

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

Faculté : Des sciences

Département: de chimie

N° ..... /2020



Domaine: Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Option: Chimie Pharmaceutique

**Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique**

**Par :**

Meryem BERRA  
Meriem KAICHE  
Yasmine ZIOUACHE

**Intitulé**

**Recherche bibliographique sur l'activité  
biologique de la *Curcumine* et leur complexation  
par  $\beta$ -CD**

Soutenu devant le jury composé de :

Président: H. BOULEGHLEM      Université Mohamed Boudiaf –M'sila  
Examinatrice: S .YOUSFI      Université Mohamed Boudiaf –M'sila  
Promotrice : S. ZIDANE      Université Mohamed Boudiaf –M'sila

**Année universitaire : 2019/2020**

# Remerciement

Au terme de ce travail, nous remercions avant tout Allah de nous avoir gardés en bonne santé afin de mener à bien ce mémoire de fin d'étude.

Nos remerciements les plus sincères vont à notre promotrice *M<sup>me</sup> ZIDANE S*, pour sa simplicité, pour la confiance qu'elle nous a accordé et sa gentillesse à notre égard.

Nous remercions l'ensembles des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, notamment : Monsieur

H. Bouleghlem (Président) et Madame  
S .Yousfi(Examinatrice).

Enfin nous tenons à remercier toutes personnes ayant contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# *Dédicace*

*Nous dédions ce mémoire*

*A nos chers parents*

*A nos chers frères et sœurs*

*A toutes nos familles*

*A tous nos amis*

*A tous les personnes que nous connaissons*

*À ceux qui nous ont aidés et qui nous ont  
donné l'espoir et la confiance pour relever ce  
défi.*

## Résumé

L'objectif de notre travail est l'étude bibliographique de l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne de curcumine et du complexe  $\beta$ -cyclodextrine/curcumine. Nous avons déterminé la méthode d'extraction du curcumine la plus convenable, qui donne un bon rendement. D'autre part, nous avons effectué une autre étude théorique sur la complexation du curcumine avec les cyclodextrines pour savoir l'effet de la cyclodextrine sur les propriétés (stabilité, solubilité et biodisponibilité) et l'efficacité (activité antioxydante et antibactérienne) du curcumine. Nous avons trouvé que la cyclodextrine amélioré les propriétés de la curcumine et a augmenté leur activité antioxydante et antibactérienne.

**Mots clés:** curcumine, cyclodextrine, extraction, antioxydante, antibactérienne.

## Abstract

The objective of our work is the bibliographic studies of antioxidant activity and antibacterial activity of curcumin and complex  $\beta$ -cyclodextrin/curcumin. We have determined the most suitable of extracting curcumin, which give a good yield. On the other hand, we have carried out another theoretical study about the complexation of curcumin with cyclodextrins to find the effect of cyclodextrin on the properties (stability, solubility and bioavailability) and efficiency (antioxidant and antibacterial activity) of curcumin. We have found that cyclodextrin enhanced the properties of curcumin and increased their antioxidant and antibacterial activity.

**Keywords :** curcumin, cyclodextrin, extraction, antioxidant, antibacterial.

## الملخص

الهدف من عملنا و الدراسة البيبليوغرافية للنشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للبكتيريا للكرمين ومركب سيكلوديكترين/كرمين. قمنا بتحديد الطريقة المناسبة لاستخلاص الكركمين والتي تعطي مردود جيد. من جهة أخرى أنجزنا دراسات نظرية حول تشكيل معقد الكركمين مع السيكلوديكترين من أجل معرفة مدى تأثير السيكلوديكترين على الخصائص (الاستقرار الذوبانية والتوافر البيولوجي) والفعالية (النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للبكتيريا) للكرمين. في الأخير وجدنا أن السيكلوديكترين يقوم بتحسين خصائص الكركمين ويزيد من فعاليته كمضاد للأكسدة ومضاد للبكتيريا.

**الكلمات المفتاحية:** الكركمين، سيكلوديكترين، استخلاص، مضاد للأكسدة، مضاد للبكتيريا.

# Sommaire

Liste des figures .....	I
Liste des tableaux.....	III
Liste des abréviations .....	IV
Introduction générale.....	01

## Chapitre I : Etude bibliographique

I.1.Introduction .....	03
I.2.Etymologie.....	03
I.3.Histoire du curcuma.....	03
I.4.Description botanique de la plante.....	04
I.5.Composition chimique.....	04
I.6.Curcumine .....	06
I.6.1.Propriétés de curcumine .....	07
I.6.1. a. Solubilité de la curcumine.....	07
I.6.1. b. Stabilité de curcumine.....	07
I.6.1.c. Absorption.....	07
I.6.2. Activité biologique de curcumine.....	08
I.6.2.a. Activité antioxydante.....	08
I.6.2.b. Activité anti-inflammatoire.....	08
I.6.2.c. Activité anticancéreuse.....	09
I.6.2.d. Activité antifongique.....	10
I.6.2.e. Activité antibactérienne.....	10
I.6.2.f. Activité antithrombotique : inhibition de l'agrégation plaquettaire.....	11
I.6.3. Baisse du niveau de cholestérol.....	11
I.7. Méthodes d'extraction.....	11
I.7.1. Hydrodistillation.....	11
I.7.2. Entraînement à la vapeur d'eau.....	12
I.7.3. L'expression à froid.....	12
I.7.4.Extraction solide - liquide.....	12

I.7.5. Extraction assistée par micro-onde.....	13
I.7.6. Extraction par le CO <sub>2</sub> .....	14
I.8. Conclusion .....	14

## Chapitre II: Activite antioxydante&antibacterienne

II.1. Introduction.....	15
II.2. Stress oxydatif.....	15
II.3. Radicaux libres.....	15
II.4. Antioxydants.....	17
II.4.1. Sources des antioxydants .....	17
II.4.1.a. Antioxydants exogènes.....	17
II.4.1.b. Antioxydants endogènes.....	17
II.4.2. Mécanismes d'action des antioxydants.....	18
II.4.3. Maladies liées au stress oxydant.....	20
II.5. Activité antibactérienne.....	20
II.5.1. Définition des bactéries .....	20
II.5.2. Principales substances antimicrobiennes.....	20
II.5.2.1. Antibiotiques.....	20
II.5.2.2. Composés phénoliques .....	20
II.5.2.3. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens.....	21
II.5.2.3.1. Escherichia coli.....	21
II.5.2.3.2. Staphylococcus aureus.....	21
II.5.2.3.3. Pseudomonas aeruginosa.....	21

## Chapitre III: La molécule cage

III.1. Généralité sur les Cyclodextrines.....	22
III.2-Production.....	22
III.3-Structure.....	23
III.4-Les caractéristiques physico-chimiques.....	24
III.5-Dérivés des cyclodextrines.....	25
III.5-1-Dérivés hydroxypropyles.....	27
III.5-2-Dérivés méthylés.....	27
III.5-3- Dérivés sulfobutylés.....	27
III.6-Complexes d'inclusion.....	28
III.7-Conséquence de complexation.....	29

<b>III.8-Les techniques de préparation des complexes d'inclusion CD/invité.....</b>	<b>29</b>
III.8-1-L'inclusion par mélange physique ou mélange sec.....	29
III.8-2-L'inclusion par micro-onde.....	29
III.8-3-L'inclusion par pétrissage (kneading).....	30
III.8-4-L'inclusion par extrusion.....	30
III.8-5-L'inclusion par co-précipitation.....	30
III.8-6-L'inclusion par co-évaporation.....	31
<b>III.9-Méthodes et caractérisation des complexes d'inclusion.....</b>	<b>31</b>
III.9-1-Chromatographie Liquide à Haute Performance.....	31
III.9-2-La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	31
III.9-3-Spectroscopie Infrarouge (IR) .....	32
III.9-4-Spectroscopie UV-visible.....	32
<b>III.10-Diagrammes de solubilité.....</b>	<b>32</b>
<b>III.11-conclusion.....</b>	<b>34</b>
 <b>Chapitre IV: Etude comparative</b>	
<b>IV.1. Etude comparative des méthodes d'extraction de curcumine.....</b>	<b>35</b>
IV.1. 1.Introduction.....	35
IV.1.2. Les méthodes utilisées pour l'extraction de la molécule du curcumine.....	35
IV.1.2.1. Première étude.....	35
IV.1.2.1.a. Extraction par macération.....	35
IV.1.2.1.b. Extraction par micro onde.....	35
IV.1. 2.2.Deuxième étude.....	37
IV.1.3.Conclusion.....	37
<b>IV.2.Etude comparative de la complexation de cyclodextrine avec la curcumine.....</b>	<b>37</b>
IV.2.1. Choix de cyclodextine.....	37
IV.2.2. Choix de la méthode de formation d'un complexe d'inclusion.....	39
IV.2.3. Conclusion.....	40
<b>IV.3. Etude comparative de l'activité biologique de la curcumine et du complexe</b>	
<b>CD/Curcumine.....</b>	<b>40</b>
IV.3.1.Evaluation de l'activité antioxydante.....	40
IV.3 .1. 1.Etude de l'activité antioxydante de la curcumine.....	40

<b>IV.3.1. 2.Activité antioxydante du complexe .....</b>	<b>43</b>
<b>IV.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....</b>	<b>44</b>
<b>IV.3.2.1.Etude de l'activité antibactérienne du Curcumine.....</b>	<b>44</b>
<b>IV.3.2.1. c. Conclusion .....</b>	<b>46</b>
<b>IV.3.2.2. Etude de l'activité antibactérienne du Complexe CD/curcumine.....</b>	<b>47</b>
<b>IV .3.3. Résultats des études.....</b>	<b>48</b>
<b>IV .4. Conclusion.....</b>	<b>48</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>49</b>
<b>Références.....</b>	<b>50</b>



## Liste des figures

<b>Fig.I.1.</b> Schéma et photographie de la plante <i>Curcuma longa</i> L.....	04
<b>Fig.I.2.</b> Structure chimique des principaux constituants de l'huile essentielle de curcuma.....	06
<b>Fig.I.3.</b> Structure chimique de curcumine 1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) -1,6 Heptadiène-3,5-dione.....	06
<b>Fig.I.4.</b> Hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	13
<b>Fig.II.1.</b> Déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et le système de défense antioxydant Lors du stress oxydant.....	15
<b>Fig. II.2.</b> Les différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants Régulateurs de leur production.....	16
<b>Fig. II.3.</b> Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.....	18
<b>Fig. II.4.</b> Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.....	19
<b>Fig.II.5.</b> Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leur Cofacteurs métalliques.....	19
<b>Fig.III.1:</b> Voie de production industrielle des trois cyclodextrines.....	22
<b>Fig.III.2.</b> Structure de $\beta$ -CD.....	23
<b>Fig.III.3.</b> Structure générale de dérivés de la $\beta$ -CD.....	26
<b>Fig.III.4.</b> Représentation de différents types de complexes « hôte/invité » .....	28
<b>Fig.III.5.</b> Représentation graphique des profils de solubilité de type A et B avec sous types applicables ( $A_P$ , $A_L$ , $A_N$ and $B_S$ , $B_I$ ) .....	33
<b>Fig. IV.1.</b> Rendement des extraits de curcuma par différentes méthodes d'extractions.....	36
<b>Fig.IV.2.</b> Diagramme de solubilité de complexe CD/curcumine.....	38
<b>Fig.IV.3.</b> Diagramme de solubilité de curcumine avec HP- $\beta$ -CD et $\beta$ -CD dans l'eau distillée à ( $37 \pm 0.5$ ) °C.....	39
<b>Fig. IV.4.</b> Activités de piégeage DPPH de l'extrait de <i>C. longa</i> et comparé avec L'hydroxytoluène Butyle comme solution standard.....	41

<b>Fig.IV.5.</b> Comparaison entre antioxydant connu et curcumine.....	42
<b>Fig. IV.6.</b> Pourcentage du pouvoir réducteur de la curcumine sur le potassium ferricyanure. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard.....	42
<b>Fig.IV. 7.</b> Taux du piégeage des radicaux DPPH du complexe CD/curcumine et Curcumine.....	43
<b>Fig IV.8.</b> pourcentage d'inhibition de piégeage ABTS $\cdot^+$ du complexe CD/curcumine et de la curcumine.....	44
<b>Fig. IV.9.</b> Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'extrait de Curcuma sur les quatre bactéries.....	45
<b>Fig. IV.10.</b> Activité antibactérienne des différentes concentrations de curcumine dans tween sur les quatre bactéries.....	45
<b>Fig. IV.11.</b> Activité antibactérienne à des concentrations minimales du curcumine, $\beta$ -CD/curcumine et de $\gamma$ -CDs/Curcumine.....	47

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1.</b> Composants contenus dans 100 g de curcuma.....	05
<b>Tableau III.1.</b> Caractéristiques physicochimiques des principales CDs natives.....	24
<b>Tableau III.2.</b> Caractéristiques des dérivés de cyclodextrines.....	27
<b>Tableau IV.1.</b> Présentation des résultats de rendement des extraits.....	36
<b>Tableau IV.2.</b> Constante de stabilité de complexe CD/curcumine.....	38
<b>Tableau IV.3.</b> Souches bactériennes.....	44
<b>Tableau IV.4.</b> L'activité bactérienne de l'extrait de curcuma par la méthode de diffusion en puits et la méthode de diffusion sur disque.....	46

## Liste des abréviations

**ABTS** : (Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique

**aPDT** :Thérapie photodynamique antimicrobienne

**BHT** :Hydroxytoluènebutylé

**CAT** : Catalases

**CD** :Cyclodextrine

**CGT ase** : cyclodextrine glucosyl transférase

**CI50** :concentration inhibitrice médiane

**CMB** : concentration minimale bactéricide

**CMI** :concentration minimale inhibitrice

**DMSO** :diméthylsulfoxyde

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**EOA** : espèces oxygénées activées

**FAP**: facteur d'activation de la plaque

**GPx**: Glutathion peroxidase

**GSH**: glutathion

**HP- $\beta$ -CD**: hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine

**HDL** :lipoprotéines de la haute densité

**HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Performance

**IR** : Infrarouge

**Ks** : constante de stabilité

**pKa** :Constante d'acidité.

**RMN** :Résonance Magnétique Nucléaire

**LDL** :lipoprotéines de basse densité

**LPO** :lipidperoxidation

**ME** : méthyle

**mM** : Millimole

**MS** : substitution molaire moyen

**M $\beta$ -CD** :méthyle- $\beta$ - cyclodextrine

**nm** : nanomètre

**OMS** :organisation mondiale de santé

**pH**: potentiel hydrogène

**pKa** :Constante d'acidité.

**PRA** : pouvoir réducteur de l'activité

**RMN** :Résonance Magnétique Nucléaire

**ROS** : Espèces Réactives de l'Oxygène

**RS** :Espèces Réactives

**SBE** :sulfobutyléther

**SH**:glutathion

**SOD** :superoxydesdismutases

**UV-visible** :Ultraviolet- visible

# *Introduction générale*

## *Introduction générale*

Depuis des milliers d'années, les produits naturels d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) ou sont des dérivés de produits naturels. La recherche sur les produits naturels dans l'industrie pharmaceutique a connu un lent déclin [1].

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments. L'organisation mondiale de la santé (OMS), a signalé que les plantes médicinales seraient la meilleure source pour obtenir une variété de médicaments efficaces et moins nocifs. Ce retour aux plantes médicinales a été le seul refuge et la bonne solution vis-à-vis la diminution de l'efficacité des médicaments et des antibiotiques synthétiques en plus, de leurs effets secondaires inquiétants [2].

Le curcuma, *Curcuma domestica* Val ou *Curcuma longa* L., est une plante vivace appartenant à la même famille que le gingembre (les *Zingiberaceae*). Il est cultivé sous les tropiques, le rhizome est la partie utilisée de la plante [3]. Il réduit en poudre jaune. Cependant le *curcuma* est connu de toutes les médecines savantes surtout la médecine grecque et la médecine ayurvédique [4].

