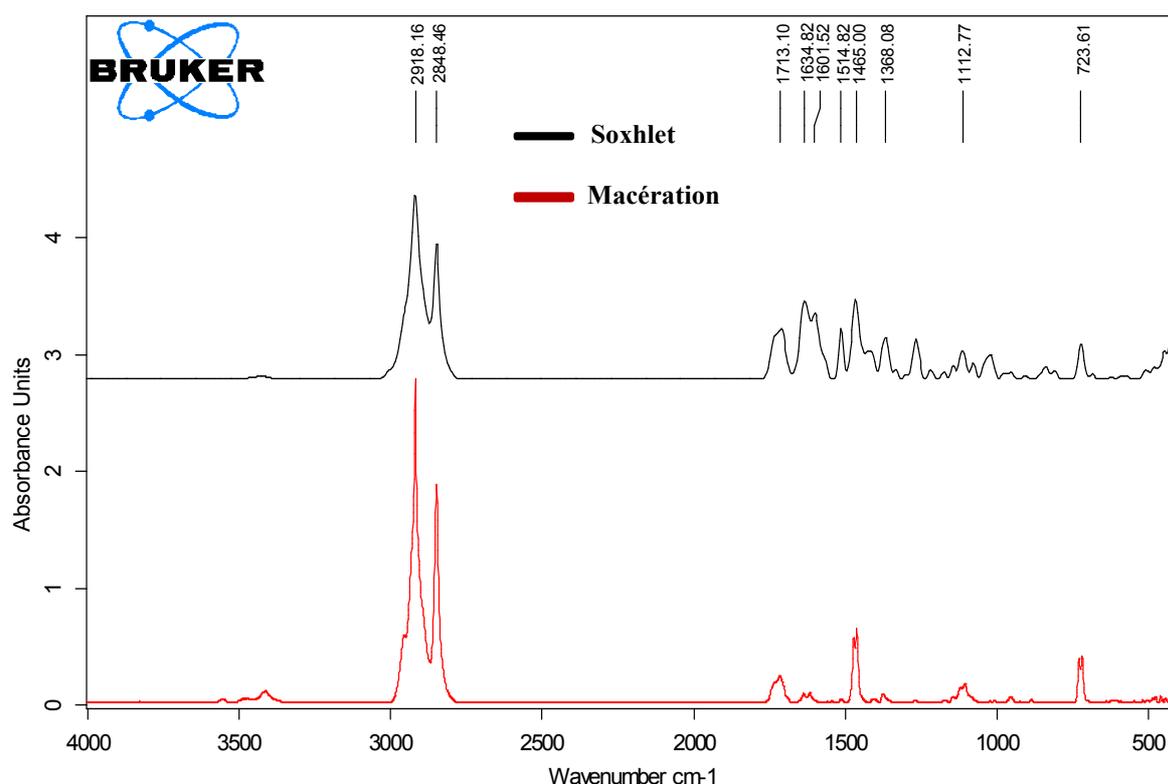


Figure III.3 : Spectres IRTF des extraits apolaires d'orange par macération et soxhlet.

2.1.4. Caractéristique chimique des extraits polaires

2.1.4.1. Caractérisation par UV-vis

Les deux extraits **PS** et **PM** représentent les mêmes bandes d'absorption à 202 et 226 nm de la transition $\pi-\pi^*$, une bande distincte $\lambda = 286$ nm (**C=O**, transition $n-\pi^*$) et une faible bande à 332 nm.

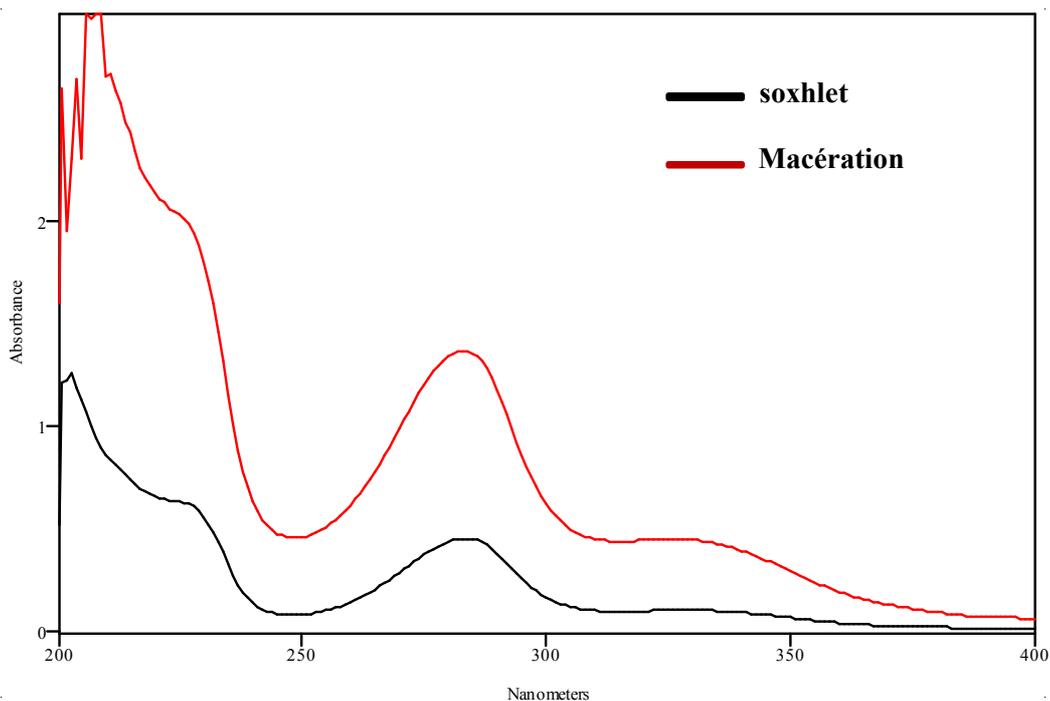


Figure III.4 : Spectres UV des extraits polaires d'orange par macération et soxhlet.

2.1.4.2. Caractérisation par infrarouge (IRTF)

Les spectres IR des extraits polaire représenté dans la **figure(III.5)** représentent les pics suivants:

- Trois pics à 2936 ; 2917,93 et 2850,85 cm^{-1} correspondant aux liaisons CH_3 ; CH_2 et C-H Sp^3 , ces liaisons sont justifiées par les bandes de déformation à 1461,9 cm^{-1} et à 1355,95 cm^{-1} .
- Un pic à 1712,60 cm^{-1} représentant le groupement C=O d'une lactone.
- Une bande à 1636,0 cm^{-1} correspondant à la vibration de la double liaison C=C .
- Deux pics à 1607.02 et 1520 ,18 cm^{-1} caractérisent la liaison C=C aromatique.
- Avec des pics plus intenses dans l'extrait du soxhlet, ce dernier est caractérisé par une bande à 3346,50 cm^{-1} attribuée au groupement OH d'un alcool.

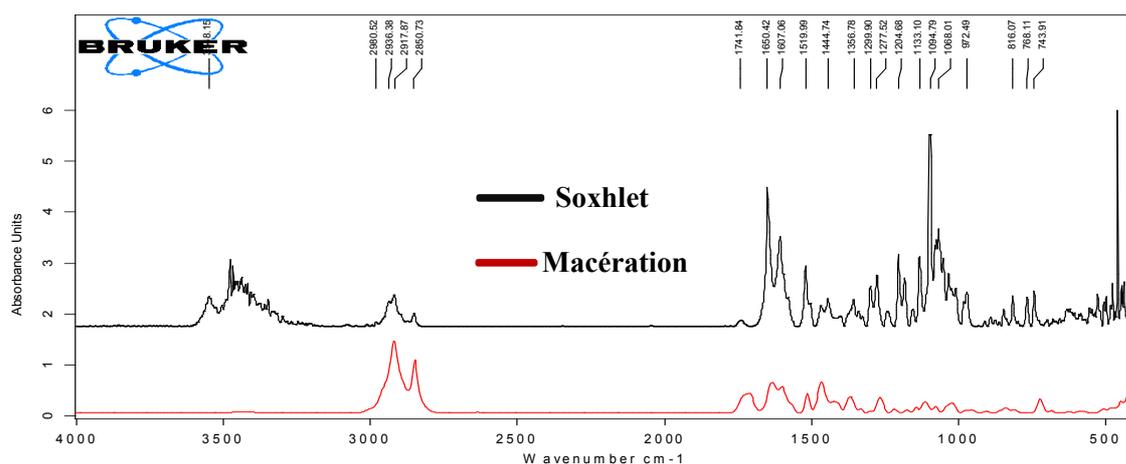


Figure III.5 : Spectres IRTF des extraits polaires d'orange par macération et soxhlet.

2.2. Extraction des furocoumarines à partir des écorces de citron

2.2.1. Teneurs et propriétés physiques et organoleptiques :

Quatre extraits ont été obtenus selon le protocole d'extraction décrit dans la partie expérimentale. Les caractéristiques physiques et organoleptiques des extraits sont reportées dans le **tableau (III.4)**.

Tableau III.4 : Caractéristiques physiques organoleptiques des furocoumarines extraite à partir d'écorces de citron dans le système de solvants hexane/Cl₂CH₂/AcoEt (5/5/1)

Méthode	Solvant d'extraction	Aspect	Couleur	Point de fusion °C	Rendements
Soxhlet	Ether	Solide	Blanc	143	0,33%
	Méthanol	Semi solide	Jaune pale	-	Traces
Macération	Ether	Solide	Jaune pale	144	0,01%
	Méthanol	Semi solide	marron	-	0,23%

La séparation et la purification des extraits apolaire de citron obtenu par les deux méthodes a fourni un solide blanc et un solide jaune pâle avec des points de fusion très proche 143°C, 144 °C et des teneurs différentes où le rendement le plus élevé (1,33%) a été obtenu par la méthode de soxhlet par contre la macération a fourni un rendement moyen de 0,01% . L'extraction par soxhlet en utilisant le méthanol a fourni un extrait semi solide de couleur jaune pâle avec un très faible rendement sous forme de traces , un autre extrait semi solide obtenue par macération de couleur marron et avec un rendement moyen 0,23%les deux extraits ont été difficile pour les séparer.

2.2.2. Caractérisation par chromatographie sur couche mince CCM

L'analyse de ces extraits est effectuée sur des plaques de gel silice, la visualisation sous la lampe UV à 254 nm ,les chromatogrammes obtenus ont permis de calculer les Rf et distinguer les couleurs. Les informations acquises vont être utilisées pour l'identification des molécules

Tableau (III.5).

Tableau III.5 : Résultats de la CCM des extraits de citron dans le système de solvants hexane/Cl₂CH₂/AcoEt (5/5/1).

Méthode	Solvant d'extraction	Spot	Rf	Couleur
Soxhlet	Ether de pétrole	1	0,62	Bleu fluorescent
		1	0.64	Bleu fluorescent
	Méthanol	2	0.8	Bleu fluorescent
macération	Ether de pétrole	1	0.61	Bleu fluorescent
		1	0.25	Bleu fluorescent
	Méthanol	2	0.75	Bleu fluorescent
		3	0.81	Bleu fluorescent

L'examen comparative des plaques CCM a montré une similitude entre les deux plaques CCM des deux extraits **AS** et **AM** en ce qui concerne le nombre de taches, leurs couleurs sous

UV (254 nm) on observe une seule tache avec des rapports frontaux proche [Rf=0,68] et [Rf=0,62] ce indique que le produit est pur.