La couleur jaune caractéristique de la poudre de rhizome est donnée par les curcuminoïdes. Parmi ceux-ci, la *curcumine* est la molécule la plus abondante et la plus étudiée, elle a été isolée pour la première fois en 1815 mais il a été confirmé et synthétisé en 1910, la *curcumine* présente un grand nombre de propriétés pharmacologique très intéressantes comme l'activité antioxydante, l'activité anti inflammatoire et l'activité anticancéreuse [3]. Elle possède une application très intéressante dans l'industrie pharmaceutique en raison de ces nombreuses propriétés pharmacologique, mais son potentiel optimum est limité en raison de leur faible biodisponibilité et solubilité dans le corps humain. Pour surmonter le problème et pour améliorer leur activité, les auteurs ont pensé à la complexation avec les cyclodextrines et en particulier avec la  $\beta$ -CD.

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques formés à partir de la dégradation enzymatique de l'amidon. Elles sont peu coûteuses et ont meilleures propriétés physiques, chimiques et biologiques. Elles ont été utilisées comme excipients pharmaceutiques pour des substances hydrophobes et comme agents solubilisants et stabilisants. Les cyclodextrines présentent une structure avec une "cavité" leur permettant de donner naissance à des complexes d'inclusion [5].

## Introduction générale

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, qui a pour objectif de faire une étude bibliographique sur l'activité antioxydante et antibactérienne de *curcumine* et du complexe  $\beta$ -cyclodextrine/*curcumine*. Ce manuscrit est structuré en quatre chapitres; dans le premier chapitre, nous avons réalisés une étude bibliographique sur le curcuma, ensuite nous avons étudié les différents procédés d'extraction des plantes médicinales, le deuxième chapitre est consacré à l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne, tandis que le troisième chapitre a regroupé les informations sur les cyclodextrines. Dans le quatrième chapitre, nous avons présentés une étude théorique et comparative concernant les axes principaux de ce travail : les méthodes d'extraction de *curcumine*, la complexation de *curcumine* avec les cyclodextrine et l'activité biologique de *curcumine* et du complexe CD/*Curcumine*.

Nous terminons par une conclusion générale qui résume les résultats les plus concluants obtenus de cette étude.



# CHAPITRE

## I

### *Étude bibliographique sur le curcuma*

**I.1.Introduction**

La recherche de substances naturelles bioactives issues du règne végétal, et l'étude de plantes possédant des propriétés pharmacologiques et aussi potentiellement valorisables dans les domaines cosmétique, alimentaire et pharmaceutique, parmi les thèmes-phares des projets de recherche actuels dans le monde, *Curcuma* est l'une de plus étudié. Des préparations à base des plantes et des molécules extraites de *Curcuma* avérées posséder des larges variétés de propriétés pharmacologiques contre nombreuses des maladies humaines.

L'épice dorée ou l'épice de vie. Le *curcuma* rhizome réduit en poudre est utilisé en tant qu'épice alimentaire pour renforcer la saveur des aliments et les conserver, et comme colorant des aliments et des textiles. Il est utilisé aussi depuis des siècles en médecine traditionnelle indienne et chinoise. Le *curcuma* fourni par une Zingibéracée (proche du gingembre et de la cardamome). La poudre a une saveur poivrée et amère. La couleur jaune qu'elle confère est principalement causée par la curcumine, un pigment phénolique elle a été isolée pour la première fois en 1815 a un grand nombre de propriétés pharmacologiques remarquables : c'est un puissant agent anti-inflammatoire sans effet toxique aussi il exerce une activité action activité anticancéreuse. Mais La principale activité de curcumine est l'activité antioxydante.

**I.2.Etymologie**

Son nom scientifique est le *Curcuma longa*. Il se nommait jadisensanscritHaidara ou Gauri et en hindi Haldi. Il est connu par les Arabes sous le terme de Kourkoum, d'où le terme européen Curcumine dérive. Curcuma est connu depuis des millénaires surtout en Asie .il est parfois qualifié de safran indien, safran des Indes, safran du sud ou safran des pauvres. La ressemblance de sa poudre avec l'ocre minéral précieux a donné le terme turmérique, souvent utilisé aux Indes et par les Anglais et qui dérive du latin terra-mérta et du français médiéval terre-mérite [6].

**I.3.Histoire du curcuma**

L'*Atharvaveda*est le premier texte Hindou qu'était donné un rapport sur le *curcuma*. Il présent qu'avant 6 000 ans le *curcuma* était utilisé pour chasser la jaunisse et pour le traitement de lèpre. Aussi le curcuma a été répertorié comme plante colorante dans une plante assyrienne. Il y a un grand débat sur l'origine du *curcuma*. D'un part Marco Polo, en 1280 qui mentionné que le curcuma poussant dans le Fokienrégion de Chine. d'autre part des preuves

indiquent que le *curcuma* était cultivé en Inde depuis les temps anciens, mais si le curcuma qu'ils utilisaient était *curcuma Longa* ou une autre espèce à rhizome jaune [7].

Malgré l'origine du *curcuma* n'est pas clairement identifié. Mais on peut penser qu'il est originaire d'Inde ainsi que les autres espèces du genre *curcuma* [7].

#### I.4. Description botanique de la plante

C'est une plante herbacée vivace de 60–100 cm de hauteur avec une tige courte et grandes feuilles gainâtes. Les Feuilles sont très longs avec des lames elliptiques, en touffes jusqu'à 1m ou plus longue, la tige est aussi longue que la lame, et dont le pétiole, effilé à la base. Les Fleurs sont généralement jaunes et assemblées en épi, mesurent entre 10–15 cm de long, leur pédoncule mesure 15 cm de long. Il caché par les gaines des pétioles, quand il fleurit les bractées vert clair deviennent violettes [8].

Le *curcuma* commercial se compose de rhizome primaire il est ovale, oblongs, piriforme, généralement appelé *Curcuma* « bulbe » ou « rond ». Les rhizomes secondaires sont plus cylindriques, mesurent entre 4–7 cm de long et 1 à 1,5 cm de large appelé « doigts ». Extérieurement jaunâtre ou brun jaunâtre. Intérieur jaune ou jaune orangé, L'odeur est aromatique et le goût chaud et un peu amer [8].



Fig.I.1. Schéma et photographie de la plante *Curcuma longa* L[9].

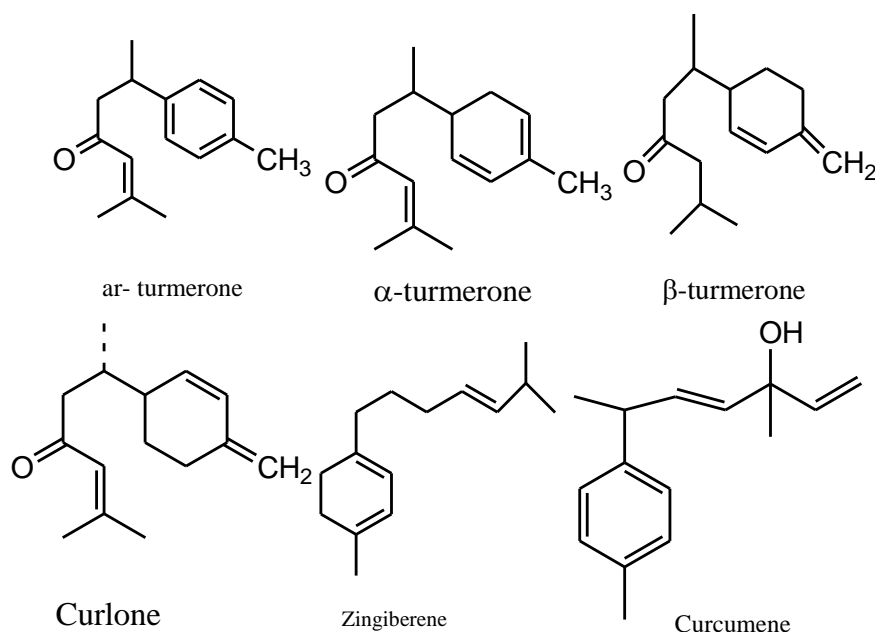
#### I.5. Composition chimique

Pour 100 g de partie comestible, la poudre de *curcuma* contient approximativement :

Composants	Quantités
Eau	11,4 g
Energie	1481 kJ (354 kcal)
Protéines	7,8 g
Lipides	9,9 g
Glucides	64,9 g
<b>Dont Amidon :45 à 55% de la composition totale</b>	
Fibres alimentaires	21,1 g
Ca	183 mg
Mg	193 mg
P	268 mg
Fe	41,4 mg
Zn	4,4 mg
Vitamine A	Traces
Thiamine	0,15 mg
Riboflavine	0,23 mg
Niacine	5,14 mg
Folate	39 µg
Acide ascorbique	25,9 mg

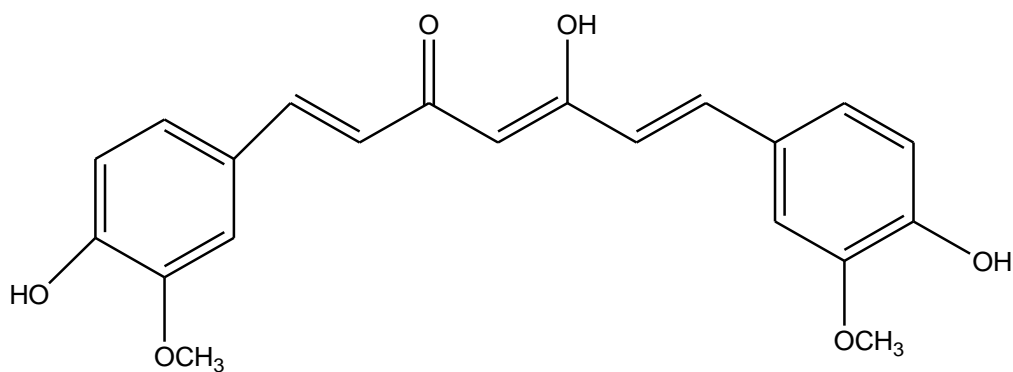
**Tableau I.1. Composants contenus dans 100 g de curcuma**

Par distillation à la vapeur d'eau, les rhizomes produisent 2 à 7% d'huile essentielle, qui est rouge orangé et légèrement fluorescente. Ses constituants principaux sont un sesquiterpène, lezingibérène (25%) et ses dérivés cétoniques : la turmérone (35%) et l'ar-turméronedéhydro-turmérone) (12%). (Fig.I.2). L'huile essentielle de *curcuma* se compose également en petites quantités de monoterpènes oxygénés, associés à de petites quantités de sesquiterpènes hydrocarbonés et de monoterpènes hydrocarbonés. La contribution relative de chaque composant à l'arôme et à la flaveur est mal connue. L'arôme de l'huile essentielle distillée à la vapeur est différent de celui de l'épice [10].



**Fig.I.2. Structure chimique des principaux constituants de l'huile essentielle de *curcuma***

L'extraction du rhizome à l'alcool éthylique, à l'acétone ou au chlorure de méthylène donne 6 à 10% d'oléorésine, qui contient 35 à 45% de *curcumine* (Fig.I.3) et de ses dérivés, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine, connues sous le nom collectif de curcuminoïdes. Ces composés donnent au *curcuma* sa couleur jaune orangé, alors que l'huile essentielle lui confère son arôme et sa saveur typiques [10].



**Fig.I.3. Structure chimique de *curcumine* 1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) -1,6-heptadiène-3,5-dione.**

## I.6. Curcumine

La *curcumine* a été isolée pour la première fois en 1815 par Vogel et Pelletier, obtenue pure sous forme cristalline en 1870 par Daube, et finalement identifiée son structure chimique

1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) -1,6-heptadiène-3,5-dione ou diferuloylmethane) par Roughley et Whiting. Elle a été synthétisée en 1918 par Milobedzka et Lampe [8].

**I.6.1. Propriétés de *curcumine*****I.6.1. a. Solubilité de la *curcumine***

La *curcumine* est une poudre jaune-orange presque insoluble dans l'eau (0,6 µg/mL) et l'éther, mais soluble dans l'éthanol, le méthanol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'acide acétique glacial (index Merck). La *curcumine* est jaune-orange pour un pH compris entre 2,5 et 7, et rouge à pH supérieur à 7.8 [11].

**I.6.1. b. stabilité de *curcumine***

La stabilité de la *curcumine* dans les milieux aqueux s'améliore à pH élevé (> 11,7). La *curcumine* est stable dans un milieu acide mais pas neutre et basique, dans une condition physiologique elle se dégrade en acide férulique et en feruloylméthane. La plupart de la *curcumine* (> 90%) se dégrade rapidement pendant 30 min de placement dans des systèmes tampons au phosphate de Ph=7,2. La *curcumine* est plus stable dans la culture cellulaire moyenne contenant 10% de sérum de veau et dans le sang humain, <20% la *curcumine* se dégrade en 1 h et environ 50% à 8 h. trans-6- (40 Hydroxy-30-méthoxyphényl) -2,4-dioxyhexénal est un produit de dégradation majeur ; vanilline, l'acide férulique et feruloylméthane sont des produits de dégradation mineurs. La quantité de vanilline augmente avec le temps d'incubation. De plus, la *curcumine* semble être stabilisée en formant des complexes avec la cyclodextrine [11].

**I.6.1. c. Absorption**

Les études réalisées sur la *curcumine* ont montré que son administration orale aboutit à des concentrations sériques extrêmement réduites. En effet, la biodisponibilité de la *curcumine* par voie orale est faible : elle est peu absorbée par le tractus digestif et une grande partie de la dose administrée (environ 40 à 75 %) est excrétée dans les fèces, 35 % environ sous forme inchangée, 65 % sous forme de métabolites, majoritairement inactifs.

De façon à comparer les concentrations sériques maximales obtenues, la *curcumine* a été administrée par voie orale à la dose de 2 g/kg chez le rat et de 2 g chez l'homme. Chez le rat, le pic est de  $1,35 \pm 0,23$  µg/ml et est atteint rapidement (50 min). Chez l'homme, la concentration sérique reste quasiment indétectable ou extrêmement faible ( $0,006 \pm 0,005$  µg/ml à 1 h). Les niveaux sériques obtenus chez l'homme et le rat ne sont pas directement

comparables, mais dans les deux cas, l'administration de curcumine par voie orale ne permet pas d'obtenir des concentrations circulantes suffisantes pour une activité systémique[12].

### **I.6.2. Activité biologique de curcumine**

#### **I.6.2.a. Activité antioxydante**

Unnikrishnan et coll, et Rao et coll (Sharma, 1976 ; Ruby et coll., 1995 ; Sugiyama et coll., 1996) ont étudié les propriétés antioxydantes de la *curcumine* et de ses trois dérivés (déméthoxycurcumine, bisdéméthoxycurcumine et d'acétylcurcumine). Les auteurs ont démontré que ces substances fournissent une protection de l'hémoglobine contre l'oxydation à une concentration aussi faible que 0,08 mM, à l'exception du diacétylcurcumine, qui a peu d'effet sur l'inhibition de l'oxydation induite par les nitrites de l'hémoglobine. L'effet de la curcumine sur le LPO a également été étudié dans divers modèles par plusieurs auteurs. Curcumine est un bon antioxydant et inhibe le LPO dans les microsomes du foie de rat, les membranes érythrocytaires et le cerveau homogénat. L'activité antioxydante de la *curcumine* pourrait être médiée par des enzymes antioxydantes telles que superoxydedismutase, catalase et glutathion peroxydase. Il a été démontré que la *curcumine* sert réagissant avec le glutathion et la thiorédoxine. La réaction de la *curcumine* avec ces agents réduit le GSH intracellulaire dans les cellules. La suppression de LPO par la *curcumine* pourrait conduire à la suppression de l'inflammation. En fait, la *curcumine* s'est avérée être au moins dix fois plus active comme antioxydant que même la vitamine E [13].

#### **I.6.2.b. Activité anti-inflammatoire**

Pris oralement, le *curcuma* démontre des activités anti-inflammatoires directes :

- ✓ inhibition de la formation de leucotriènes,
- ✓ inhibition de l'agrégation plaquettaire,
- ✓ Promotion de fibrinolyse,
- ✓ Inhibition de la réponse neutrophile à divers stimuli durant le processus inflammatoire.
- ✓ inhibition de lipoxygénase et de cyclooxygénase, et stabilisation de la membrane lysosome.

Dans de nombreux expérimentaux, la fraction huileuse volatile (huile essentielle) de *Curcuma longa* montre une activité anti-inflammatoire son effet dans ces études est comparable à la cortisone et à la Phénylbutazone, la *curcumine* se révèle être très efficace en cas d'inflammation aigue, avec une activité aussi importante que la phénylbutazone, alors

que sur les inflammations chronique son activité n'est que de 50 %. Cependant, elle a l'avantage de ne pas présenter de toxicité. Mukhopadhyay publie en 1982 une étude expérimentale sur les rats, par ordre d'efficacité : Sodium *curcumine*>Tetrahydrocurcumin>*curcumine*> cortisone > phénylbutazone >triethylcurcumine [14].

Le curcuminate de sodium est obtenu en mélangeant du *curcuma* et du citron. Ce mélange est un remède traditionnel pour les douleurs articulaires et les douleurs musculaires. Ammon a montré que l'activité anti-inflammatoire peut être imputable à l'inhibition de la 5-lipooxygénase des neutrophiles (péritoine de rat) et de la 12-lipoxygénase et de l'activité cyclooxygénase des plaquettes humaines. Depuis, de nombreuses études biochimiques ont expliqué cet effet anti-inflammatoire par l'inhibition de multiples facteurs impliqués dans l'inflammation (phospholipase lipoxygénase, cyclooxygénase 2, leucotriènes, thromboxane, prostaglandines, oxyde nitrique, collagénase, élastase, hyaluronidase, monocyte chemoattractant protein-1, interferoninducible protéine, facteur de nécrose tumoral, interleukine-12), comme l'a montré Chainani Wu dans une étude bibliographies extensive de 1966 à 2002 [14].

### **I.6.2.c. Activité anticancéreuse**

Plusieurs études indiquent que la *curcumine* est un puissant agent anticancéreux. (La tumorigènes de la peau, glande mammaire, cavité buccale, estomac, œsophage, intestin, côlon, poumon et le foie se sont avérés être supprimés par la *curcumine*[13]. L'effet protecteur de la *curcumine* contre les dommages radicalaires sur les lipides de l'ADN peut servir de mécanisme significatif pour aider à réduire le risque de cancer chez certains individus. Des chercheurs ont suggéré que la *curcumine* inhibe la croissance des cellules tumorales par des moyens provoquant l'apoptose (mort cellulaire) et que les gènes associés à la Prolifération cellulaire et à l'apoptose pourraient avoir une action chémopréventive. D'autres travaux émettent l'hypothèse que la capacité de la *curcumine* à neutraliser les radicaux libres et à inhiber l'oxyde nitrique (impliqué à la fois dans l'inflammation et dans le cancer) pourrait expliquer ses activités. La *curcumine* a une forte capacité d'inhiber in vitro la prolifération de cellules cancéreuses de prostate en interférant avec l'activité des protéines de signalisation, caractéristique des processus de croissance. La *curcumine* est un composant sur pour la prévention du cancer et sa thérapie. In vitro, elle induit l'apoptose mais le mécanisme d'initiation reste encore peu connu [15].



**I.6.2.d. Activité antifongique**

Substances et extraits isolés de différentes substances naturelles, en particulier les plantes, ont toujours été un arsenal riche contre les infections fongiques et la détérioration. Dû à l'utilisation traditionnelle extensive du *curcuma* dans les produits alimentaires, diverses recherches ont été effectuées afin d'étudier la *curcuma* et *curcumine* dans le but de contrôler la détérioration fongique et pathogènes fongiques. L'étude de l'addition de la poudre de *curcuma* dans la culture de tissus végétaux a montré que le *curcuma* à 0,8 et 1,0 g / L a une activité inhibitrice appréciable sur les contaminations fongiques. L'extrait de méthanol de *curcuma* a démontré une activité antifongique contre *Cryptococcose neoformans* et *Candidaalbicans* avec MIC des valeurs de 128 et 256 µg / ml, respectivement. L'étude d'extrait d'hexane de *C. longa* à 1000 mg / L démontré un effet antifongique contre *Rhizoctoniasolani*, *Phytophthora infestans* et *Erysiphegraminis*. Il a également été démontré que 1000 mg / L. d'extrait d'acétate d'éthyle de *Curcuma longa* présentaient un effet inhibiteur contre *R. solani*, *P. infestans*, *Puccinia recondita*, et *Botrytis cinerea*. La *curcumine* à 500 mg / L a également montré une activité antifongique contre *R. solani*, *Pu. recondita* et *P. infestans*. La *curcumine* et l'huile de *curcuma* exercent un effet antifongique contre deux champignons phytophages, à savoir, *Fusariumsolani* et *Helminthosporium oryzae*. L'huile de *curcuma* a montré l'activité antifongique la plus efficace contre *F. solaniet H. oryzae* avec une CI<sub>50</sub> de 19,73 et 12,7 µg / ml, respectivement [16].

**I.6.2.e. Activité antibactérienne**

L'étude antibactérienne sur l'extrait aqueux de rhizome de *curcuma longa* a démontré la valeur de CMI est de 4 à 16 g/L et la valeur de CBM est de 16 à 32 g/L contre *S. epidermis* ATCC 12228, *Staph. Aureus* ATCC 25923, *Klebsiellapneumoniae* ATCC 10031 et *E.coli* ATCC 25922. L'extrait de méthanol de *curcuma* a révélé des valeurs de CMI de 16 µg / ml et 128 µg / mL contre *Bacillus subtilis* et *Staph. Aureus*, respectivement. L'étude de l'hexane et de l'extrait de méthanol de *curcuma* et des curcuminoïdes (à partir d'extrait d'acétate d'éthyle de curcuminoïdes isolé de *Curcuma longa* avec 86,5% de curcumine) contre 24 pathogènesles bactéries isolées du poulet et des crevettes ont montré l'activité antimicrobienne la plus élevée pour l'extrait d'éthanol avec la valeur CMI de 3,91 à 125 ppt. L'hexane et le méthanol des extraits de *Curcuma longa* ont démontré un effet antibactérien contre 13 bactéries, comme *Vibrioharveyi*, *V. cholerae*, *Streptococcus agalactiae*, etc ...L'huile de *curcuma* comme sous-

produit de la fabrication de la *curcumine* s'est également efficace contre *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *Staph.aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* [16].

#### **I.6.2.f. Activité antithrombotique : inhibition de l'agrégation plaquettaire**

L'inhibition de l'agrégation plaquettaire du *curcuma* et de la *curcumine* semble par l'inhibition des thromboxanes (promoteur de l'agrégation plaquettaire) et l'activation des prostacyclines (inhibiteur de l'agrégation) Shah en 2000 précise que l'activité antiplaquettaire passe par une inhibition du FAP ainsi que la production de thromboxane A2 par les plaquettes. Lee en 2006 trouve qu'aromatique-turmérone (ar-turmérone) est plus puissant que l'aspirine pour l'activité antiplaquettaire [14].

#### **I.6.3. Baisse du niveau de cholestérol**

La *curcumine* a démontré in vivo sa capacité de diminuer les taux de cholestérol total et de LDL cholestérol ainsi qu'il augmente le taux de HDL cholestérol dans le sérum chez l'homme, une étude indienne a montré que chez 10 volontaires prenant 500 mg de *curcumine* par jour, les niveaux de HDL ont augmenté de 29 % en sept jours. Dans le même temps, le cholestérol total diminuait de 11,6 % et la peroxydation lipidique était réduite de 33 % [15].

### **I.7.Méthodes d'extraction**

L'utilisation de plantes, dans divers domaines tels que l'industrie pharmaceutique, la pharmacie et l'alimentation nécessite des méthodes efficaces pour extraire la substance active ; Il existe différents procédés d'extraction, mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement de la nature de la molécule à extraire.

L'extraction et la séparation de la *curcumine* de la poudre de *Curcuma* aient été rapportées il y a bien longtemps en 1815, des méthodes d'extraction améliorées et plus perfectionnées sont toujours rapportées, même après deux siècles et les méthodes d'extraction Soxhlet, d'extraction par ultrasons, par micro-ondes [17]. d'affinage par zones et par immersion ont été essayées. Parmi celles-ci, les extractions par Soxhlet, par ultrasons et par micro-ondes sont les méthodes les plus couramment utilisées. Cette extraction fait par des différents solvants hexane, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le méthanol, etc. Dans les solvants utilisés, l'éthanol s'est avéré être le solvant le plus préféré pour extraire la *curcumine*. Bien que les solvants chlorés extraient très efficacement la *curcumine* du *Curcuma*[17].

#### **I.7.1. Hydrodistillation**

Le système équipé qui est utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, la durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait [18].

### **I.7.2. Entraînement à la vapeur d'eau**

La matière végétale, préalablement pesée, est répartie uniformément à l'intérieur de l'alambic, supportée par une grille. La vapeur d'eau, venant de la chaudière, est introduite dans l'alambic à travers une conduite placée au-dessous de la grille. Le flux ascendant de vapeur traverse le lit de matière végétale et entraîne avec lui l'huile essentielle. Le mélange des vapeurs d'eau et d'huile arrive dans le condenseur où il est refroidi et condensé. Le distillat est recueilli dans le receveur et sa température est maintenue à une valeur fixe à l'aide du bain thermostaté. L'huile essentielle est séparée de l'eau de ce distillat par décantation. Les eaux de condensation accumulées au fond de l'alambic sont périodiquement évacuées, afin d'éviter tout contact avec la matière végétale [19].

### **I.7.3. L'expression à froid**

L'expression à froid est une technique simple réservée à l'extraction des composés volatils de la famille des hespéridés. Il s'agit d'un traitement mécanique abrasif, à température ambiante exercé sous un courant d'eau, sur toute la surface du produit à extraire.

Par exemple dans le cas des fruits si l'on veut l'extraire, les « zestes » sont dilacérés et le contenu, des poches oléifères qui ont été rompues, est récupéré par un procédé physique. Après élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation. Cette technique permet d'extraire à faible coût des essences de bonne qualité. La plupart des installations industrielles permettent en fait la récupération simultanée ou séquentielle des jus de fruits et de l'huile essentielle. L'extraction par expression à froid peut être réalisée soit à partir des zestes, soit à partir du fruit entier [20].

#### I.7.4. Extraction solide - liquide

L'extraction solide-liquide est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer, de dissoudre soit par immersion soit par arrosage d'un liquide, un ou plusieurs composants (liquide ou solide) mélangés à un solide. C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, qui contient la matière à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction [21].

##### ❖ Macération

C'est une opération traditionnelle, son principe facile à mettre en œuvre. Il consiste à mélanger des extraits végétaux dans un corps gras qui, jouant le rôle de solvant naturel à température ambiante [22].

#### I.7.5. Extraction assisté par micro-onde

C'est une technique récente développée. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle: les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée [23]. (Fig.I.4). Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile. Les auteurs de ce procédé lui attribuent certains avantages tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite [24].

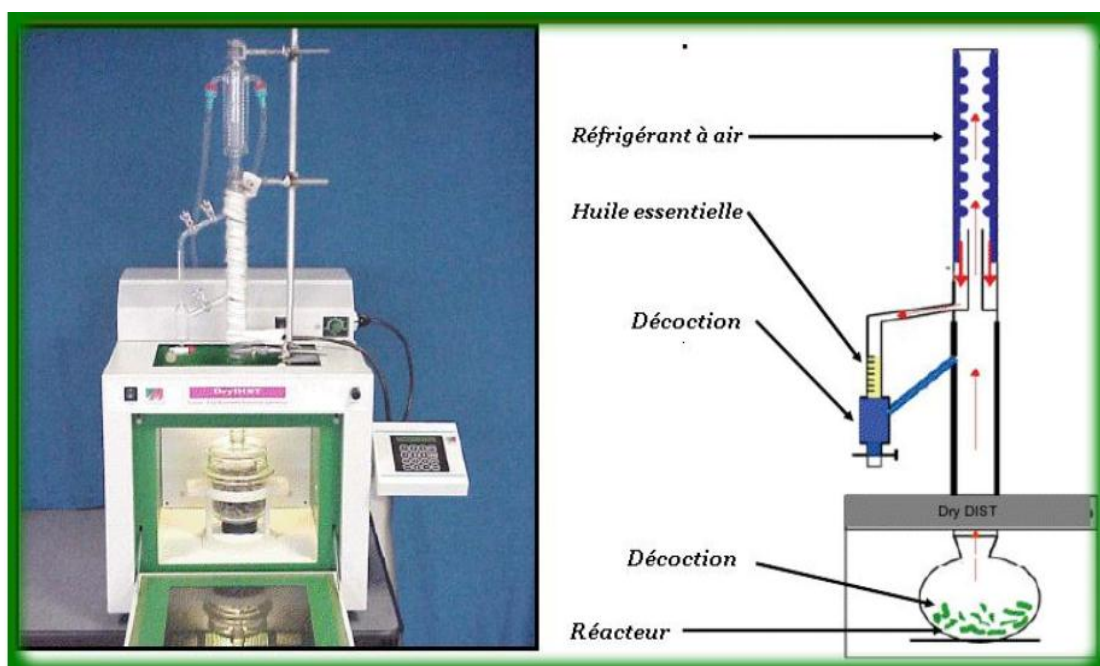


Fig.I.4. Hydrodistillation assistée par micro-ondes [25].

**I.7.6.Extraction par le CO<sub>2</sub>**

Le principe de cette technique repose sur le solvant utilisé : il s'agit du CO<sub>2</sub> en phase supercritique. L'extraction consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique (P=72.8 bars et T= 31.1°C).A l'état supercritique, le CO<sub>2</sub> n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques comme le CO<sub>2</sub> sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux [26].

**I.8.Conclusion**

Dans ce chapitre nous avons fait une étude bibliographique sur une plante médicinale qui est le curcuma, nous avons parlé sur description et sur leur composition chimique. Le plus important dans cette partie est l'étude faites sur le principe actif du curcuma qui est la curcumine et leur propriétés physicochimique (solubilité, stabilité et absorption) et leur propriétés pharmacologique (activité antioxydant, activité anti-inflammatoire, antibactérienne...etc.), ensuite nous avant étudié les différents procédés d'extraction des plantes médicinales.

# CHAPITRE

## II

Activité antioxydante

&

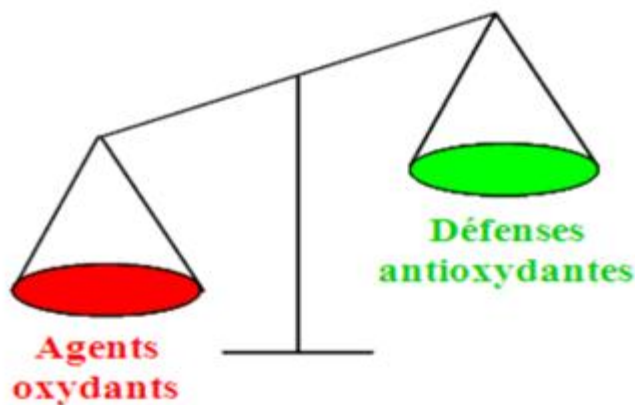
Activité antibactérienne

## II.1. Introduction

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition. Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont: l'oxygène singulet  $O$ , le radical superoxyde  $O_2$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , les peroxydes alkyles  $ROOH$ , les radicaux hydroxyles  $HO$ , peroxydes  $ROO$  et alkoxydes  $RO$ . Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines [1].