Pour les extraits **PS** et **PM** leurs rapports frontaux sont aussi proche, spot 2 [Rf=0,80] et spot 3 [Rf=0,81] a l'exception dans l'extrait **PM** où deux taches supplémentaire sont apparue spot 1 [Rf=0,25] et spot 2 [Rf=0,25], qui indique que les deux extraits sont impur et comporte un mélange de produits.

2.2.3. Caractéristique chimique des extraits apolaires de citron.

2.2.3.1. Caractérisation par UV-vis

Les spectres UV-vis des extraits apolaire obtenu par soxhlet et par macération représentent les mêmes bandes d'absorption avec quatre λ max caractéristique à : 205, 221, 247 et 320 nm. Ce dernier est caractérisé par une large gamme d'absorption, un effet bathochrome est observé de 299 jusqu'à 338 nm à cause de sa grande photosensibilité. Ces résultats sont en accord avec l'absorbance du xanthotoxine mentionné dans la littérature [2].

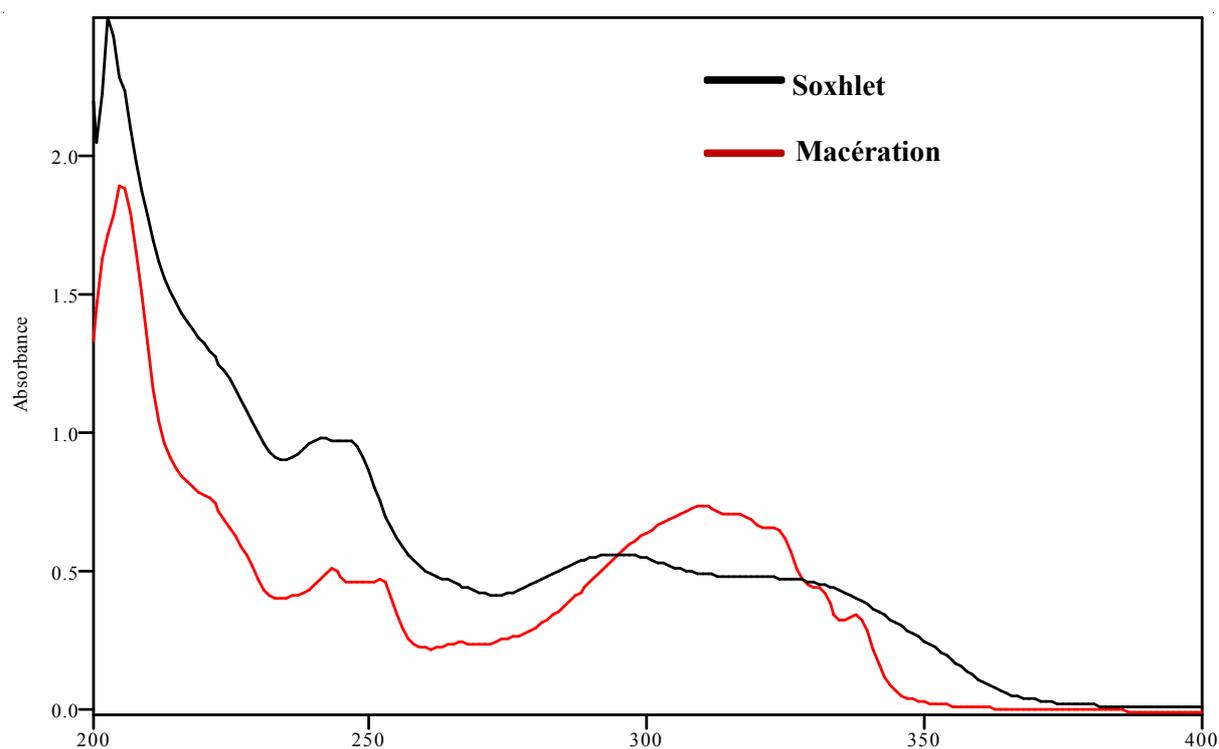


Figure III.6 : Spectres UV des extraits apolaires de citron par macération et soxhlet.

2.2.3.2. Caractérisation par infrarouge (IRTF)

L'analyse du spectre IR permet de distinguer la présence de trois pics faibles relative aux vibrations d'élongation de la liaison C-H, un pic du groupement méthyle (CH₃) situé à 2951,24 cm⁻¹, un pic de groupement méthylène (CH₂) situé à 2917,02 cm⁻¹ et un pic de groupement (CH) à 2848 cm⁻¹ plus la déformation de la liaison C-H à environ 1483, 63 cm⁻¹.

- Un pic situé à 3117,81 cm⁻¹ correspondant à la liaison C-H aromatique.
- Une forte pic situé à 1705,69 cm⁻¹ sur le spectre d'IR, indique la présence d'un groupement carbonyle (C=O).
- Un pic moyen présent à 1681,29 cm⁻¹ indique la double liaison C=C d'alcène.
- Un pic situé à 1149,43 cm⁻¹ correspondant à la liaison C-O de la fonction éther.

Le spectre FTIR obtenu est identique au spectre FTIR du xanthotoxine de la bibliothèque Aldrich des FTIR (Annexe 19).

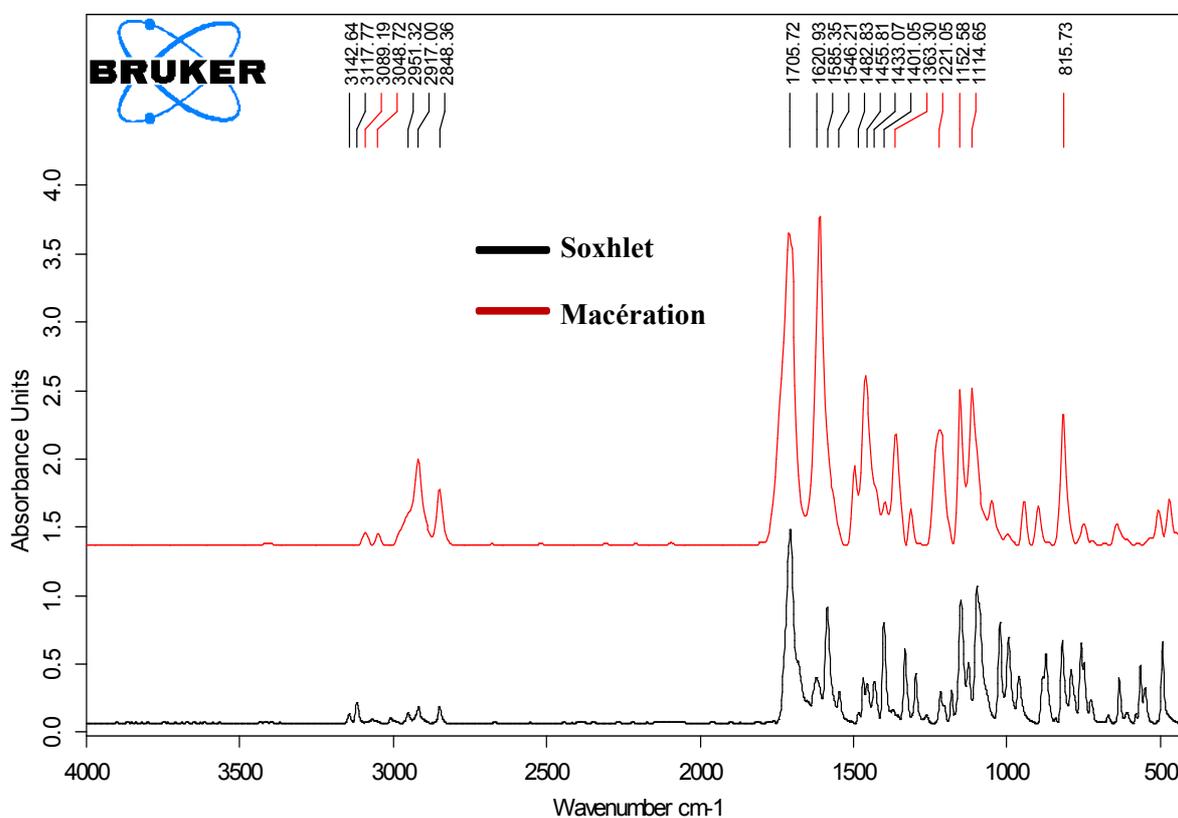


Figure III.7 : Spectre IRTF des extraits apolaires de citron par macération et soxhlet.

Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN) (H¹ et C¹³).

Spectroscopie RMN C¹³

Les signaux relatifs au spectre RMN C¹³ peuvent être interprétés comme suit :

^{13}C NMR (DMSO-d, 400 MHz) ppm: 61,58 (9-OCH₃) ; 107,72 (C-3) ; 114,01 (C-4) ; 114,64 (C-6) ; 116,92 (C-4a) ; 125,96 (C-3a) ; 132,51 (C-9) ; 142,26 (C-8a) ; 145,72(C-5) ; 147,32 (C-2) ; 147,89 (C-9a) ; 160,18 (C-7)

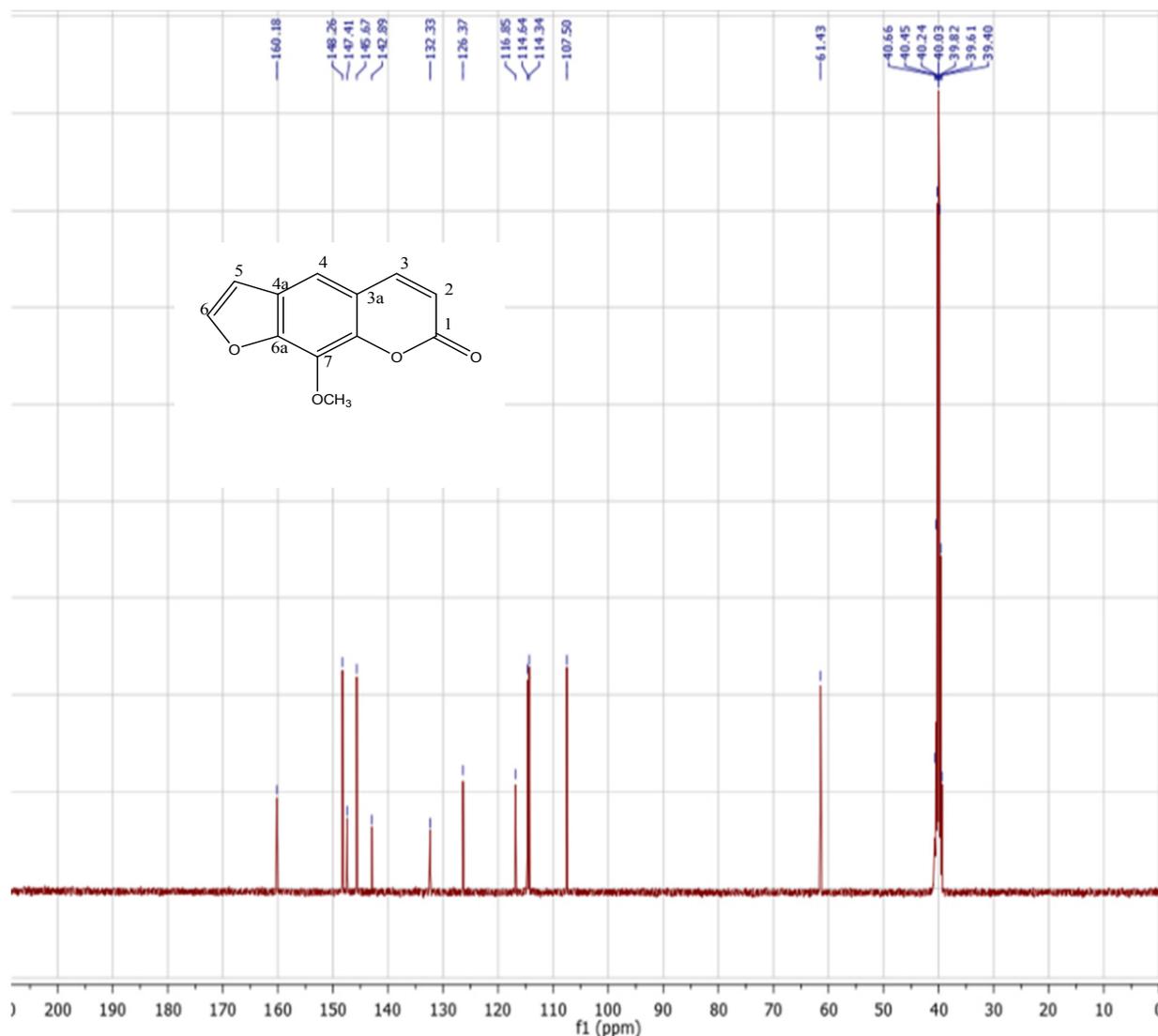


Figure III.8 : Spectre RMN C^{13} de Xanthotoxine dans le DMSO-d.

Spectroscopie RMN H^1 :

Les signaux relatifs au spectre RMN ^1H peuvent être interprétés comme suit :

^1H -NMR (DMSO-d, 400MHz) ppm: 4.20(s, 3H, 9-OCH₃); 6.42(d,J=9.5HZ, 1H, H-6); 7.15 (d,J=2Hz,1H,H-3) ;7.65(s,H-4) ;8.13(d,J= Hz,1H,H-5);8.15(d, J=2Hz,1H,H-2).

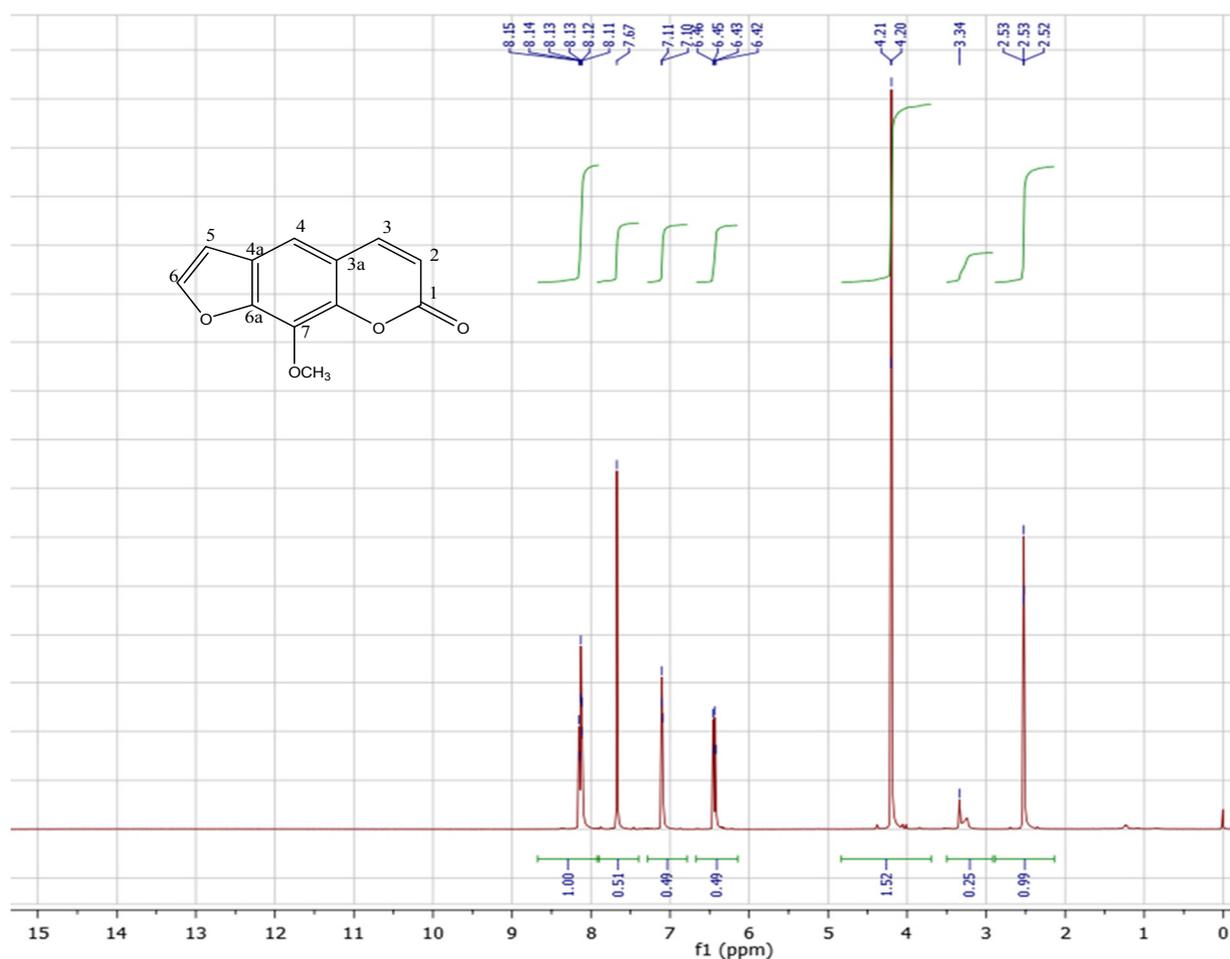


Figure III.9 : Spectre RMN proton H¹ de Xanthotoxine dans le DMSO-d.

2.2.4. Caractéristique chimique de l'extrait polaire de citron.

2.2.4.1. Caractérisation par UV-vis

Le spectre UV de l'extrait polaire du citron représente deux λ max à 205 et à 225 nm

L'absorption la plus forte, est dans la région de 200 à 210 nm avec un maximum à 205 nm

Une bande distincte $\lambda_2 = 225$ nm (C=O, transition n- π^*).

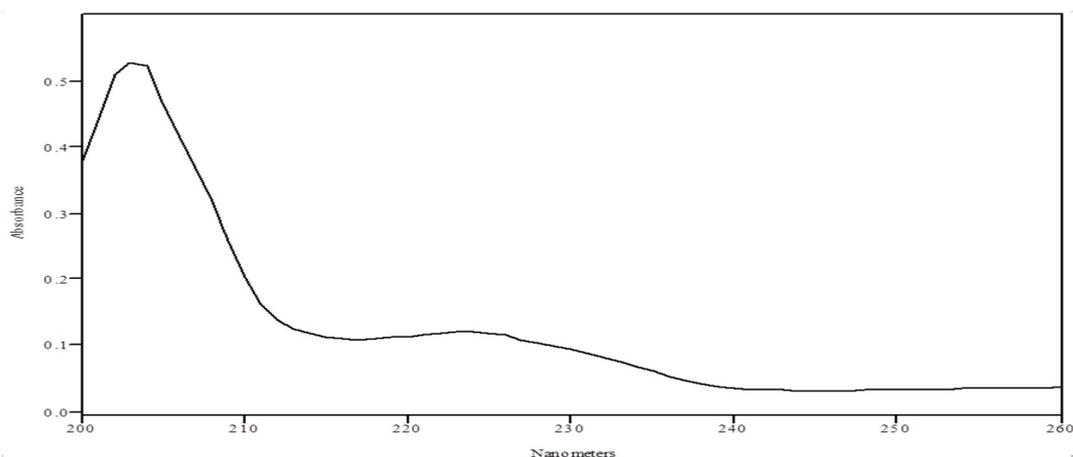


Figure III.10 : Spectre UV de l'extrait polaire de citron par macération.

2.2.4.2. Caractérisation par infrarouge(IRTf)

Le spectre IR d'extrait **PM** représenté dans la (figure III.11), représente les pics suivant:

- Une bande large à $3544,22 \text{ cm}^{-1}$ attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Une bande fine à $1634,14 \text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations des liaisons carbonyle.
- Deux bandes fines à $2929,35$ et $2812,26 \text{ cm}^{-1}$ correspondant aux **C-H Sp³, CH** et **CH₂** de la chaîne aliphatique.
- Une déformation de la liaison **C-H Sp³**d'un groupe **CH, CH₂** ou **CH₃** à $1415,89 \text{ cm}^{-1}$.
- Un pic situé à $1727,01 \text{ cm}^{-1}$ caractéristique d'élongation de la liaison **C=O** de lactone.

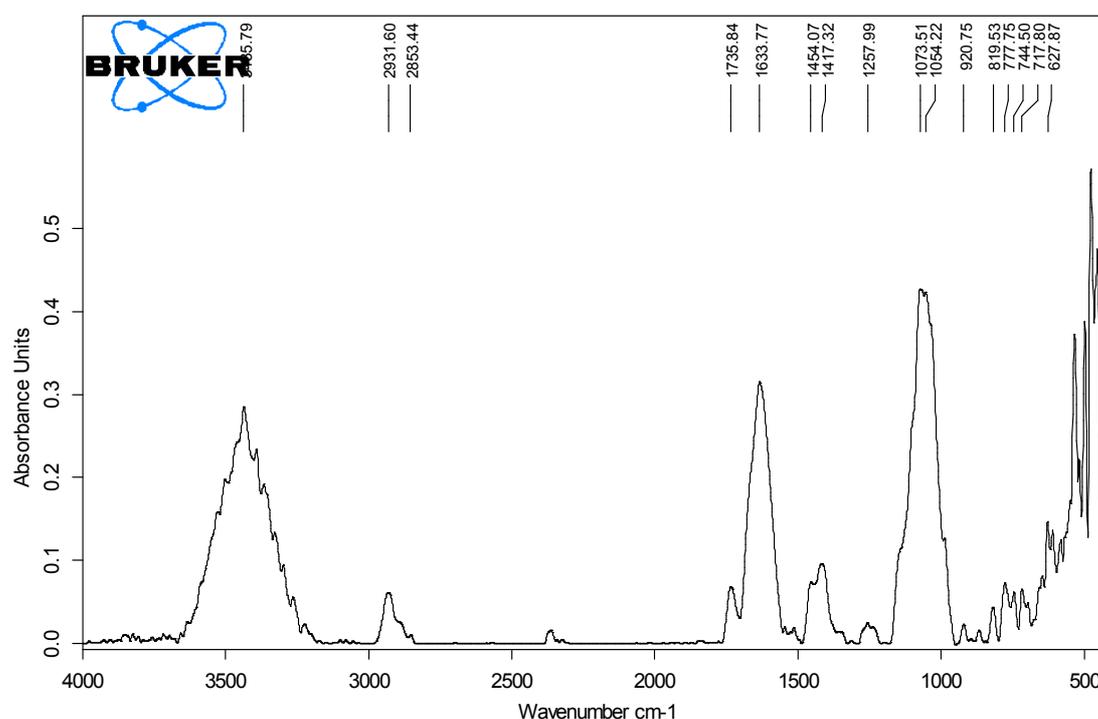


Figure III.11: Spectre IRTf de l'extrait polaire de citron par macération.