## II.2. Stress oxydatif

Le terme « stress oxydatif » fait référence à un grave déséquilibre entre la production de RS (reactive species) ou les espèces réactives et les défenses antioxydantes [27]. Sies en 1991 défini le stress oxydant comme une perturbation dans le statut antioxydant/pro-oxydant. En d'autres termes, le stress oxydant se caractérise par un déséquilibre entre la production des espèces réactives (RS) et les capacités antioxydantes de l'organisme. Bien que le stress oxydant excessif peut entraîner des dommages oxydatifs, il est en soi pas nécessairement dommageable et peut être transitoire et réversible [2]



**Fig.II.1. Déséquilibre entre les molécules pro-oxydant et le système de défense antioxydant lors du stress oxydant [28].**

## II.3. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une

orbitale). Cela, lui conféré une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Système redox). La réactivité chimique des radicaux libres de l'oxygène est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants [29].

Parmi les différentes classes de radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont les radicaux les plus abondants. Cette classe de radicaux libres regroupe des radicaux qui dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron (Fig II.2), comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le radical peroxy ( $RO_2^{\cdot}$ ), le radical alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ) et le radical perhydroxyle ( $HO-O^{\cdot}$ ). Le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) et le dioxyde d'azote ( $NO_2^{\cdot}$ ) appartiennent à une autre classe de radicaux libres, les espèces réactives de l'azote (RNS). Les ROS et RNS peuvent être converties en espèces réactives qui ne sont pas des radicaux libres telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypobromeux ( $HBrO$ ) et le nitroperoxyde ( $HNO_3$ ). Il est à noter que ces molécules sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres dérivés de l'oxygène et leurs précurseurs sont appelés ROS. Parmi ces ROS, l'anion superoxyde et  $OH^{\cdot}$  sont considérés les plus réactifs [30, 36].

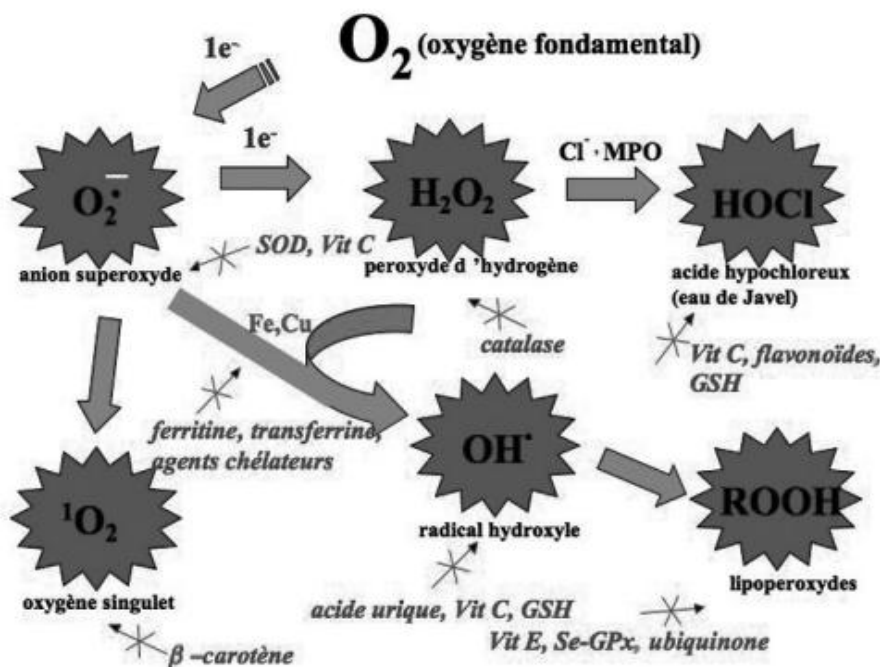


Fig.II.2. Les différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production [31].



**II.4. Antioxydants**

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défenses inégalement puissantes pour détoxifier la cellule [32].

**II.4.1. Sources des antioxydants**

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydants. On distingue deux sources d'antioxydants.

**II.4.1.a. Antioxydants exogènes**

L'une est exogène (défense non enzymatiques) apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes (Fig II.3) :

**✓ Vitamine C**

Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E.

**✓ Vitamine E**

Joue un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxydes ( $\text{ROO}^\bullet$ ) et empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique.

**✓  $\beta$ -carotène**

Possède la capacité de capter l'oxygène singulet.

**✓ Acide urique**

Un piègeur puissant de radicaux ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{NOO}^\bullet$ ...).

**✓ Polyphénols**

Constituent une famille importante d'antioxydants, anti-inflammatoires, anti-allergiques, antimicrobiens et antiviraux.

**✓ Bilirubine**

Capable de piéger  $\text{ROO}^\bullet$  et l'oxygène singulet.

**II.4.1.b. Antioxydants endogènes**

L'autre est endogène (défense enzymatiques) et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, cérulé

plasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Fig.II.3) [31].

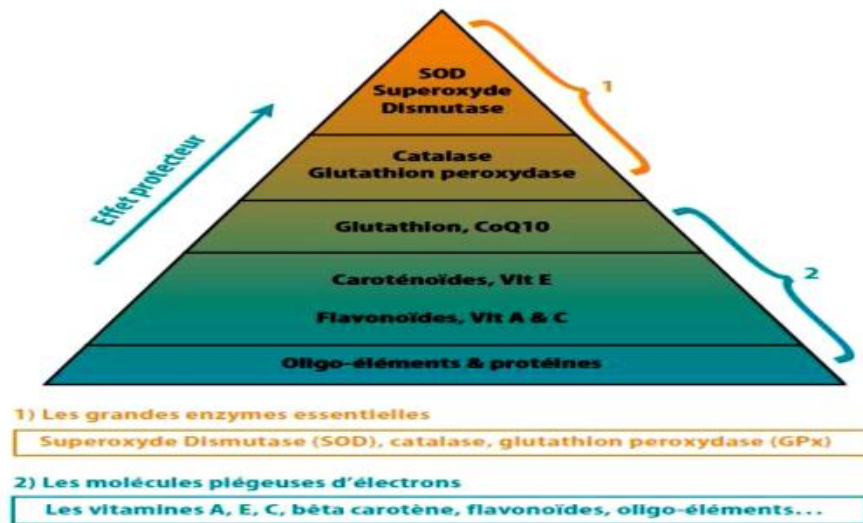
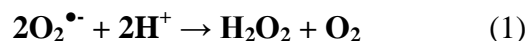


Fig.II.3. Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques [33].

#### II.4.2. Mécanismes d'action des antioxydants

Le stress oxydatif induit par ROS est rigoureusement contrôlé par plusieurs lignes défensives qui comprennent des piègeurs enzymatiques et non enzymatiques et des extincteurs. Ces défenses arrêtent soit la libre réaction radicalaire en chaîne ou détourner le radical libre vers une cible moins délétère. Les enzymes impliquées dans la défense enzymatique contre le stress oxydatif sont trois groupes de protéines de liaison aux métaux :

1/ Premier groupe comprend les superoxydes dismutases (SOD), qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène (équation (1)).



**SOD**

2/ Deuxième groupe rassemble les catalases (CAT) qui sont des enzymes contenant du Fe qui éliminent  $\text{H}_2\text{O}_2$  (équation(2)) et ils sont trouvés dans les peroxysomes de la plupart des tissus. Ils servent probablement pour éliminer le peroxyde généré par la peroxysomal oxydase enzymes.

**CAT**



3/ Troisième groupe comprend les peroxydases de glutathion (GSH-Px), qui sont les principales enzymes qui éliminent le peroxyde d'hydrogène généré par la SOD dans le cytosol et mitochondries en oxydant le tripeptide glutathion (GSH).



Dans la défense non enzymatique, les mécanismes par lesquels ces antioxydants agissent au niveau moléculaire et cellulaire incluent les rôles dans l'expression et la régulation du gène, l'apoptose et la signalisation [34].

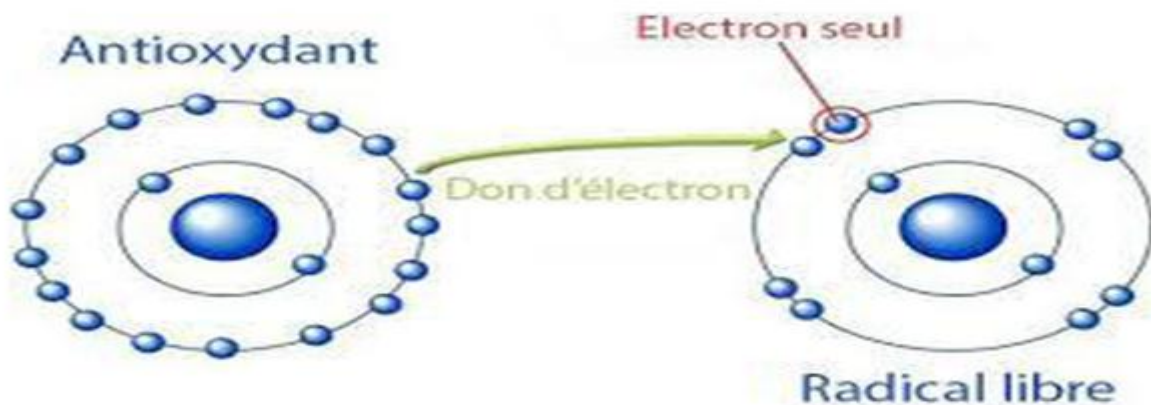


Fig .II.4.Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant [35].

Finalement ; au niveau cellulaire, l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GP<sub>s</sub> doit être complémentaire car une protection efficace contre les ROS ne peut être obtenue seulement par l'activité des SOD (Fig.II.5) [36].

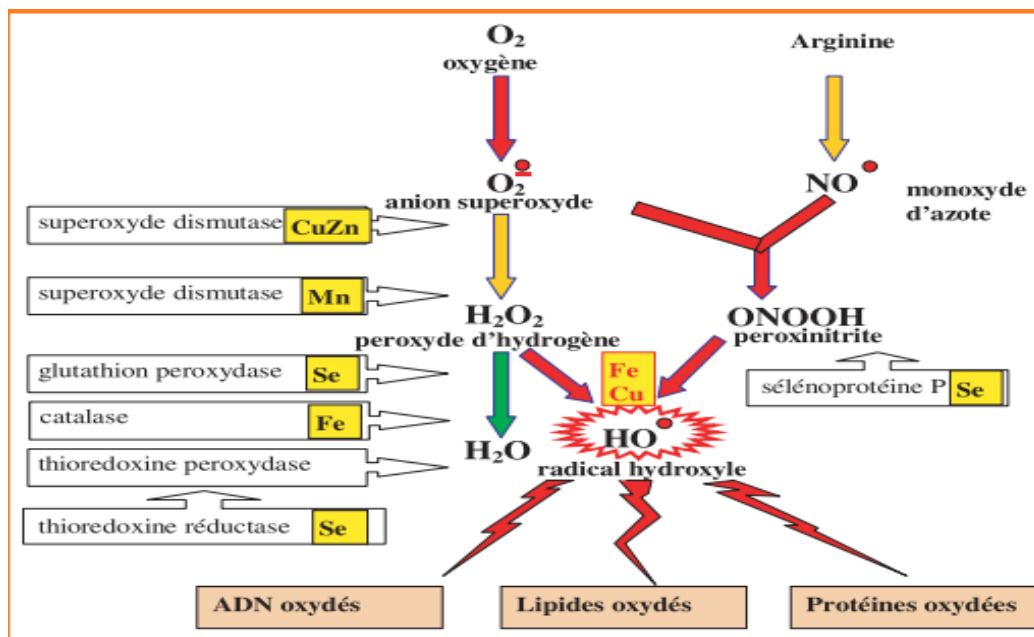


Fig.II.5.Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leur cofacteurs métalliques [36].

**II.4.3. Maladies liées au stress oxydant**

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux.

Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré. Il est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires [36].

**II.5. Activité antibactérienne****II.5.1. Définition des bactéries**

Les bactéries sont des cellules procaryotes, leur ADN n'étant pas localisé dans un noyau. Beaucoup contiennent des structures circulaires d'ADN extra-chromosomique appelées plasmides. Il n'y a pas d'autre organelle dans le cytoplasme que les ribosomes, qui sont de plus petite taille que ceux des cellules eucaryotes. Les bactéries sont entourées par une paroi complexe, différente selon que la bactérie est à Gram positif ou négatif [37].

**II.5.2. Principales substances antimicrobiennes****II.5.2.1. Antibiotiques**

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques [32].

**II.5.2.2. Composés phénoliques**

Plusieurs études in vitro et in vivo ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavonoïques ; doués d'un

effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) [38].

### **II.5.2.3. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens**

#### **II.5.2.3.1. *Escherichia coli***

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm, *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires.

#### **II.5.2.3.2. *Staphylococcus aureus***

Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire.

#### **II.5.2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa***

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine : jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques. *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales [32].

# **Chapitre**

## **III**

### ***Molécule- Cage***

### III.1. Généralité sur les Cyclodextrines

Les cyclodextrines ont été obtenus par Villiers en 1891 [39], à partir de produits de dégradation partielle de l'amidon. Ces produits nommés aussi dextrines de schardinger, cycloamylose, cyclomaltooligosaccharides ou cycloooligoglucanes. Ce n'est qu'à partir de 1903 que Schardinger décrit leur préparation, leur isolement et leurs principales caractéristiques [40]. De par leur capacité à former des complexes avec de nombreuses molécules, les cyclodextrines ont aujourd'hui d'innombrables applications industrielles et font l'objet de multiples recherches scientifiques, au vue des nombreuses publications et brevets qui leurs sont consacrés.

### III.2-Production

L'amidon est mis en solution aqueuse à haute température et partiellement hydrolysé pour réduire la viscosité, ensuite L'enzyme cyclodextrine glucosyl transférase (CGTase) est ajoutée au mélange (Fig.III.1), cette enzyme est produite par un grand nombre de micro-organisme comme *bacillus macerans*, *kelbsiella oxytoca*, *bacillus circulans*...etc [41]. Au cours de la réaction, la structure hélicoïdale de l'amylose est détruite au profit d'une structure cyclique. Les spires que forme naturellement cette macromolécule en solution aqueuse sont reliées par transfert de liaisons pour donner des oligosaccharides cycliques [42].

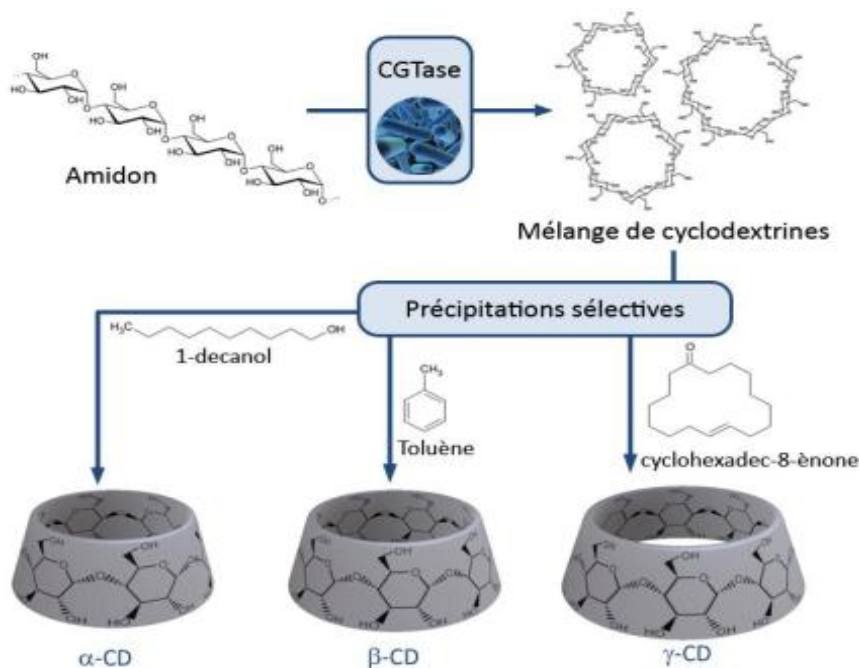


Fig.III.1.Voie de production industrielle des trois cyclodextrines.