2.3. Extraction des furocoumarines à partir de *Daucus carotta*

2.3.1. Teneurs et propriétés physiques et organoleptiques

Quatre extraits ont été obtenus selon le protocole d'extraction décrit dans la partie expérimentale. Les caractéristiques physiques et organoleptiques des extraits sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau III.6: Caractéristiques physiques et organoleptiques des furocoumarines extraite à partir de carotte sauvage dans le système de solvants hexane/Cl₂CH₂/AcoEt (5/5/1).

Méthode	Solvant d'extraction	Aspect	Couleur	Point de fusion °C	Rendements
Soxhlet	Ether de pétrole	Solide	Vert claire	68	0,21%
	Méthanol	Solide	Vert foncé	230	0,22%
Macération	Ether de pétrole	Solide	Blanc	145	0,15%
	Méthanol	Solide	Vert foncé	80-85	0,17%

D'après les résultats de (tableau III.6), on a obtenu quatre extraits différents par deux méthodes d'extraction, L'extraits AS est un solide vert claire de point de fusion 68°C, tandis qu'il est isolé en quantité moyenne avec un rendement de 0,21%,un autre extrait **AM** sous forme solide blanc avec un point fusion de 145°C et un rendement moyen de 0.15%. l'extrait **PS** est un solide de couleur vert foncé et point de fusion de 230°C, avec un rendement de0,22% ,l'extrait **PM** sous forme solide de couleur vert foncé avec un point fusion de 80-85°C , un écart de 5°C peut être justifier par la possibilité de l'existence d'impuretés responsables de ce abaissement aboutit avec un rendement moyen de 0.17% .Ceux-ci ont mis en évidence que le rendement de l'extrait PS est plus élevé que les autres extraits donc on peut assumer que la méthode soxhlet est nettement meilleure que la macération 0.22%>0.2%>0.17%>0.15%.

2.3.2. Caractérisation par chromatographie sur couche mince CCM

L'analyse des extraits obtenus par CCM révélé sous la lumière UV à 254 nm a donné les résultats suivants **tableau (III.7)**.

Tableau III.7 : Résultats de la CCM des extraits de carotte sauvage dans le système de solvants hexane/Cl₂CH₂/AcoEt (5/5/1).

Méthode d'extraction	Solvant d'extraction	Spot	Rf	Couleur
Soxhlet	Ether de pétrole	1	0.94	Jaune fluorescent
	Méthanol	1	0.74	Bleu fluorescent
Macération	Méthanol	1	0.38	Rouge
		2	0.65	Rouge
		3	0.76	Rouge

Les plaques obtenus présentent une bonne migration ; par conséquent une bonne séparation. L'analyse qualitative par CCM, a permis de mettre en évidence des taches (spots) colorées en bleu et jaune fluorescent et d'autres de couleur rouge, sont bien distinctes et montrent une richesse considérable de l'extrait analysé en substances furocoumarines. Partant de leurs fluorescences et Rf.

Les résultats représentés dans le **tableau (III.7)** montrent la présence d'une seule tache de rapport frontale de [Rf=0.93] dans l'extrait AS et 0.74 dans l'extrait PS indique que le produit est pur. La plaque CCM de l'extrait PM montre la présence de trois taches non fluorescente, cela confirme que le produit n'est pas pur et ne comporte pas des furocoumarines. Enfin, nous pouvons conclure que les résultats de la CCM confirment la présence des furocoumarines ont utilisant l'extraction par soxhlet par les deux solvants (éther de pétrole, méthanol).

2.3.3. Caractéristique chimique des extraits apolaires de carotte sauvage

2.3.3.1. Caractérisation par UV-vis

Le spectre UV de l'extrait polaire de la carotte sauvage représente deux λ max à 205 et à 225 nm. L'absorption la plus forte, est dans la région de 200 à 210 nm avec un maximum à 205 nm. Une bande distincte $\lambda_2 = 225$ nm (C=O, transition $n-\pi^*$).

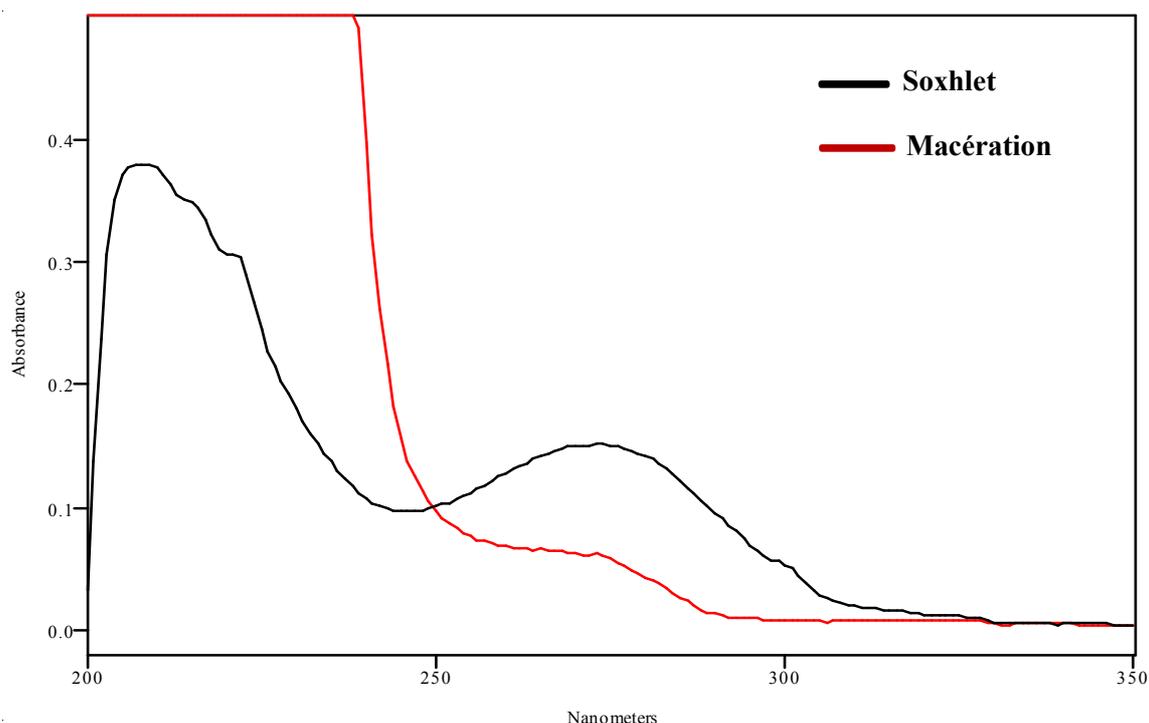


Figure III.12 : Spectres UV des extraits apolaires de carotte sauvage par macération et Soxhlet.

2.3.3.2. Caractérisation par infrarouge (IRTF)

Les spectres IR (Figure III.9) d'extrait **AM** et **AS** montrent la présence des groupements fonctionnels suivants :

- Une bande large à $3453,56 \text{ cm}^{-1}$ attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Deux pics à $2975,28$ et $2854,52 \text{ cm}^{-1}$ correspondant aux **C-H S p 3** : **CH** et **CH2** de la chaîne aliphatique.
- Plus le pic à $1457,61 \text{ cm}^{-1}$ confirmant la présence du **CH2** de la chaîne aliphatique et à $1380,59 \text{ cm}^{-1}$ caractéristique du groupe **CH3**.
- Un pic à $1784,02 \text{ cm}^{-1}$ représentant le groupement **C=O** d'une lactone.

- Un pic située à 1744,48 cm⁻¹ caractéristique de élongation de la liaison **C=O** de la fonction **ester**, la présence de cette fonction justifiée par le pic à 1246,67 cm⁻¹ qui caractérise l'élongation de la liaison **C—O** d'un ester.
- Un pic situé à 749,42 cm⁻¹ caractérise la liaison **C-H** **S p 2**.

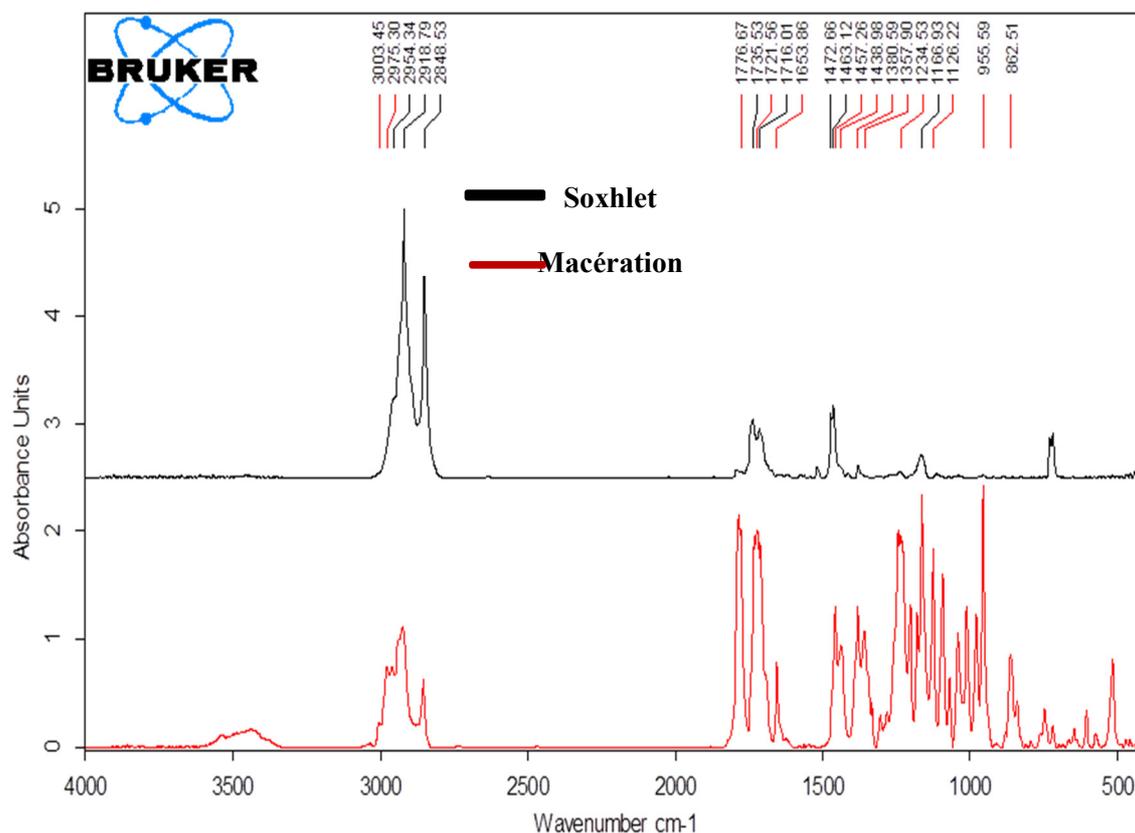


Figure III.13 : Spectre IRTF d'extrait apolaire de carotte sauvage par macération.

2.3.4. Caractéristique chimique des extraits polaires

2.3.4.1. Caractérisation par UV-vis

La superposition des extraits polaire de la carotte sauvage montre que l'extrait obtenu par soxhlet est plus riche en groupement fonctionnel ,où on remarque la présence des bandes à $\lambda_{max} = 205, 221$ nm de l'excitation $\pi-\pi^*$ de la fonction alcène $C=C$, à 245 nm de la transition $\pi-\pi^*$ de la fonction carbonyle $C=O$,et une large bande à 316 et 338 nm à cause de la photosensibilité des furocoumarines, prouvé aussi par l'apparition des taches fluorescente sur les plaque CCM sous UV contrairement à l'extrait obtenu par macération pauvre en furocoumarine, non fluorescent qui absorbe à 202 nm et faiblement à 325 nm.

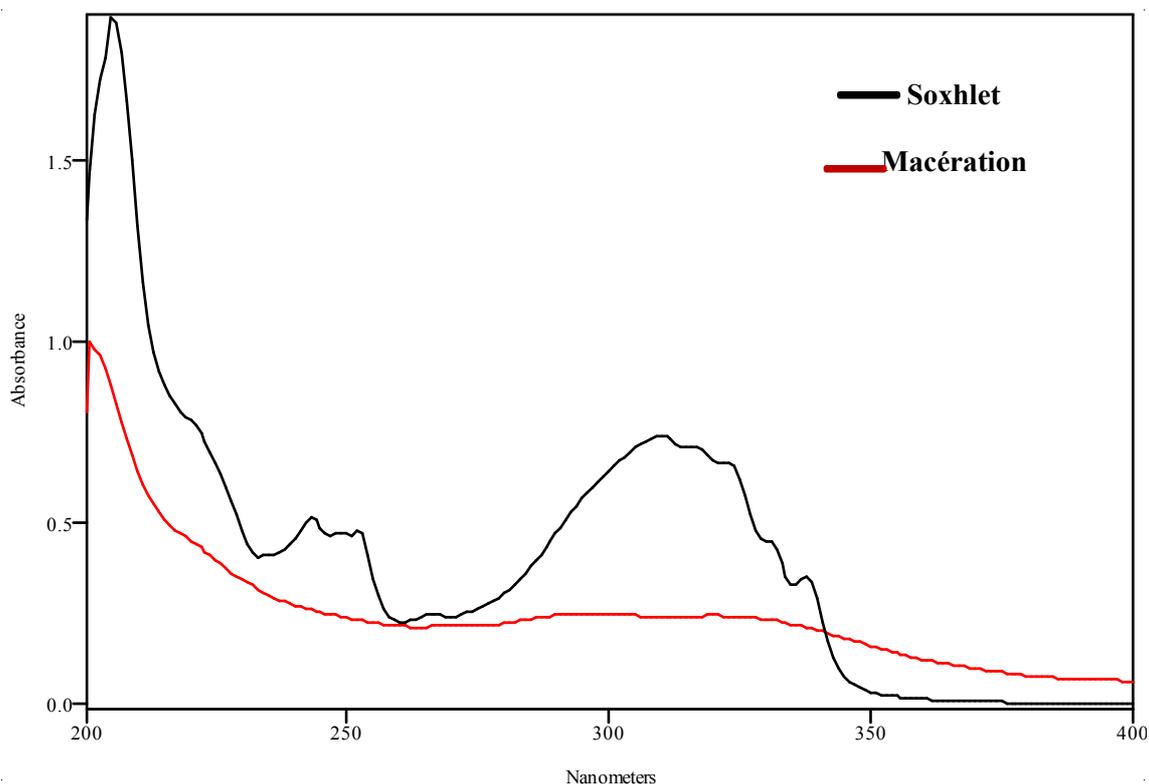


Figure III.14 : Spectre UV de l'extrait polaire de carotte sauvage par macération et Soxhlet.

2.3.4.2. Caractérisation par infrarouge (IRTF)

Les spectres IR (Figure III.15) de l'extrait **PS** et **PM** montre la présence des groupements fonctionnels suivants :

- Une bande à 3335,6. Cm^{-1} attribuée au groupement **OH** d'un alcool.
- Deux pics à 2917,9 et 2849,84 cm^{-1} correspondant aux **C-H S p 3** : **CH** et **CH2** de la chaîne aliphatique.
- Plus les bandes à 1437,97 cm^{-1} confirmant la présence du **CH2** de la chaîne aliphatique et à 1389,33 cm^{-1} caractéristique du groupe **CH3**.
- Un pic à 1739,44 cm^{-1} représentant le groupement **C=O** d'une lactone.
- Une bande à 1602,61 cm^{-1} correspondant à la liaison carbonyle **C=C** aromatique.
- Un pic situé à 717,98 cm^{-1} caractérise la liaison **C-H S p 2**.

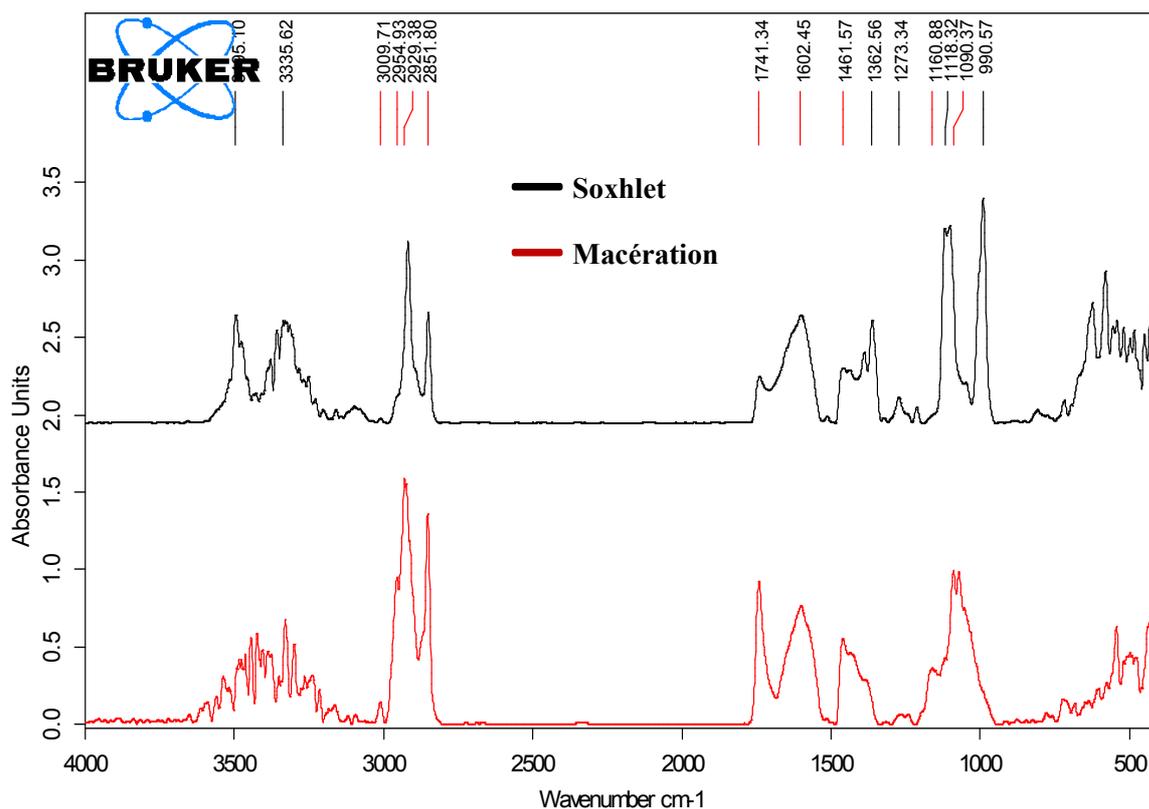


Figure III.15 : Spectres IRTF des extraits polaire de la carotte sauvage par macération et soxhlet.

3.1. Résultats du test du pouvoir antibactérien et antifongique :

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérien des extraits obtenu d'écorce d'orange par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de nos extraits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits à tester vis-à-vis de deux germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

Tableau III.8: Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) par la méthode de disques des extraits d'orange à différentes concentrations.

souches microbienne	<i>Escherichia. Coli</i>		<i>Staphylococcus Aureus</i>		<i>Aspergillus .Braziliesis</i>	
La concentration en mg / 1 ml de DMSO	0.1	0.02	0.1	0.02	0.1	0.02
L'extrait OMS	17	12	13	8	-	-
L'extrait OES	10	8	8	-	-	-

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli* apparait sensible vis-à-vis des extraits testé, ces mêmes résultats développent des zones d'inhibition moyennement importantes vis-à-vis de *Staphylococcus* dont les diamètres des zones d'inhibition varient (17-12) et (10-8) mm pour *Escherichia coli*, (13-8) et (8) mm pour *Staphylococcus*. D'autre part, l'absence de la zone d'inhibition pour *Aspergillus Braziliesis* confirme que la souche est plus résistante à ces extrais.

Nous constatons, d'une part que quel que soit la souche bactérienne considérée, les composés étudiés est active lors qu'elle est concentrée, plus elle diluée, moins elle active donc l'activité est inversement proportionnelle à la dilution.



Figure III.16 : Les zones d'inhibition des extraits OMS et OES.

4. Elaboration d'une membrane photosensibilisante à base de chitosane.

La modification chimique aboutit également à l'obtention d'une membrane photosensibilisante se présente sous forme d'un film fin de couleur jaune pâle et d'un caractère fluorescent sous la lumière UV à 254 nm avec une masse de 0.2g, selon la réaction suivante.

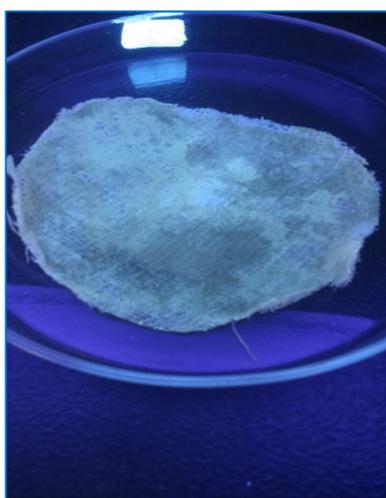
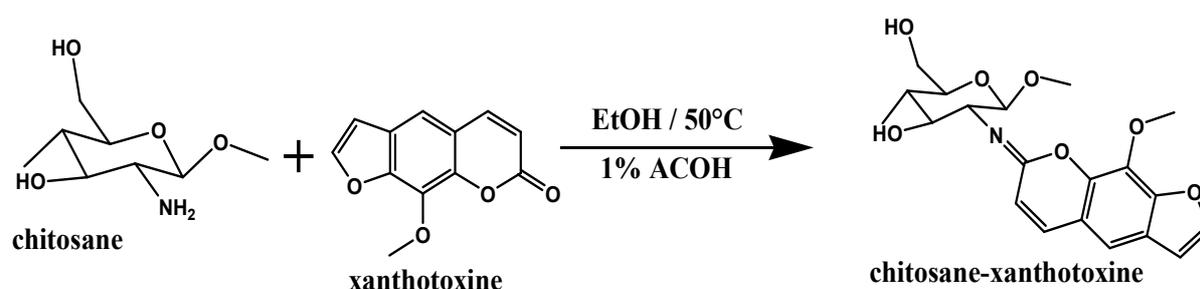


Figure III.17 : membrane photosensibilisante à base de chitosane.