Les principales CDs obtenues sont l' $\alpha$ -CD, la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD, constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités du glucose. Pour favoriser la formation d'une CD donnée, en ajoutant au milieu réactionnelle un solvant formant avec elle un complexe insoluble. Ainsi, l'ajout de toluène entraîne la formation de la  $\beta$ -CD (toluène qui est immédiatement éliminé par filtration), ce qui permet d'orienter la réaction en faveur de la  $\beta$ -CD, si le 1-décanol est ajouté, principalement l' $\alpha$ -CD sera produite, alors que dans le cas de cyclohexadécénol le produit principal est la  $\gamma$ -CD [41].

Après séparation des complexes par filtration, les solvants utilisés pour la formation de ces complexes sont éliminés par distillation ou extraction. Suivent alors plusieurs étapes de purification (traitement sur charbon actif, filtration, cristallisation) au terme desquelles les CDs sont obtenus avec une pureté généralement supérieure à 99% [41].

### III.3-Structure

Les CDs ont une forme d'un cône tronqué, à l'extérieur du quel se trouvent les groupements hydroxyles donc la partie extérieure est hautement hydrophile [42].

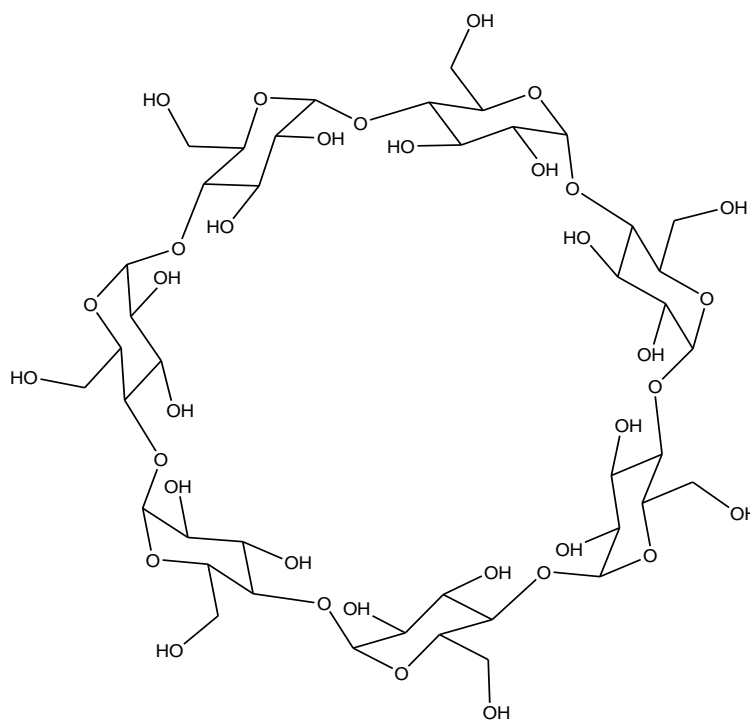


Fig.III.2. Structure de  $\beta$ -CD



Les hydroxyles secondaire sont portés par les carbones C<sub>2</sub>,C<sub>3</sub> se situent sur le côté le plus large d'un cône (face secondaire) tandis que les hydroxyles primaires en carbone C<sub>6</sub> se situent sur le côté le plus étroite (face primaire). La libre rotation des hydroxyles primaires diminue le diamètre effectif de la cavité du coté ou ils se trouvent alors que les hydroxyles secondaires sont on position plus figée. L'intérieur de la cavité contenant des atomes des hydrogènes portés par des carbones C<sub>3</sub> et C<sub>5</sub>, ainsi que par les atomes d'oxygènes participant à la liaison glycosidique ce qui lui confère un caractère apolaire hydrophobe [42]

#### III.4-Les caractéristiques physico-chimiques

Les trois principales CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Leurs principales caractéristiques physicochimiques sont rassemblées dans le tableau III.1.

Caractéristiques physicochimiques	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Nombre d'unités glucopyranose	6	7	8
Formule brute	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub>
Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre externe (nm)	1,46 ±0,04	1,54 ±0,04	1,75 ±0,04
Hauteur (nm)	0,79± 0,01	0,79 ±0,01	0,79± 0,01
Diamètre de la cavité (nm)	0,47 – 0,53	0,60 – 0,65	0,75 – 0,83
Volume de la cavité (nm <sup>3</sup> )	0,174	0,262	0,472
Solubilité dans l'eau (g/L à 25°C)	145	18,5	232
pKa à 25°C	12,3	12,2	12,1
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> à 25°C	150± 0,5	162,5± 0,5	177,4 ±0,5

Tableau. III.1: Caractéristiques physicochimiques des principales CDs natives[41]

La hauteur de ces trois molécules est la même mais les autres dimensions varient avec le nombre d'unités glucopyranose. Ainsi, le diamètre externe et le volume de la cavité augmentent de l' $\alpha$ -CD à la  $\beta$ -CD. De par la taille de sa cavité, la  $\beta$ -CD est celle qui complexe le plus grand nombre de composés et elle et ses dérivés sont les plus utilisées de toutes les CDs [43].

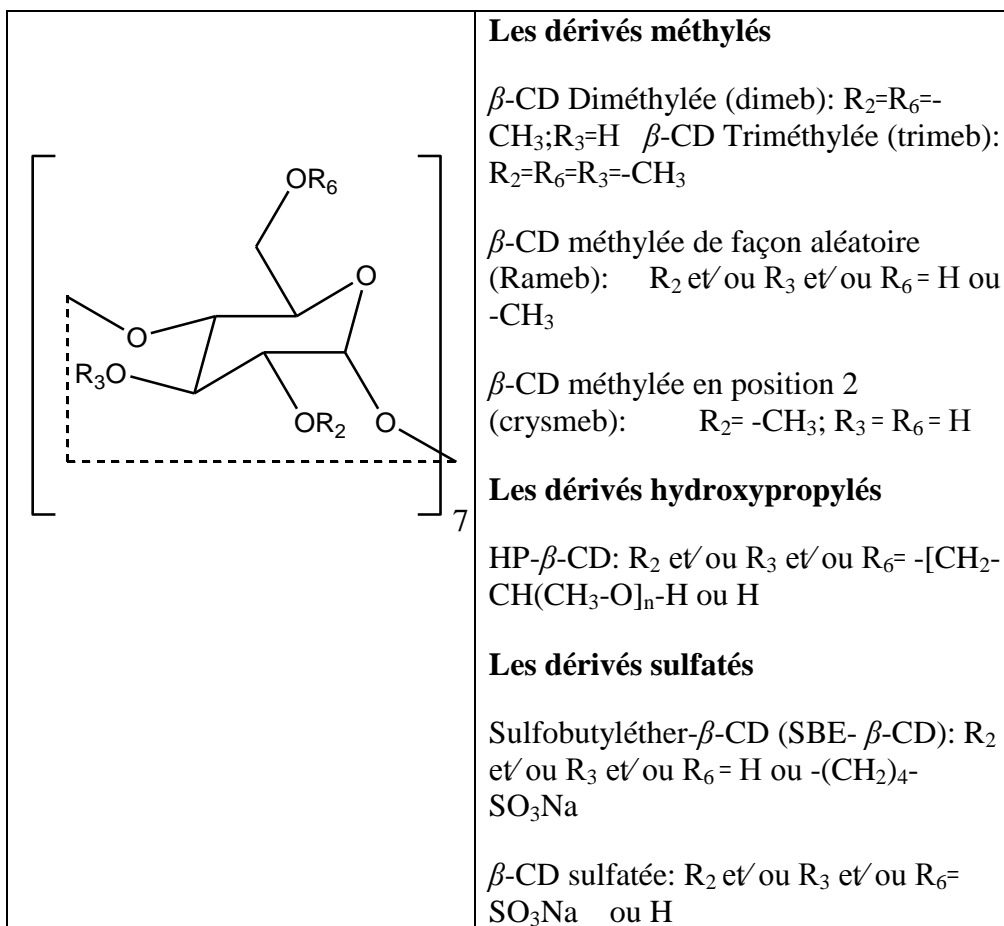
Notons la faible solubilité dans l'eau de la  $\beta$ -cyclodextrine en comparaison des deux autres. Ceci s'explique par la rigidité de la structure due à la présence d'une ceinture complète de sept liaisons hydrogènes au niveau de la couronne secondaire. Ces liaisons hydrogènes mettent en jeu un groupe hydroxyle d'une unité glucose (OH-2) avec un autre groupe hydroxyle (OH-3) de l'unité adjacente. Dans le cas de l' $\alpha$ -cyclodextrine cette ceinture de liaison hydrogène est incomplète car une unité glucose se trouve en position distordue par rapport aux autres unités glucoses. Moins rigide que la  $\beta$ -cyclodextrine, l' $\alpha$ -cyclodextrine possède ainsi une plus grande solubilité dans l'eau. De la même façon, la très grande solubilité de la  $\gamma$ -cyclodextrine est due à sa très grande flexibilité [44].

### **III.5-Dérivés des cyclodextrines**

De nombreux dérivés de cyclodextrines sont décrits dans la littérature [45]. Dans le but d'améliorer ou de changer certaines propriétés de CDs, et par conséquent, d'étendre leurs champs d'application, la synthèse des dérivés de CD a été entreprise. La modification chimique des cyclodextrines permet d'obtenir des dérivés possédant des propriétés physico-chimiques différentes de celles des CDs natives et d'élargir ainsi leurs champs d'application. Ces modifications chimiques portent sur [46]:

- La substitution d'un ou de plusieurs groupements hydroxyles par des halogènes, ou des groupements amines.
- L'oxydation des alcools primaires pour former des aldéhydes ou des acides carboxyliques.
- La substitution nucléophile interne avec formation d'époxyde, ...

Les dérivés cyclodextrines les plus utilisés sont de type hydroxypropyle (HP), sulfobutyle(SBE) et méthyle (ME). Les dérivés de CD sont caractérisés par le degré de substitution molaire moyen (MS) qui est le nombre moyen de substitution par unité d' $\alpha$ -D-glucopyranose (le MS varie de 0 à 3) (Szente et Szejtli, 1999)(Tableau III. 2). La fig.III.3 montre la structure générale de dérivés de la  $\beta$ -CD.



**Fig.III.3. Structure générale de dérivés de la  $\beta$ -CD [47].**

Les objectifs principaux de ces modifications sont [42]:

- Augmenter la solubilité aqueuse des CDs ;
- Augmenter leur capacité de complexation ;
- Introduire des groupements spécifiques facilitant la complexation ;
- Améliorer l'adaptation entre la CD et son invité ;
- synthétiser des polymères...etc.

Cyclodextrine	MS	Masse moléculaire	Solubilité aqueuse à 25 (mg/mL)
Dimeb	2	1331	570
Trimeb	3	1429	310
Rameb	1.8	1312	>500
Crysmeb	0.57	1191	220
HP- $\beta$ -CD	0.65	1390	>600
SBE- $\beta$ -CD	0.9	2163	>500

**Tableau.III.2. Caractéristiques des dérivés de cyclodextrines [47] [48]**

### III.5-1- Dérivés hydroxypropyles

Ces dérivés sont obtenus par la réaction de la  $\beta$ -CD avec l'oxyde propylène en milieu alcalin. La HP-  $\beta$ -CD possède une très grande solubilité dans l'eau à cause de son caractère lipophile (>600 mg /ml) [48]. La HP-  $\beta$ -CD présente un large intérêt dans le domaine pharmaceutique en raison de sa solubilité aqueuse élevée et sa faible toxicité [49].

### III.5-2- Dérivés méthylés

Les dérivés méthylés possèdent une grande solubilité dans l'eau (>500). Les formes commerciales les plus intéressants sont la RAMEB ( $\beta$ -CD méthylée, de manière aléatoire sur l'intégralité des hydroxyles primaires ainsi que sur 7 à 9 hydroxyles secondaires) et la CRYSMEB (méthylée en position 2 de la  $\beta$ -CD) (Fig.III.3). Ces dérivés présentent une meilleure solubilité que la CD native et une bonne capacité d'inclusion pour les produits faiblement solubles dans l'eau. Néanmoins, la RAMEB reste plus attractive pour le domaine pharmaceutique car elle présente une capacité de complexation importante [50].

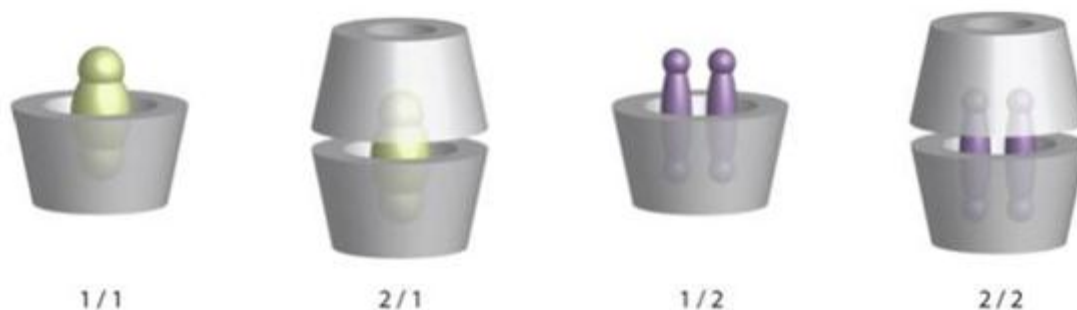
### III.5-3- Dérivés sulfobutylés

Le sulfobutyléther- $\beta$ -CDs (SBE- $\beta$ -CD) est produit à l'échelle industrielle sous le nom de Capistol® ([45] Ce dérivé présente un degré de substitution entre 6 et 7 et porte une charge négative dans les conditions physiologiques. Cela est dû aux groupements d'acide sulfonique qui lui confèrent un pKa très faible. Les chaînes butyles et la répulsion des charges négatives permettent d'allonger la cavité. Par conséquent, cette CD présente une meilleure affinité pour accueillir les invités. La charge négative lui permet aussi de complexer les invités ayant une

charge positive. Comme la HP- $\beta$ -CD, le captisol® est intéressant pour l'utilisation pharmaceutique vu sa faible toxicité et sa solubilité élevée (> 500mg/ml) [50].

### III.6-Complexes d'inclusion

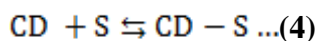
Les cyclodextrines ayant une forme torique. Les liaisons hydrogènes intramoléculaires sont partiellement responsables de la forme torique des cyclodextrines avec un diamètre variable. Cette forme torique, avec une cavité hydrophobe, permet aux CDs de former des complexes d'inclusion avec des composés organiques en solution aqueuse. La cyclodextrine joue le rôle de la molécule hôte et admet le substrat dans sa cavité qu'aucune liaison covalente ne soit impliqué [51]. Dans un solution aqueuse, la cavité de la cyclodextritrine est légèrement apolaire, elle est occupée par des molécules d'eau énergiquement défavorable (interaction polaire-apolaire), et peuvent donc être facilement remplacés par des « molécules invitées » appropriées, qui sont moins polaires que l'eau. La cyclodextrine dissoute est la molécule "hôte", est une partie de la « force motrice » de la formation du complexe et la substitution de la molécule d'eau à haute teneur en enthalpie par une molécule « invitée » appropriée. Une, deux ou trois molécules CDs contiennent une ou plusieurs molécules « invitées » piégées.



**Fig.III.4. Représentation de différents types de complexes « hôte/invité »[42]**

Le plus souvent, le rapport hôte : invité est de 1:1. C'est le cas le plus simple et le plus fréquent. Cependant, des associations 2:1, 1:2, 2:2, ou même plus compliquées, et des équilibres d'ordre supérieur existent, presque toujours simultanément.

Lors de la dissolution de ces complexes, un équilibre s'établit très rapidement entre les espèces dissociées et associées, ce qui s'exprime par la constante de stabilité du complexe (Ks). L'association du CD et des molécules invitées, et la dissociation du complexe CD / invité former est contrôlé par un équilibre thermodynamique de la forme [42] :

**III.7-Conséquence de complexation**

La formation d'un complexe d'inclusion entre une cyclodextrine et une molécule invitée confère à ce complexe des propriétés physico-chimiques et biologiques différentes de celles de la cyclodextrine et de la molécule incluse prise séparément.

Parmi les principales modifications, on peut citer [44]:

- La modification de la solubilité du soluté.
- La modification des propriétés spectrales de l'hôte et de l'invité : déplacement chimique en RMN, longueur d'onde du maximum d'absorption en spectrophotométrie UV, intensité de fluorescence, etc....
- La modification de la réactivité chimique : protection à l'oxydation ou à la réduction, à l'hydrolyse, à la dégradation thermique ou photochimique, etc...
- La diminution de la diffusion et de la volatilité.

L'intérêt majeur de la complexation avec les CDs est d'améliorer la solubilité aqueuse et la biodisponibilité des invités, les protéger contre le milieu extérieur, diminuer leur volatilité et constituer des systèmes de libération prolongée et contrôlée [50].

**III.8-Les techniques de préparation des complexes d'inclusion CD/invité**

Il existe diverses techniques de préparation des complexes inclusions. Pour tous ces procédés et pour chaque molécule invitée, les quantités d'eaux, la vitesse et le temps d'agitation, la température et le temps de chauffage, doivent être optimisés [49].

**III.8-1-L'inclusion par mélange physique ou mélange sec:**

La complexation dans cette méthode est basée sur un mélange homogène des cyclodextrines et du substrat dans un mortier, le temps de mélange nécessaire à la complexation varie selon l'invité. Ce protocole est généralement réalisé à température ambiante. Son principal avantage est de ne pas utiliser d'eau que si un rinçage nécessaire, et ses inconvénients sont le risque de formation des croûtes de poudres, et l'obtention d'un mélange incomplet conduisent à une complexation insuffisante [52].

**III.8-2-L'inclusion par micro-onde :**

Cette méthode permet d'atteindre rapidement la température nécessaire pour la formation de complexe d'inclusion tout en gardant une bonne uniformité des propriétés du complexe. Le temps de réaction ne dépasse généralement pas 90s et une température de 60

°C(à 150 W). Des valeurs plus importantes peuvent être utilisées pour des invités moins labiles (Kfoury, 2015) [50].

#### **III.8-3-L'inclusion par pétrissage (kneading):**

La cyclodextrine est broyée dans un mortier avec une petite quantité d'eau pour obtenir une pâte homogène. La molécule invitée est alors ajoutée. Le temps nécessaire pour la complexation varie selon l'invité. La consistance de la pâte dépend de la quantité d'eau et de la nature de l'invité. Une fois récupéré et séché le complexe doit passer par une étape de broyage supplémentaire [53].

#### **III.8-4-L'inclusion par extrusion :**

L'extrusion est une variante de l'inclusion par pétrissage du fait qu'elle est en mode continu. La CD, l'invité et l'eau sont mélangés au fur et à mesure dans l'extruder. Le degré de mélange, la température et le temps de chauffage sont contrôlés dans la cuve de l'extrudeur. Le complexe peut être séché par chauffage ou simple refroidissement. Du fait de la température générée, certains invités thermolabiles sont dégradés durant ce processus. L'intérêt de cette technique réside dans le fait que c'est un processus continu qui n'utilise qu'une faible quantité d'eau [52].

#### **III.8-5-L'inclusion par co-précipitation:**

Cette méthode est la plus utilisée. Après la dissolution de la cyclodextrine dans l'eau sous agitation, la molécule invitée est ajoutée. Le précipité formé peut être collecté par décantation, centrifugation ou filtration. Le précipité peut être lavé avec un peu d'eau ou tout autre solvant miscible à l'eau tel que l'alcool éthylique, le méthanol ou l'acétone. Le principal inconvénient de cette technique est lié au volume, du fait de la solubilité limitée de la CD, de grandes quantités d'eau sont nécessaires.

La formation du complexe solide ou semi-solide peut être optimisée par l'utilisation d'additifs tels que l'éthanol, et pour les drogues basiques par l'adjonction d'ammonium. Les drogues non ionisées forment des complexes avec les CD plus stables que leurs homologues ionisés. Les drogues non ionisées forment des complexes avec les CD plus stables que leurs homologues ionisés. Selon la quantité d'eau utilisée pour le complexe, on obtient un co-précipité, pâte visqueuse ou une pâte solide [52].

**III.8-6-L'inclusion par Co-évaporation :**

Elle consiste à mélanger la CD et l'invité pendant un certain temps nécessaire pour avoir une complexation en présence d'un autre solvant à la même température. Puis le complexe solide est récupéré par co-évaporation des solvants présents [54].

**III.9-Méthodes et caractérisation des complexes d'inclusion**

Il existe diverses méthodes expérimentales permettant d'une part de confirmer la formation effective des complexes d'inclusion et d'autre part de déterminer leur stœchiométrie et leur stabilité. Ces différentes techniques reposent sur les modifications des propriétés physicochimiques ou optiques de la molécule complexée liées à la modification de sa solubilité ou de son microenvironnement [55]. Les techniques couramment utilisées sont : La chromatographie liquide à haute performance, La spectroscopie infrarouge, La résonance magnétique nucléaire (RMN) [56], la spectroscopie d'absorbance (UV et visible), la méthode de solubilisation [46]. La fluorescence [57]

**III.9-1-Chromatographie Liquide à Haute Performance**

La chromatographie liquide à haute performance est une méthode d'analyse très sensible permettant de doser une quantité infime de molécules chimiques en solution et de déterminer la constante de stabilité ( $K_s$ ) des complexes [56]. Une diminution significative de temps de rétention par l'augmentation de la concentration de  $\beta$ -CD et de  $\alpha$ -CD dans la phase mobile (phosphate tampon) [58], la phase stationnaire étant plus une phase échangeuse d'ions. La mesure des temps de rétention, eux-mêmes directement proportionnels aux rapports de distribution des concentrations entre la phase stationnaire et la phase mobile, permet d'accéder à la valeur de  $K_s$  [56].

**III.9-2-La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

La résonance magnétique nucléaire permet de déterminer les structures de nombreuses molécules biochimiques. Les spectres de RMN sont indispensables pour affirmer l'inclusion d'une molécule dans une CD. Après inclusion, les protons situés à l'intérieur de la cavité de la  $\beta$ -cyclodextrine (H-3, H-5) voient leur environnement électronique modifié du fait de la présence d'une molécule invitée dans la cavité, tandis que les protons localisés à l'extérieur (H-2, H-4 et H-6) de la cavité restent pratiquement inchangés. La molécule invitée présente quant à elle, des modifications de déplacements chimiques au niveau de la plupart de ses protons. On peut considérer, en première approximation, que la molécule cage constitue le solvant de la molécule invitée [59].



**III.9-3-Spectroscopie Infrarouge (IR)**

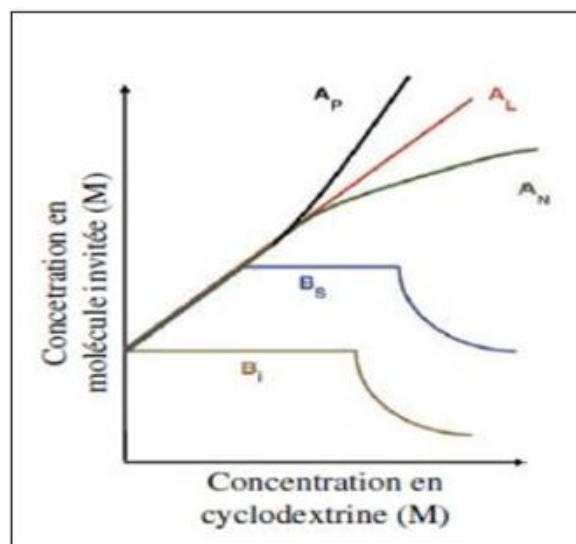
L'infrarouge est une technique qui peut être également utilisée pour caractériser les complexes d'inclusion. La bande OH caractéristique des CD est influencée par la formation du complexe et les bandes de la partie incluse de la molécule invitée sont généralement déplacées ou leur intensité diminuée suite à la modification de l'environnement de l'invité. Les spectres des complexes présente généralement un léger déplacement des pics, ce qui indique qu'il n'y a pas de liaison chimique forte (covalente) entre les composés mais juste une interaction. Chaque bande du spectre caractérise un groupement fonctionnel de la molécule et sont déplacement permet de désigner quelle partie de la molécule invitée a interagit avec la CD [60].

**III.9-4-Spectroscopie UV-visible**

La spectroscopie d'absorption UV/visible est une technique fréquemment utilisée pour la détermination de la constante d'équilibre d'association. La formation d'un complexe produit des modifications du spectre d'absorption de la molécule invitée. Ces modifications se manifestent sous la forme d'un déplacement et/ou d'un élargissement de bande. Ce déplacement peut être attribué au changement d'environnement [61].

**III.10-Diagrammes de solubilité**

Les diagrammes de solubilité ou isothermes de solubilité sont réalisés en plaçant un excès de substance en présence de solutions aqueuses de cyclodextrines de concentrations croissantes, à une température donnée. Après un temps d'agitation nécessaire pour atteindre l'équilibre de la complexation (de plusieurs heures à plusieurs jours), on détermine la quantité de substance solubilisée par une méthode de dosage appropriée. Un diagramme de solubilité est alors réalisé en reportant sur un graphique la concentration molaire du soluté sur l'axe vertical et la concentration molaire en agent complexant sur l'axe horizontal. Higuchi et Connors ont classé les différents types de diagrammes caractérisant les interactions substrat-ligand, auxquelles peuvent être assimilées les interactions cyclodextrine-molécule invitée [62].



**Fig.III.5.Représentation graphique des profils de solubilité de type A et B avec sous types applicables ( $A_P$ ,  $A_L$ ,  $A_N$  and  $B_S$ ,  $B_I$ ) [62].**

Profils de type A ; Dans les systèmes A, la solubilité apparente du substrat augmente en fonction de la concentration de CD. Les profils  $A_L$  indiquent une augmentation linéaire de la solubilité en fonction de la concentration du solubilisant, ils sont attribués à la formation de complexes 1:1. Les systèmes  $A_P$  indiquent une isotherme dans laquelle la courbe s'écarte dans un sens positif de la linéarité (c'est-à-dire le solubilisant est proportionnellement plus efficace à des concentrations plus élevées). Le diagramme  $A_P$  traduit la formation simultanée des complexes de stœchiométries différentes (1:1 à l'origine, puis 1:2 ou 1:3, ...). Les profils  $A_N$  indiquent un écart négatif par rapport à la linéarité (c'est-à-dire que la CD est proportionnellement moins efficace à des concentrations plus élevées).

Les Profils de solubilité de phase B indiquent la formation de complexes avec une solubilité limitée dans l'eau et sont traditionnellement observés avec des CDs naturels, en particulier  $\beta$ -CD. Il ya deux sous- classes :

- Le profil  $B_S$ : suit au départ le profil  $A_L$  puis à partir d'un point particulier, tout ajout de cyclodextrine entraîne une précipitation du complexe avec l'apparition d'un plateau; la courbe décroît ensuite (tout l'excès de principe actif est dissous et cette fraction libre dissoute est progressivement complexée et précipitée).
- Le profil  $B_I$ : Les systèmes  $B_I$  sont similaires dans leurs formes aux profils  $B_S$ , les complexes en formation sont tellement insolubles ne peut être détectée [62].

**III.10-Conclusion**

Dans ce chapitre nous avons regroupées les informations sur les cyclodextrines. La présentation générale des propriétés des cyclodextrines montre tout le potentiel qu'offrent ces oligosaccharides cycliques pour faire une complexation. Nous également vu les dérivés cyclodextrine et la formation d'un complexe d'inclusion entre une cyclodextrine et une molécule invité confère à ce complexe des propriétés physico-chimiques et biologiques différentes de celles de la cyclodextrine et de la molécule incluse prise séparément et leurs conséquences de complexation.

# **CHAPITRE**

## **IV**

*Étude comparative*

Plusieurs études ont été faites pour développer l'extraction de la curcumine et d'un complexe cyclodextrine/curcumine (CD/curcumine) avec des nouvelles propriétés et un pouvoir thérapeutique, pour cela nous allons mener des études théoriques sur les méthodes d'extraction de la curcumine à partir du curcuma, puis sur les méthodes de formation de complexes CDs/curcumine, et enfin des études sur l'activité biologique de la curcumine et du complexe CDs/curcumine.

### **IV.1. Étude comparative des méthodes d'extraction de curcumine**

#### **IV.1.1. Introduction**

Nous allons comparer les résultats trouvés par les auteurs concernant les méthodes utilisées pour l'extraction de la molécule de la *curcumine* à partir du *curcuma*. Nous avons deux méthodes : l'extraction par macération (utilisation de deux solvants: éthanol et acétone) et l'extraction par micro-onde.

L'objectif de cette étude est la détermination de la méthode appropriée et qui donne un bon rendement.

#### **IV.1.2. Les méthodes utilisées pour l'extraction de la molécule de la *curcumine***

##### **IV.1.2.1. Première étude**

###### **IV.1.2.1.a. Extraction par macération**

Nous avons opté pour le protocole décrit par Beghdad : 40 g de la poudre (Broyat) de curcuma sont macérés à température ambiante pendant 5 jours dans 100 mL de solutions des solvants : Ethanol et Acétone. Après filtration sur un papier filtre N° 1, les filtrats sont mis sur un évaporateur rotatif, qu'ils ont programmé à 79° C pour l'éthanol à 59°C pour l'acétone. Ils ont obtenu des extraits bruts secs qui sont sous forme d'une pâte marron orange [63].

✓ Les résultats obtenus montrent que le rendement de *curcumine* par macération dans l'éthanol est meilleur par rapport à la macération dans l'acétone (Tableau. IV.1 et Fig .IV.1).

###### **IV.1.2.1.b. Extraction par micro-onde**

Nous avons opté pour le protocole décrit par Beghdad : 40g de poudre de *curcuma* (broyat) dans un erlenmeyer de 250 ml puis 80mL d'éthanol, coiffé d'un entonnoir à liquide, été placé au four micro-onde à 133W, le plateau tournant pour avoir une irradiation moyenne, irradié par tranches de 2 minutes avec contrôle rapide de la température et mélangeage, ceci jusqu'à atteindre la température d'ébullition du solvant, ils ont répété l'opération 2 fois, après

ils ont fait la filtration sur un Büchner à l'aide d'une pompe à vide. Ils ont refait l'ensemble des opérations précédentes.

Ils ont utilisé un four à micro-ondes domestique (Samsung, 20l, puissance maximale 800W) avec une fréquence d'onde de 2450 MHz. Les dimensions de 37,3cm. Le PTFE a été utilisé pour éviter toute perte de chaleur à l'intérieur [63].

- ✓ Les résultats montrent que le rendement du *curcumine* obtenus par micro-onde est élevé par rapport la macération dans l'éthanol et l'acétone (Tableau IV.1 et Fig.IV.1).

Procédé d'extraction	Rendement%	Temps d'extraction
Macération à froid (éthanol)	5	5 Jours
Macération à froid (acétone)	2.5	5 Jours
Micro-onde	6.5	6 min

Tableau IV.1. Présentation des résultats de rendement des extraits [63].