4.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge (IRTF)

La (figure III.12) montre les spectres infrarouge du chitosane de départ et celui de chitosane-xanthotoxine. Les deux spectres présentent les pics d'absorption à 1076 cm^{-1} et 1032 cm^{-1} , qui peuvent être attribués à la fraction saccharide, dans le spectre IRFT de la membrane, de nouveaux pics d'absorption apparaissent à 1658.61 cm^{-1} correspondant à la caractéristique de vibrations $\text{C}=\text{N}$ d'imines et de vibrations d'étirement $\text{C}=\text{C}$. Le large pic aux alentours de 3600 cm^{-1} et 3200 cm^{-1} correspond à la vibration d'étirement de $\text{N}-\text{H}$ et les liaisons $\text{O}-\text{H}$ sont passées à une fréquence plus élevée. De plus, la caractéristique le pic d'absorption à 1592

cm-1 disparaît presque, ce qui représente une diminution du contenu du groupe -NH₂, ce qui indique que le groupe amine a réagi avec le groupement carbonyle du xanthotoxine.

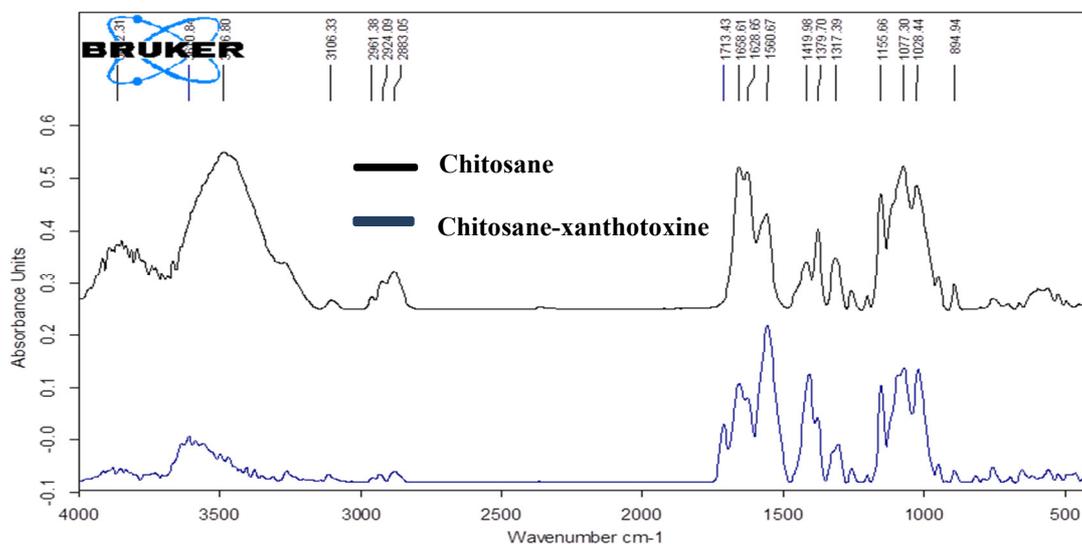


Figure III.18 : Spectres IRTF de chitosane et le chitosane-xanthotoxine.

4.2. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX)

La membrane photosensibilisante a été caractérisée par diffraction des rayons X. La figure III.15 montre les diagrammes de diffraction des rayons X de chitosane, et chitosane-xanthotoxine.

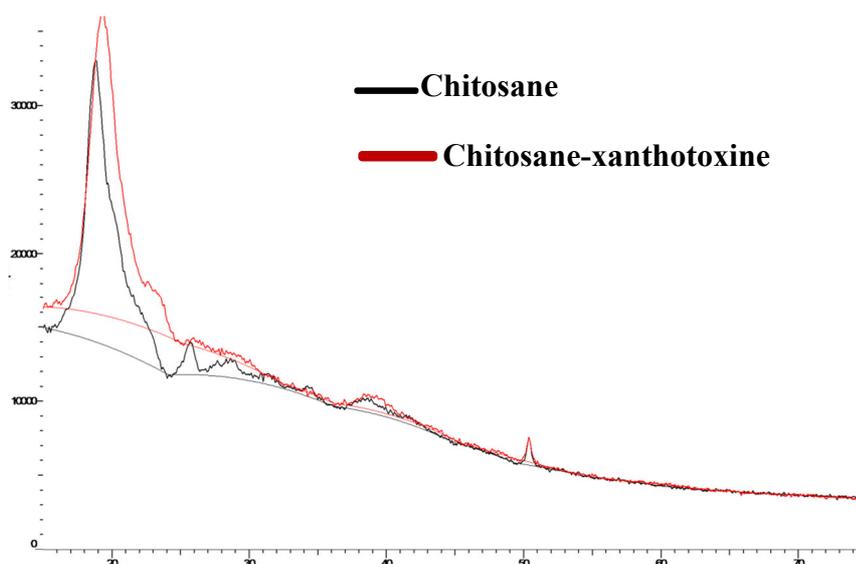


Figure III.19 : diagrammes de diffraction des rayons X de chitosane et le chitosane-xanthotoxine.

La cristallinité de la membrane préparé était examinés en utilisant les études de diffraction des rayons X. C'est avéré être un outil utile pour étudier l'arrangement du cristal et le degré de cristallinité de l'échantillon. On remarque la disparition de quelque pics caractéristiques du chitosane pur à $2\theta = 25,8^\circ$; $28,17^\circ$; $28,63^\circ$ et $33,95^\circ$, un pic à $2\theta = 22,30^\circ$ est apparu révèle le changement dans la nature cristallin et amorphe des deux polymères. Ces différences dans les schémas de DRX doit être attribuée à la réaction de réticulation et le processus de mélange de chitosane avec le xanthotoxine où la forte liaison hydrogène a été efficacement détruit et a entraîné la formation de mélange amorphe.

Spectroscopie RMN 1H

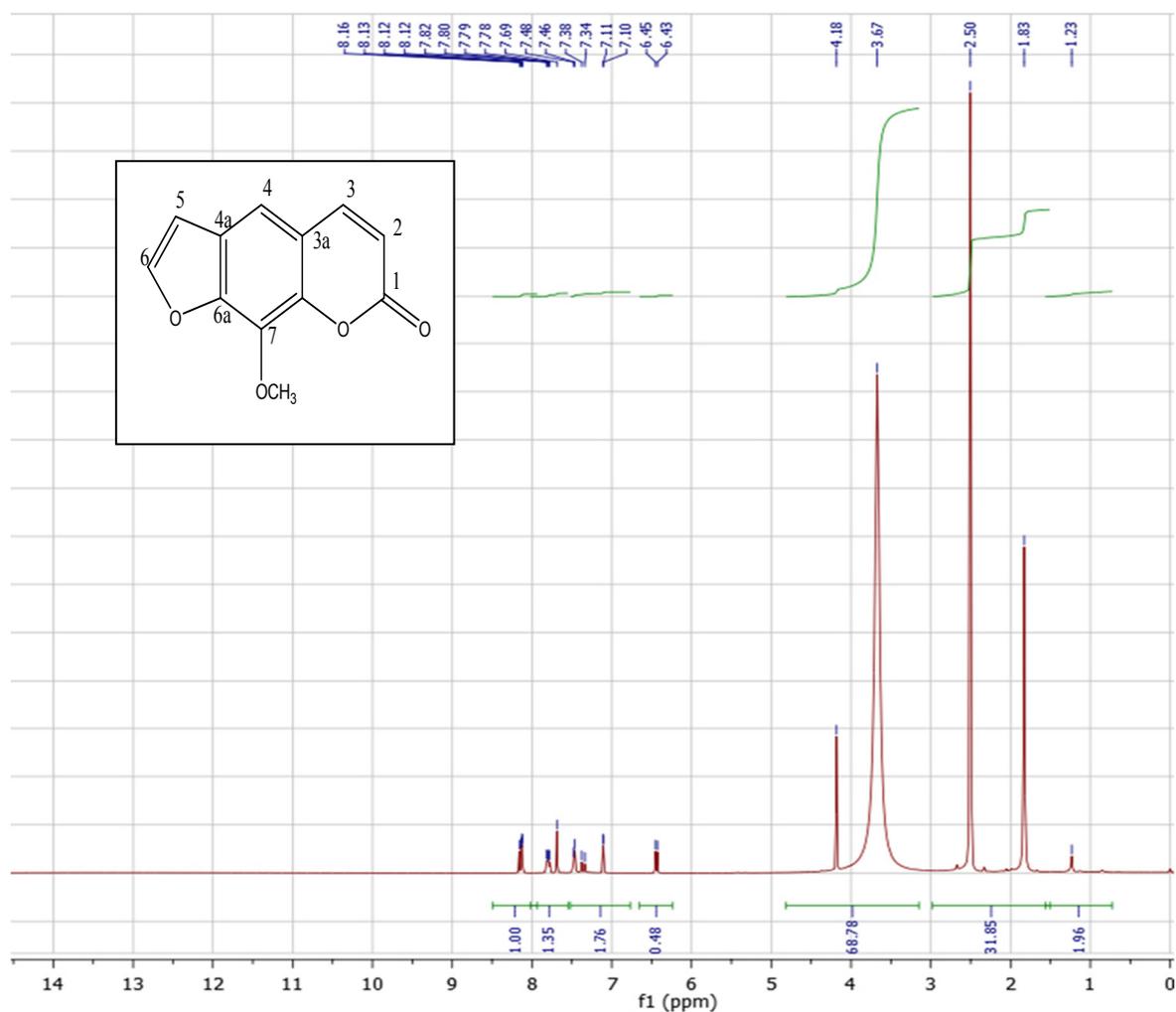


Figure III.20: Spectre RMN proton de Chitosane-xanthotoxine dans le DMSO-d.

Les signaux relatifs au spectre RMN ^1H peuvent être interprétés comme suit :

^1H -NMR (DMSO-d, 400MHz) ppm : 1,83 (s, 3H, H-7) ; 3,67 (H₂O, H-3, H-5, H-6) ; 4,20 (s, 3H, 9'-OCH₃) ; 6,42 (d, 1H, H-6') ; 7,15 (d, 1H, H-3') ; 7,35 (d, 1H, H-4) ; 7,38 (d, 1H, H-1) ; 7,65 (s, H-4') ; 7,79 (t, 2H, H-2) ; 8,13 (d, 1H, H-5') ; 8,15 (d, 1H, H-2')

CONCLUSION GENERALE

La présente étude a comme objectif l'extraction, la caractérisation et la valorisation des propriétés photosensibilisantes des furocoumarines. L'extraction des furocoumarines à partir des écorces de citron et d'orange et des fleurs de la carotte sauvage a été réalisée par Soxhlet et par macération en utilisant deux solvants de polarité différentes, l'éther de pétrole et le méthanol pour l'extraction sélective des furanocoumarines apolaires ou d'une faible polarité. Selon les résultats obtenus nous pouvons déduire que les oranges sont les plus riches en furocoumarines ou le rendement le plus élevé a été observé (2,84%) en utilisant la méthode de Soxhlet par méthanol suivi par le citron qui contient une quantité moyenne et en troisième lieu la carotte sauvage. D'après les résultats de tests phytochimiques obtenus, nous avons conclu que ces espèces sont riches en furocoumarines et possèdent un réservoir assez important de métabolites secondaires (flavonoïdes, flavonones, tanins et quinones). Après séparation et recristallisation, la pureté des produits obtenus a été déterminée par chromatographie sur couche mince, où les furocoumarines apparaissent comme des taches fluorescentes. L'identification des extraits obtenus est effectuée par la mesure de leurs points de fusion et aussi par les méthodes spectrales : UV-vis, IR.

La xanthotoxine a été extraite à partir des écorces de citron avec un rendement de 0.33%, ces caractéristiques physiques sont en accord avec la littérature et sa structure chimique a été confirmée par UV-vis, IR et RMN ^1H et ^{13}C .

L'étude du pouvoir antimicrobien des extraits OMS et OES par la méthode de diffusion sur disques a manifesté une bonne activité contre *E. Coli*, une activité moyenne contre *Staphylococcus* et une très faible activité contre *Aspergillus .Brazilicus*.

Un film photosensibilisant, fluorescent sous la lumière UV a été élaboré par greffage de la xanthotoxine sur le chitosane, sa structure chimique a été confirmée par IR, RMN ^1H et ^{13}C , la diminution de la cristallinité du chitosane a été observée par la disparition de certains pics dans le spectre DRX. En perspective il est recommandé d'utiliser ce film comme détecteur car il est fluorescent sous la lumière UV comme il peut être utilisé en photocatalyse et dans beaucoup d'autres applications.

Références bibliographiques

- [12]: Katarzyna Szewczyk. «Analytical methods for isolation, separation and identification of selected furocoumarins in plant material», thèse de doctorat. Poland: university of Lublin (2000).p.69
- [13]: F. Bordin. «Photochemical and photobiological properties of furocoumarins and homologues drugs», international journal of photoenergy (1999).p.34
- [14]: Guilhem, Vialart. « Identification et caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des furocoumarines chez les végétaux supérieurs», thèse de doctorat. Lorraine:Institut national polytechnique, (2012).p113
- [15]: Chen, C. Cancalon, P. Haun, C. «Characterization of furanocoumarins profile and inheritance toward selection of low furanocoumarins seedless grapefruit cultivars», journal of the American Society for Horticultural Science (2011).p.17
- [16]: Jane C, Quinn .Allan, Kessell. Leslie, A.«Secondary plant products causing photosensitization in grazing herbivores: their structure, activity and regulation», international journal of molecular sciences (2014).p.58
- [17]:ROMAIN Larbat. «Contribution à l'étude des P450 impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines», thèse de doctorat. Lorraine: Institut national polytechnique (2006).p.96
- [18]: WEI-LUN, HUNG. JOON, Hyuk suh.YU, Wang. «Chemistry and health effects of furanocoumarines in grapefruit», International journal of photoenergy (2016).p.33
- [19]:AUDRAY, Dugrand-judek. «Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre Citrus», thèse de doctorat. Lorraine: Institut national polytechnique (2015).p.72
- [20] : SUNDA, MakubaTeddy. «Contribution à la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes», thèse de doctorat. Belgique : la faculté des sciences de l'ULG (2012).p115.
- [21]: FAHMY, I.r. ABU-SHADY, H. «*Ammimajus L.*: pharmacological study and isolation of a crystalline constituent», ammoidin. Q. J. Pharm. Pharmacol (2000).p22
- [22]:Bhatnagar, A. Kanwar, A. J, Parsad. «Psoralen and ultraviolet A and narrowband ultraviolet B in inducing stability in vitiligo», assessed by vitiligo disease activity score: an open prospective (2004).p15

- [23] : François, aubin.Dominique, Salard. Fabienne, Pouthie. Patrick, Herve. Philippe, Humbertv. « La photochimiothérapie extracorporelle»,dossier technique. médecine/sciences (1999).p3-6
- [24]: Jose, Antonio Del Rio. Licinio, Diaz. David, garcia-bernal. Miguel, Blanquer. Ana, Ortun. «Furanocoumarinsbiomolecules of therapeuticinterest»,FlavourFragrance, Spain (2014). Vol. 20, p: 80 – 85
- [25]:F. Bordin.«Photochemical and photobiological properties of furocoumarins and homologues drugs»,international journal of photoenergy (1999).p.11
- [26]: Ishihara, M. Toda, H. Sunagane, N. Ohta, T. «Furanocoumarins contents and cytochrome P450 3A (CYP3A) inhibitory activities of various processed fruit peel products: outflow of 6', 7'-dihydroxybergamottin during processing treatment of peel», Plant Molecular Biology Reporter. (2011).p.208-212
- [27] : Benamor, B.«Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs. Texturation par détente instantanée», thèse de doctorat. France: Université de la Rochelle (2008).p.57
- [28]: Jawaad, Langrish. « Optimization of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: the importance of the maillardreaction», Journal of food engineering (2012).p.12
- [29]: YEOH, SHI. « Comparisons between different techniques forwat», journal of the American Society for Horticultural Science (2008).p.28
- [30]: Wang, l. Weller, c. «Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, trends in food science and technology», Plant Molecular Biology 69. (2006).p.473-488
- [31]: Mandal, V. Mohan, Y. « Microwave assisted extraction-aninnovative and promising extraction tool for medicinal plant research», pharmacognosy reviews (2007).p.53
- [32]Yoshihito Osada, Alexei R. Khokholov. «Polymere gels and networks»,Marcel Dekker Polymer Engineering and Science, (2002).p.142-150
- [33]: Adhikari, B. Majumdar, S. «Polymers in sensor applications. Progress in Polymer»,Journal of PaintTechnology Vol. 39,(2004). P.12

- [34] : Jarroux, N. «Les biopolymères : différentes familles, propriétés et applications», techniques de l'ingénieur (2012) Traité AM 3580.p.128
- [35]: Philibert, T. Lee, B.H. Fabien, N. «Currentstatus and new perspectives on Chitin and Chitosan as functionalbiopolymers.»,applBiochemBiotechnol, (2017).P.85
- [36] : Clarinval, A. M, Monfort. «Les polymères biodégradables », Dans Materials Science and Technology. Vol. 18(2003).P7
- [37]: Talat, B. Ayfer, M. «Cu (II) and Pd (II) complexes of water soluble O-carboxymethylchitosan Schiff bases: Synthesis, characterization»,thèse de doctorat.Aksaray, Turkeyadepartment of Chemistry, Faculty of Science and Letters, (2015).p.181
- [38]: Valentina, Perea. «Citrus sinensis monograph»,Inter. J. Food sci. nutria, Vol.59,(2016). P. 691 – 698.
- [39]: Chaturvedi, Dev. Shrivastava, Rishi Raj .Suhane,Nidhi.Basketful« benefit of citrus limon»,international research journal of pharmacy (2016).p.17 -26
- [40]: Ali Esmail, Al-Snafi. «Nutritional and therapeutic importance of *Daucuscarota*»,Journal of Agricultural and Food Chemistry (2017).P.72-88.
- [41]: Dohou, N. «Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine: *Thymelaealythroides*», bull. Soc .Pharm. Bordeaux (2003).p.64
- [42]: Ponceag, Fritz .Del, valle. Roura,SI. «Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard»,lebensmittel-Wissenschaft and technologic (2003).p.85

Annexes

MELADININE est un médicament sous forme de comprimé (30) à base de Méthoxsalène (La xanthotoxine ou Méthoxsalène) (10 mg) et sous forme de solution pour application locale à base de Méthoxsalène (0,1 %). Autorisation de mise sur le marché le 28/03/1995 par MEDIPHA SANTE. Pathologies pour lesquelles ce médicament peut être prescrit : Psoriasis, Vitiligo ,Mycosis, fongoïde, Lymphome T cutané, Lichen plan, Pelade décalvante Photodermatose ,Mastocytose cutanée ,Dermatite atopique.



ANNEX 01 : MELADININE forme de comprimé.



ANNEX 02 : MELADININE sous forme de solution.



ANNEX 03: appareil de point de fusion de marque STUART.



ANNEX 04 : spectrophotomètre IR Jasco FT/IR-400.



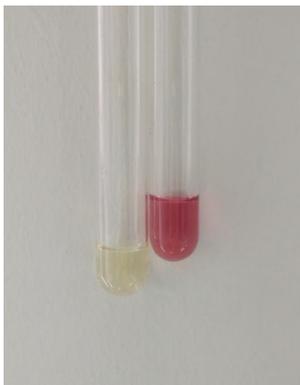
ANNEX 05 : spectrophotomètre JASCO.



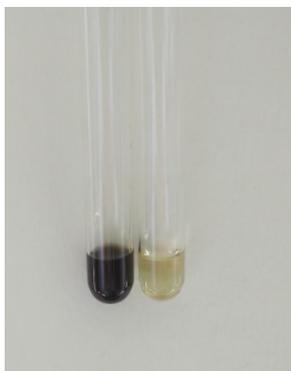
ANNEX 06 : Diffractomètre des rayons X BRUKER PHASER D2.



ANNEX 07 : Un appareil *Brucker AC-400*.



ANNEX 08 : la présence des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de citron.



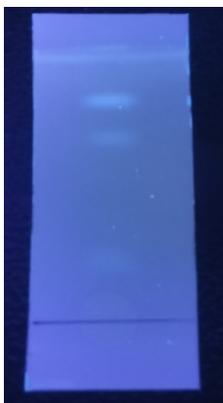
ANNEX 09 : la présence des tanins dans l'extrait méthanolique de citron.



ANNEX 09 : les extraits polaires et apolaires d'orange citron et carotte sauvage par soxhlet et macération.



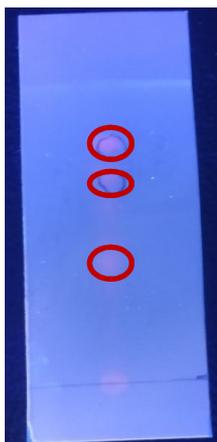
ANNEX 10 : extrait apolaire de citron par soxhlet.