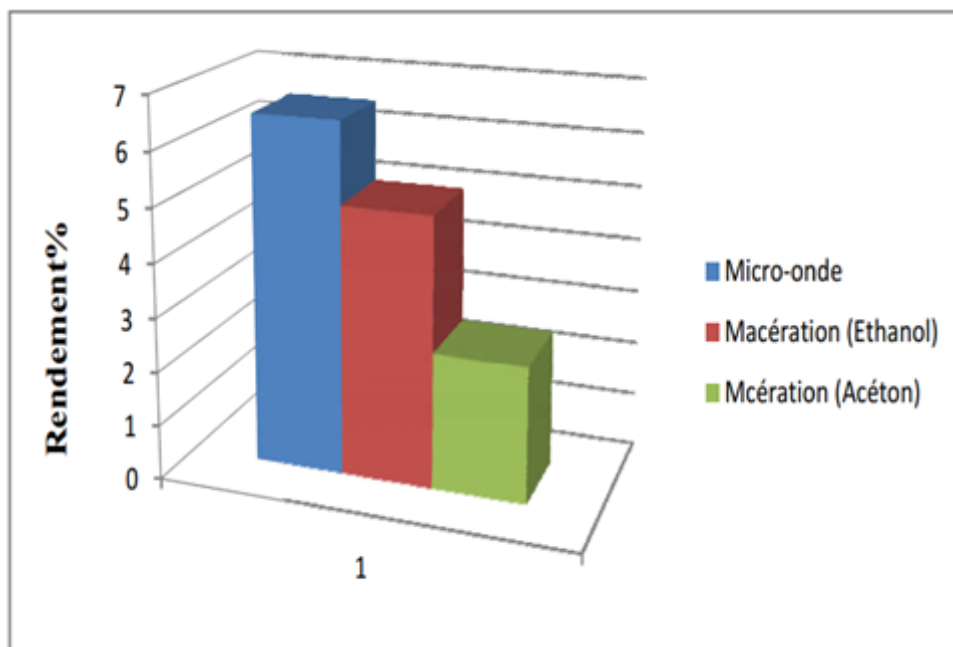


Fig. IV.1. Rendement des extraits de curcuma par différentes méthodes d'extraction [63]

La comparaison entre les méthodes d'extraction de la curcumine montre que l'extraction par micro-onde est la plus utilisée.

#### **IV.1. 2.2. Deuxième étude**

En 2014 Kavirayani a fait des études sur l'extraction de la curcumine à partir de curcuma par plusieurs méthodes, il a trouvé que :

L'extraction par solvant a été la méthode courante la plus employée pour séparer la curcumine du curcuma, et plusieurs solvants organiques ont été utilisés, y compris l'hexane, l'acétate, le méthanol. Le solvant employé, l'éthanol s'est avérée être le solvant le plus préférée pour l'extraction de la curcumine [64].

Kavirayani a trouvé que l'extraction par micro-onde est la méthode la plus utilisée et elle a été signalée comme étant meilleure méthode [64].

#### **IV.1.3. Conclusion**

Les résultats obtenus montrent que la méthode la plus utilisée pour l'extraction de *curcumine* est l'extraction par micro-onde par rapport aux autres procédés, ceci confirme l'avantage de cette technique du côté rendement, durée courte et aussi de côté environnemental, c'est une technique idéale pour extraire des substances naturelles.

### **IV.2. Étude comparative de la complexation de cyclodextrine avec la curcumine**

Dans ce contexte, nous allons comparer et choisir entre les différents complexes d'inclusion CD/*curcumine* ainsi que les méthodes de formation d'un complexe d'inclusion dans le but de savoir l'effet de cyclodextrine sur la *curcumine* et d'obtenir un bon complexe d'inclusion possède un pouvoir thérapeutique.

#### **IV.2.1. Choix de cyclodextrine**

En 2009, Yadav et collont fait des études sur la complexation de la cyclodextrine avec la curcumine. Les cyclodextrines utilisées sont HP $\beta$ -CD, M $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD. Ils ont trouvé que la solubilité de la *curcumine* est augmentée par CD en ordre suivant :HP $\beta$ -CD> M $\beta$ -CD> $\beta$ -CD> $\gamma$ -CD (Fig.IV.2), et le complexe d'inclusion *curcumine*/ HP $\beta$ -CD est plus stable par rapport aux autres complexes(le Tableau IV.2). La molécule de *curcumine* s'intègre mieux dans la cavité HP $\beta$ -CD que dans la cavité M $\beta$ -CD. La *curcumine* semble être mieux incluse dans HP $\beta$ -CD [65].

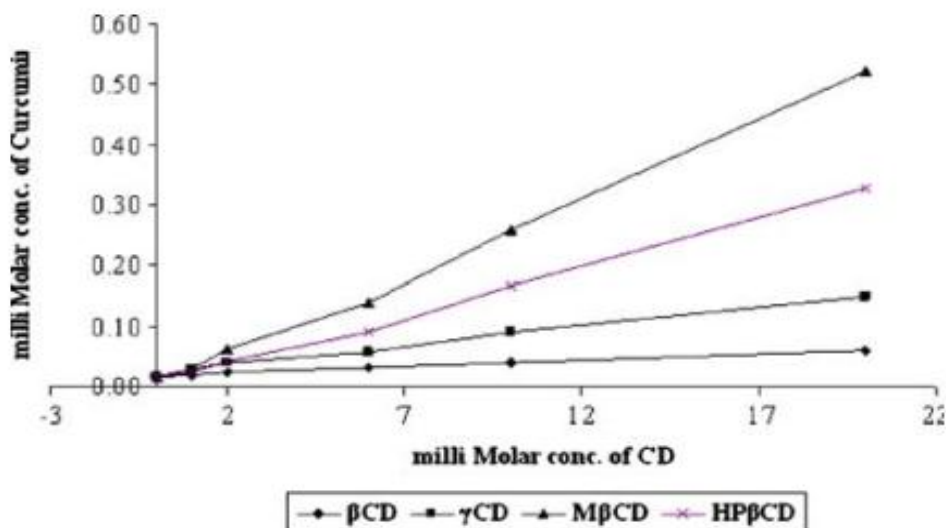


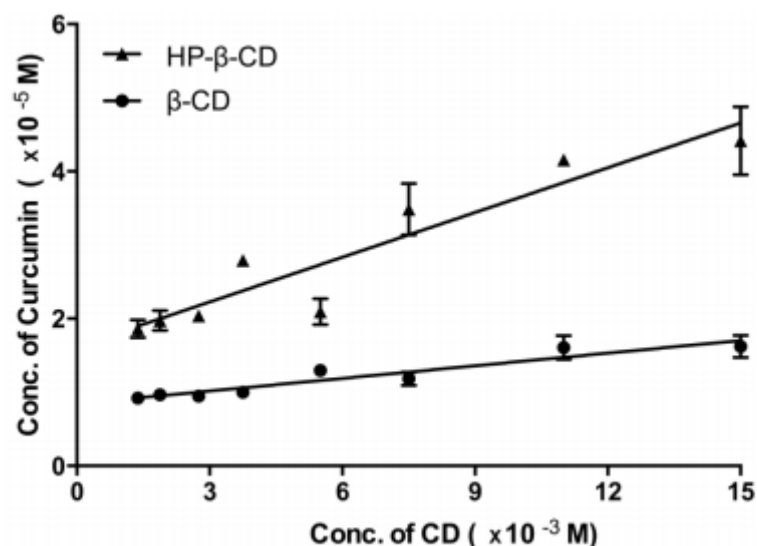
Fig.IV.2.Diagramme de solubilité du complexe CD/curcumine [65]

Type de cyclodextrine	Constante de stabilité (Ks)
$\beta$ -CD	134,002
$\gamma$ -CD	153,019
HP $\beta$ -CD	424,119
M $\beta$ -CD	401,817

Tableau. IV.2.Constante de stabilité de complexe CD/curcumine [65]

D'un autre côté il existe des études récentes réalisées en 2017 par Maria et coll. L'objectif principal de leurs études était de préparer des gouttes oculaires à la *curcumine* qui a fourni une libération prolongée pour permettre une application une fois par jour dans la rétinite pigmentaire. Pour atteindre leurs objectifs, la *curcumine* a été complexée avec l'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine et la  $\beta$ -cyclodextrine en deux rapports molaires (1 :1 et 1 :2). En fin ils ont constaté que le HP- $\beta$ -CD a augmenté la solubilité aqueuse de la *curcumine* a un degré plus élevé que la  $\beta$ -CD (Fig.IV.3). De plus la *curcumine* a une grande affinité avec le HP $\beta$ -CD qu'avec la  $\beta$ -CD. Les résultats qui ont obtenus par les différentes techniques de caractérisation a démontré que la complexation complète de la *curcumine* est avec le HP $\beta$ -CD [66].





**Fig.IV.3.**Diagramme de solubilité de *curcumine* avec HP-β-CD et β-CD dans l'eau distillé à  $37 \pm 0.5$ )°C [66].

#### IV.2.2. Choix de la méthode de formation d'un complexe d'inclusion

D'après les recherches et les articles qui nous avons vus, les articles qui ont attirés notre attention sont:

❖ Mangolim et coll, ont étudiés le complexe d'inclusion β-CD/*curcumine* qui été préparé dans le rapport 1 :2 par Coprécipitation, lyophilisation et Co-évaporation. Dans ce travail les résultats indiquées que le complexe *curcumine*-β-CD issu de la Co-précipitation a été sélectionnée pour teste ultérieures de stabilité. Macrolino et coll en 2011 ont également obtenu les meilleurs résultats dans la technique de Coprécipitation, par rapport aux méthodes de pétrissage et de mélange simple. Le processus de Coprécipitation est la plus simple, la plus rapide et la moins chère de toutes les méthodologies utilisées [67].

❖ Jantarat et coll, ont évalués l'effet de la méthode de préparation du complexe inclusion HPβ-CD/ *curcumine*. HPβ-CD a été sélectionné pour préparer un complexe d'inclusion avec la curcumine à un rapport molaire de 1 :1. Les méthodes qu'ils ont utilisées sont Co-évaporation, lyophilisation et changement de pH. Ils ont conclu que parmi les trois méthodes de préparation(CO-évaporation, lyophilisation et changement de pH) utilisées pour l'inclusion de complexe, la Co-évaporation est la méthode la plus appropriée pour la préparation du complexe d'inclusion *curcumine*-β-CD et pour l'amélioration de solubilité et stabilité de la *curcumine* [68].

❖ Ansari et coll ont fait des études sur l'amélioration de la solubilité et la stabilité de la *curcumine* par la complexation avec la cyclodextrine. Les méthodes utilisées pour la

préparation du complexe inclusion CD/*curcumine* sont: pétrissage, Co-mélange et lyophilisation et à la fin, ils ont conclu que les complexes lyophilisés ont une plus grande solubilité et stabilité que le pétrissage [69].

### **IV.2.3. Conclusion**

D'après cette étude, nous concluons que la HP- $\beta$ -CD est la meilleure molécule cage pour faire un complexe d'inclusion avec la *curcumine* et la co-précipitation est la méthode la plus appropriée pour obtenir un complexe plus efficace et stable.

### **IV.3. Etude comparative de l'activité biologique de la curcumine et du complexe CD/Curcumine**

La *curcumine*, en tant que pigment jaune dans l'épice du *curcuma* (*Curcuma longa*), possédait une application très intéressante dans l'industrie pharmaceutique en raison de ces nombreuses propriétés pharmacologiques surtout l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne. Mais son potentiel optimum est limité en raison de leur faible biodisponibilité et solubilité dans les solvants aqueux. Pour surmonter le problème et pour améliorer leur activité, plusieurs études ont été faites pour développer un nouveau complexe cyclodextrine/*curcumine* (CD/*curcumine*) avec des nouvelles propriétés.

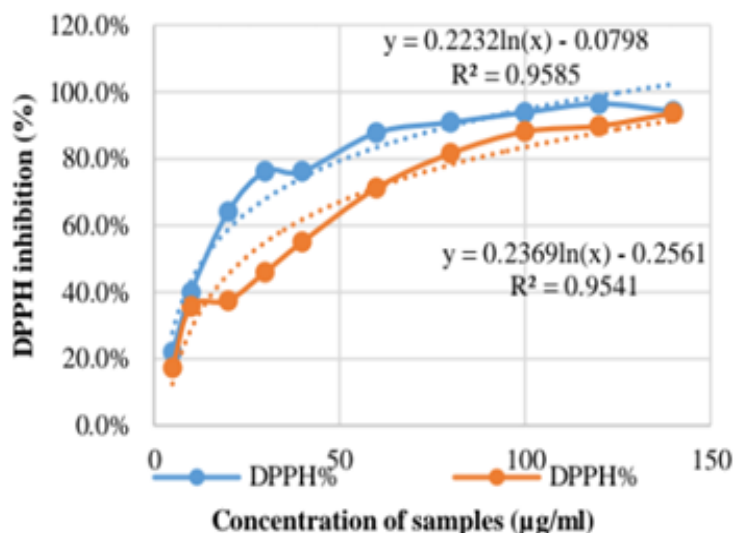
#### **IV.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante**

##### **IV.3.1.1. Etude de l'activité antioxydante de la curcumine**

###### **IV.3.1.1.a. Expérience n°1**

En 2010 Intan Atirah M et collont fait une étude sur l'activité antioxydante du curcuma Longa où ils ont utilisé la méthode du piégeage des radicaux DPPH et les résultats ont été comme suit :

- ⊕ L'activité du piégeage des radicaux DPPH des extraits de rhizome et du BHT augmente avec l'augmentation de la concentration.
- ⊕ La valeur de la concentration inhibitrice maximale (CI<sub>50</sub>) de l'extrait du *curcuma* était supérieure à celle de la solution standard. Ou la CI<sub>50</sub> de l'extrait de *curcuma* est de 21,25 µg / ml, tandis que la valeur IC<sub>50</sub> pour le BHT est de 12,42 µg/ml (Fig.IV.4).
- ⊕ Ces réactions ont montré que les phénoliques, les flavonoïdes et les tocophérols piégeaient les radicaux DPPH par leur capacité à donner de l'hydrogène [70].



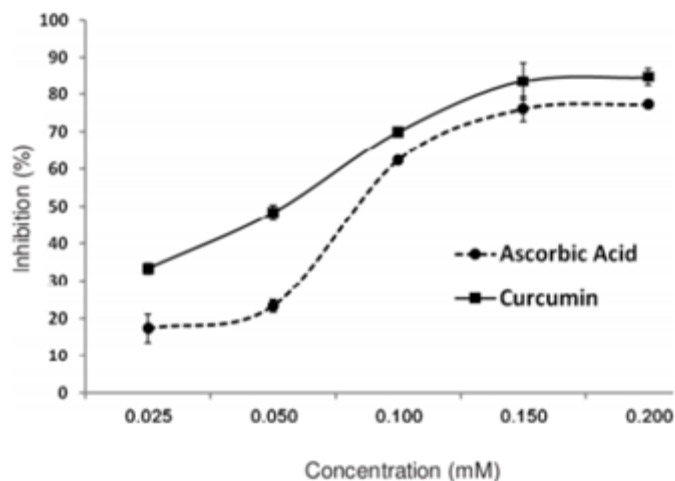
**Fig. IV.4. Activités de piégeage DPPH de l'extrait de *Curcuma. longa* et comparé avec l'hydroxytoluène Butyle comme solution standard [70]**

⊕ L'extrait du curcuma possédait une activité antioxydante donnée par les composés phénoliques et les flavonoïdes. Cette activité pourrait être bénéfique dans la prévention de diverses maladies liées au stress oxydatif [70].