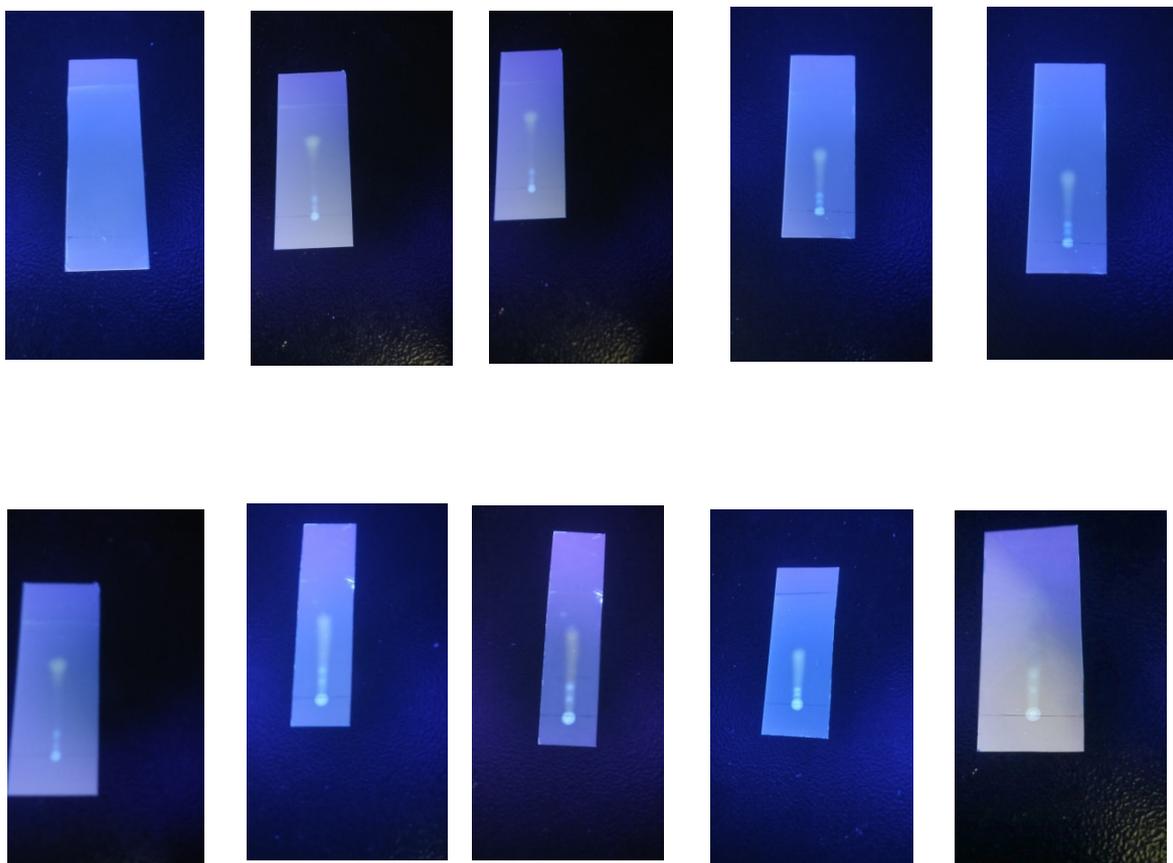
ANNEX 11 : extrait polaire de citron par soxhlet.



ANNEX 12 : extrait apolaire d'orange par macération.



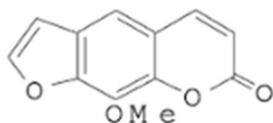
ANNEX 13 : extrait polaire de carotte sauvage par macération.



ANNEX 14 : suivie de la modification chimique par la CCM.

Xanthotoxin**X-15**

9-Methoxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one, 9CI, 8CI. 9-Methoxyfuro[3,2-g]chromen-7-one. 8-Methoxy-4',5':6,7-furocoumarin. 9-Methoxypsoralen. 8-Methoxypsoralen. **Methoxsalen, BAN.** Zanthotoxin. Ammoidin. Meloxine. Methoxa-Dome. Geroxalen. Oxsoralen. Puvalen. Puvamet. Methoxalen [298-81-7]



$C_{12}H_8O_4$ 216.193

Present in celery, esp. the outer leaves, and other common grocery vegetables. Implicated in photodermatitis among grocery workers. Isol. from *Aegle mar-*

- Negwer, M. *et al.*, *Organic-Chemical Drugs and their Synonyms*, 6th edn., Akademie-Verlag, 1987, 2202
- Diawara, M.M. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 723-727 (*occur*)
- Masuda, T. *et al.*, *Phytochemistry*, 1998, **47**, 13-16 (*isol, uv, pmr, cmr*)
- Fujioka, T. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1999, **47**, 96-100 (*isol, pmr, cmr*)
- Oliva, A. *et al.*, *J. Chem. Ecol.*, 1999, **25**, 519-526 (8-Methoxypsoralen, activity)
- Martindale, The Complete Drug Reference*, 32nd edn., Pharmaceutical Press, 1999, 1086
- Lewis, R.J. *et al.*, *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*, 10th edn., J. Wiley, 2000, XDJ000

ANNEX 15**ANNEX 14**

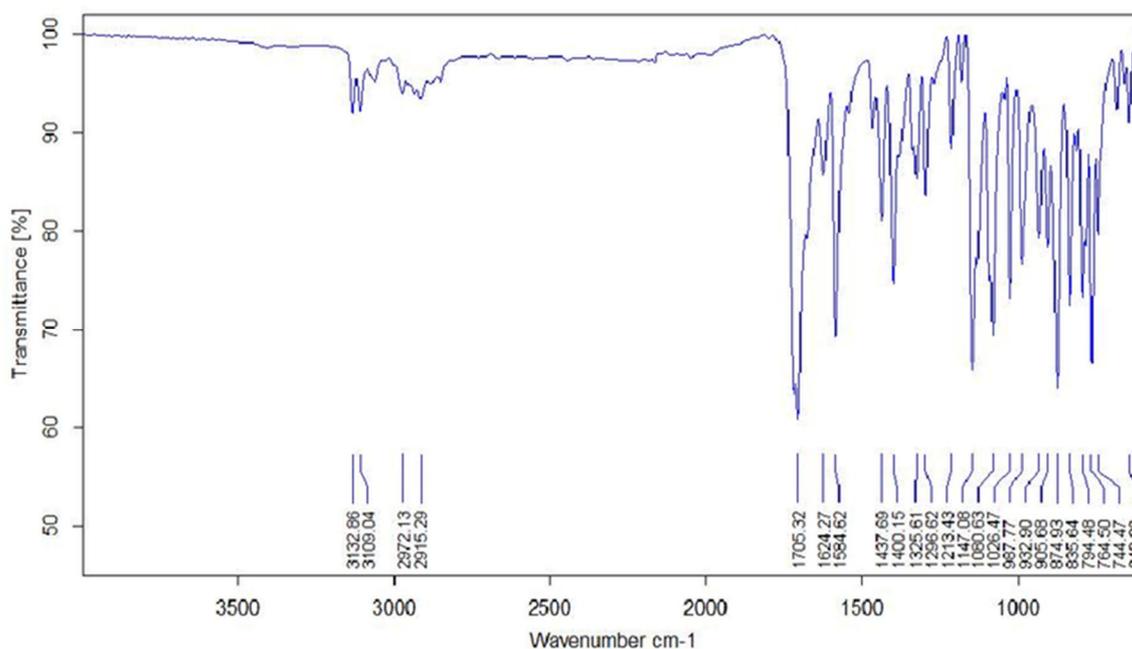
- Karrer, W. *et al.*, *Konstitution und Vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe*, 2nd edn., Birkhuser Verlag, 1972, no. 1375 (*occur*)
- Chatterjee, A. *et al.*, *Tetrahedron*, 1972, **28**, 5175-5182 (*synth*)
- Austin, D.J. *et al.*, *Phytochemistry*, 1973, **12**, 1657-1667 (*biosynth*)
- Miyakado, M. *et al.*, *Phytochemistry*, 1978, **17**, 143-144 (*synth*)
- Lin, Y.-Y. *et al.*, *J. Het. Chem.*, 1979, **16**, 799-801 (*synth*)
- Loutfy, M.A. *et al.*, *Anal. Profiles Drug Subst.*, 1980, **9**, 427-454 (*rev*)
- Anderson, T.F. *et al.*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1980, **20**, 235-257 (*rev, pharmacol*)
- Nore, P. *et al.*, *J. Het. Chem.*, 1980, **17**, 985-987 (*synth, bibl*)
- Dall'Acqua, F. *et al.*, *Cryst. Struct. Commun.*, 1981, **10**, 505-509 (*cryst struct*)
- IARC Monogr.*, 1981, **24**, 101-124; 1987, *Suppl. 6*, 380; *Suppl. 7*, 243 (*rev, tox*)
- Mays, D.C. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1986, **236**, 364-373 (*metab*)
- Stolk, L.M.L. *et al.*, *Pharm. Int.*, 1986, **7**, 259-262 (*rev, pharmacol*)
- Duddeck, H. *et al.*, *Magn. Reson. Chem.*, 1987, **25**, 489-491 (*O-17 nmr*)

- melos* (bael). Cryst. (EtOH aq.). Sol. EtOH. Mp 148°. Log P 2.3 (calc). Bitter tasting with tingling sensation. λ_{max} 218 (ϵ 25300); 248 (ϵ 24600); 299 (ϵ 12400) (MeOH). λ_{max} 219 (ϵ 30000); 249 (ϵ 28800); 301 (ϵ 14400) (EtOH) (Berdy).
- Human carcinogen (IARC) in combination with UV light. LD₅₀ (rat, orl) 791 mg/kg. LV1400000
- Aldrich Library of FT-IR Spectra*, 1st edn., 1985, **2**, 684D (*iv*)
- Aldrich Library of 13C and 1H FT NMR Spectra*, 1992, **3**, 173B (*nmr*)
- Späth, E. *et al.*, *Ber.*, 1936, **69**, 767-770 (*isol*)
- Scheel, W. *et al.*, *Biochemistry*, 1963, **2**, 1127-1131 (*isol*)
- Barnes, C.S. *et al.*, *Aust. J. Chem.*, 1964, **17**, 975-986 (*ms*)
- Sheinker, Yu.N. *et al.*, *Dokl. Chem. (Engl. Transl.)*, 1964, **158**, 1121-1124 (*pmr*)
- Stemple, N.R. *et al.*, *Acta Cryst. B*, 1972, **28**, 2485-2489 (*cryst struct*)
- Karrer, W. *et al.*, *Konstitution und Vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe*, 2nd edn., Birkhuser Verlag, 1972, no. 1375 (*occur*)
- Chatterjee, A. *et al.*, *Tetrahedron*, 1972, **28**, 5175-5182 (*svnth*)

ANNEX 16**ANNEX 17**

Xanthotoxin (Methoxalen, 9-methoxypsoralen, Ammoidin, 9-methoxyfuro[3,2-g][1]benzopyran-7-one) [298-81-7] **M** 216.2, **m** 146-148°, 148°, 148-149°. Purify **xanthotoxin** by recrystallisation from *C₆H₆/petroleum ether (b 60-80°) to give silky needles, or from EtOH/Et₂O to give rhombic prisms or from hot H₂O to give needles. It is soluble in aqueous alkali due to ring opening of the cyclic lactone but recyclises upon acidification. It has UV with λ_{max} (EtOH) at 219, 249 and 300nm (log ϵ 4.32, 4.35 and 4.06) and ¹H NMR in CDCl₃ with δ at 7.76 (d, 1H, *J* = 10Hz), 7.71 (d, 1H, *J* = 2.5Hz), 7.38 (s, 1H), 6.84 (d, 1H, *J* = 2.5Hz), 6.39 (d, 1H, *J* = 10Hz) and 4.28 (s, 3H). [Nore & Honkanen *J Heterocycl Chem* **17** 985 1980.] It is a DNA intercalator, is used in the treatment of dermal diseases, and is a **human carcinogen** [Tessman et al. *Biochemistry* **24** 1669 1985]. [Beilstein **19** I 711, **19/6** V 15.]

ANNEX 18



ANNEX 19 : spectre infra rouge de xanthotoxine.