#### IV.3.1.1.b. Expérience n°2

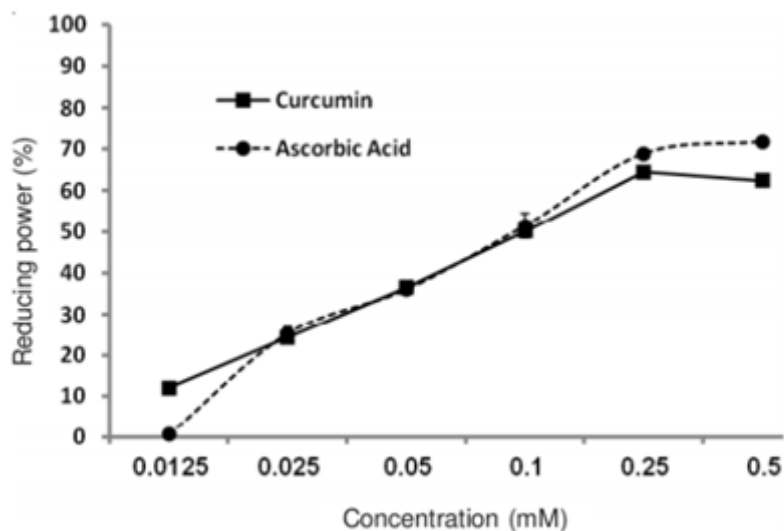
En 2013 Asouri M et coll ont fait une étude pour évaluer le pouvoir antioxydant de la *curcumine* par deux méthodes, à savoir de piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur de l'activité (RPA), par rapport à l'acide ascorbique (un antioxydant connu) les résultats été comme suit [71] :

Pour la méthode du DPPH Ils ont remarqué que la *curcumine* et l'acide ascorbique ont montré un piégeage maximal des radicaux de 83 et 77% à une concentration de 0,2 mM (Fig.IV.5), respectivement. La *curcumine* a montré une activité du piégeage des radicaux libres plus élevée que l'acide ascorbique à des faibles concentrations [71] .



**Fig.IV.5. Comparaison entre antioxydant connu et *curcumine* [71] .**

❖ Pour la méthode de RPA l'activité de puissance réductrice est montrée à 62 et 72% à une concentration de 0,5 mM pour la *curcumine* et l'acide ascorbique, respectivement (Fig.IV.6). L'activité de la *curcumine* et de l'acide ascorbique est liée à la concentration, il n'est pas observé de différence significative entre les deux antioxydants pour réduire l'activité énergétique [71] .



**Fig. IV.6. Pourcentage du pouvoir réducteur de la *curcumine* sur le potassium ferricyanure. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard [71] .**

D'après ces études on peut conclure que :

- ❖ L'acide ascorbique et la *curcumine* ont la même force à des concentrations réductrices d'activité énergétique.
- ❖ La *curcumine* a la même efficacité d'acide ascorbique.

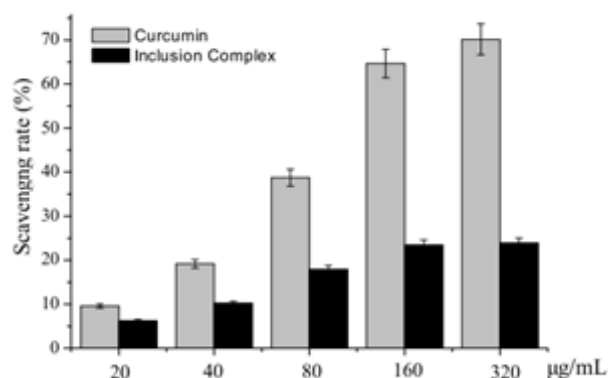
### IV.3.1. 2. Activité antioxydante du complexe CD/curcumine

En 2020 Alizade N et coll ont fait une étude pour l'évaluation de l'activité antioxydante du complexe  $\beta$ - $\gamma$ -CDs/*Curcumine* chargé en nanoparticules de chitosane. Les complexes étudiés sont : *Curcumine*, CD, CD/*curcumine* ils ont fait une comparaison pour déterminer le complexe qui donne la meilleure activité antioxydante, antibactérienne et anticancéreuse [72].

Ils ont utilisé la méthode du DPPH et ils ont trouvés que l'activité antioxydante de la *curcumine* est augmentée après l'addition de cyclodextrine. Aussi ils ont trouvé que l'activité antioxydante est meilleure dans les complexes  $\gamma$ -CD/*curcumine*,  $\beta$ -CD/*curcumine* et la *curcumine* respectivement [72].

En revanche Chen J et collontfait une étude pour l'évaluation de l'activité antioxydante du complexe cyclodextrine/*Curcumine* par l'utilisation de deux méthodes : la méthode du piégeage des radicaux et la méthode de piégeage ABTS<sup>•+</sup>. Les résultats été comme suit [73].

Pour la méthode du DPPH ont remarqué qu'avec l'augmentation de la concentration du complexe d'inclusion, le taux de piégeage des radicaux DPPH du complexe été augmenté. Aussi ils ont remarqué que l'activité de la *curcumine* est la meilleure par rapport l'activité é de CD/*Curcumine* Donc ils ont montré que l'activité de piégeage des radicaux DPPH du complexe demande de la concentration du complexe CD/*Curcumine* [73].



**Fig.IV. 7. Taux du piégeage des radicaux DPPH du complexe CD/*Curcumine* et du *Curcumine* [73].**

Pour la méthode de piégeage ABTS<sup>•+</sup>. Chen j et coll ont remarqué qu'avec l'augmentation de la concentration du complexe cyclodextrine/*Curcumine*, le taux de piégeage des radicaux ABTS du complexe a été augmenté avec l'augmentation de concentration du complexe. Ils

ont conclu que l'activité de piégeage d'ABTS du complexe dépend de la concentration du complexe CD/*Curcumine* [73].

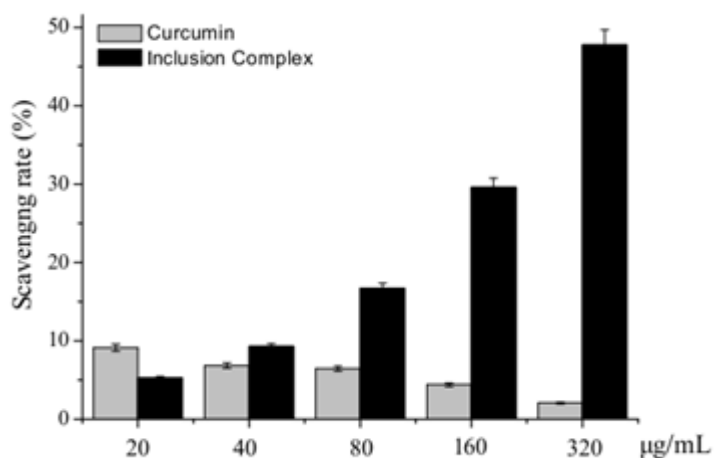


Fig. IV.8. Pourcentage d'inhibition de piégeage ABTS  $^{*+}$  du complexe CD/*Curcumine* et du *Curcumine* [73].

### IV.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

#### IV.3.2.1. Étude de l'activité antibactérienne de *curcumine*

##### IV.3.2.1. a. Expérience n°1

Les souches bactériennes utilisées dans cette expérience sont regroupées dans le tableau IV.3

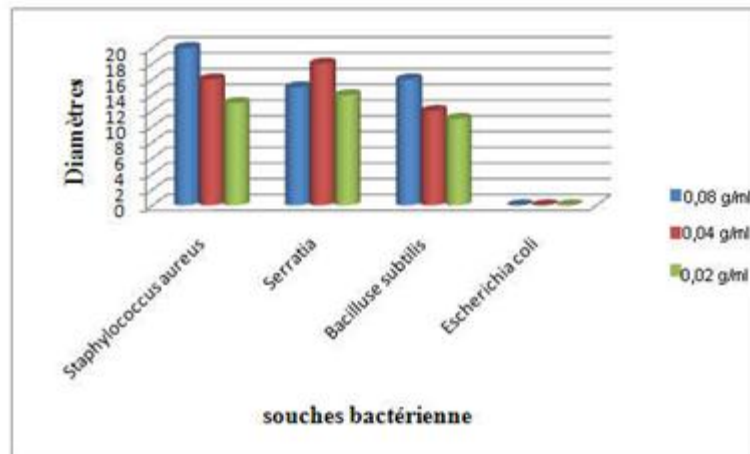
Les souches	Gram
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Serratia</i>	+

Tableau.IV.3. Souches bactériennes

Dans l'étude de Beghdad N et coll, l'activité antibactérienne a été évaluée vis-à-vis quatre types des bactéries, par la méthode de diffusion sur disque sur milieu de Mueller-Hinton gélosé. Ils ont utilisé deux solvants DMSO et tween80 pour la dilution de l'extrait.

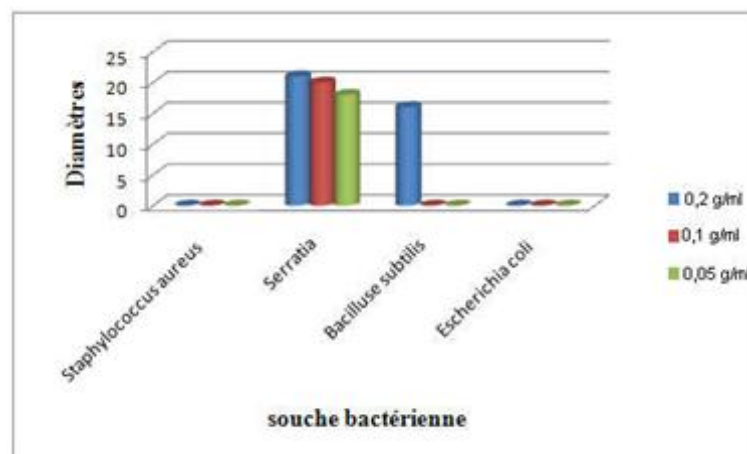
Beghdad N et coll ont constaté que l'extrait de *curcuma* présente une activité inhibitrice pour *Staphylococcus aureus*, à une concentration de 0,08 et 0,04 g/ml dont le diamètre d'inhibition est égal à 20 et 16 mm, et pour la bactérie *Serratia* ; dont la zone d'inhibition est de diamètre 15 et 18 mm pour une concentration 0.08 et 0.02 g/ml, respectivement. Ils ont remarqué aussi

pour la souche *Bacilluse subtilisa* une concentration 0,08 g/ml un diamètre d'inhibition est égal à 16mm (Fig.IV.10.)



**Fig. IV.9. Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'extrait de Curcuma sur les quatre bactéries [63].**

❖ Pour les souches bactériennes dans le tween80 ils ont montré qu'il y a une activité inhibitrice pour *Serratia* à une concentration 0,2, 0,1 et 0,05 g/ml dont les diamètres d'inhibition sont 21, 20, 18 mm respectivement. Aussi pour la bactérie *Bacillus subtilis*, ils ont remarqué une zone d'inhibition de diamètre 16 mm dans la concentration 0,2 g/mL. Mais n'a présenté aucune activité inhibitrice pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans toutes les concentrations (Fig.IV.10) [63]



**Fig. IV.10. Activité antibactérienne des différentes concentrations de curcumine dans tween sur les quatre bactéries [63]**

#### IV.3.2.1. b. L'expérience n°2

En 2010 Muhamed IA et coll ont aussi fait une étude sur l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de *curcuma* contre deux types de bactérie (*Staphylococcus aureus* et *Salmonella*

*typhi*) par l'utilisation de la méthode de diffusion en puits et diffusion sur disque [70]. D'après le Tableau. IV.4 ils ont montré que :

Pour la méthode de diffusion en puits, ils ont noté que l'extrait de curcuma donne la meilleure activité antibactérienne et la zone d'inhibition commencée avec 11 à 12 mm pour toutes les concentrations sauf à 0 mg/ml mais pour DMSO ils n'ont observé aucune activité antibactérienne, pour *S. typhi* à toutes les concentrations (0-500 mg/ml) testées ils n'ont observé aucune activité antibactérienne [70].

❖ Pour la méthode de diffusion par disque, ils ont observé que l'extrait éthanolique de *curcuma* a commencé l'activité antibactérienne avec inhibition de 7 mm contre *S. aureus* à toutes les concentrations d'extrait (100, 200, 300, 400, 500) sauf pour la concentration de 0 mg/ml et pour le DMSO. Par contre le résultat du test n'a montré aucune zone d'inhibition pour *S. typhi* à toutes les concentrations (0-500 mg/ml) testées.

Les souches	Concentration d'extrait de <i>curcuma</i> (mg/ml)	La zone d'inhibition (mm)	
		Diffusion de disque	Diffusion en puits
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	-	-
	100	7	12
	200	7	11
	300	7	11
	400	7	11
	500	7	11
	DMSO	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	0	-	-
	100	-	-
	200	-	-
	300	-	-
	400	-	-
	500	-	-
	DMSO	-	-

(-) : pas d'activité inhibitrice

**Tableau. IV.4. L'activité bactérienne de l'extrait de *curcuma* par la méthode de diffusion en puits et la méthode de diffusion sur disque [70].**

#### IV.3.2.1. c. Conclusion

D'après les résultats de cette étude on conclut que l'extrait de *curcumine* a une activité antimicrobienne contre les bactéries *aureus*. Cependant, mais aucun effet antimicrobien contre *S. typhi*.

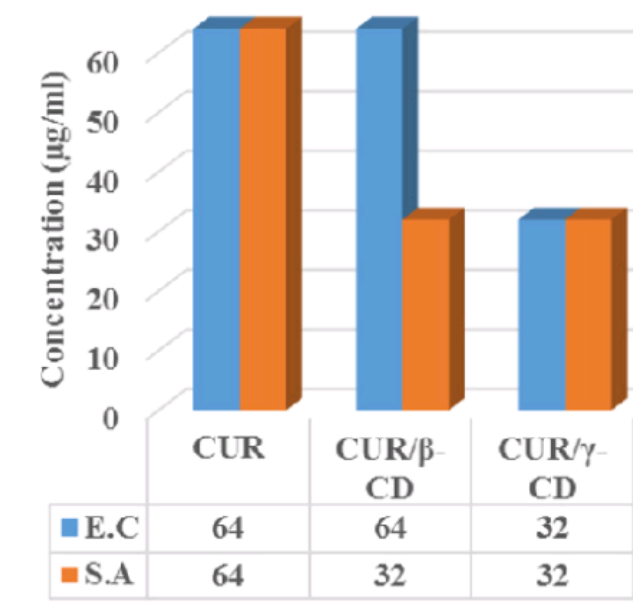


### IV.3.2.2. Étude de l'activité antibactérienne de complexe CD/Curcumine

En 2020 Alizade N et coll ont fait une étude pour l'évaluation de l'activité antibactérienne du complexe  $\beta$ -et  $\gamma$ -CDs/Curcumine chargé en nanoparticules de chitosane. Les complexes étudiés sont : Curcumine, CD, CDs/curcumine ils ont fait une comparaison pour déterminer le complexe qui donne la meilleure activité antibactérienne [72]. Ils ont utilisé la méthode de diffusion sur disque pour étudier l'efficacité antibactérienne contre deux bactéries *S. Aureus* et *E. coli*. Ils ont trouvé que :

Pour *E. Coli* la meilleure activité antibactérienne donné par la curcumine et la  $\beta$ -CD/curcumine a une concentration inhibitrice 64mg/ml mais pour *S.aureus* l'activité antibactérienne est variée d'un ordre décroissant : la curcumine, le complexe  $\beta$ -CD/curcumine et  $\gamma$ -CDs/Curcumine.

Aussi ils ont remarqué que la curcumine est plus réactive pour *E. Coli* par rapport au *S. Aureus* [72].



**Fig. IV.11. Activité antibactérienne à des concentrations minimales du curcumine  $\beta$ -CD/Curcumine et de  $\gamma$ -CDs/Curcumine**

En 2014 beehgge A évalué l'activité antibactérienne (l'effet phytotoxique) du complexe méthyl  $\beta$ -cyclodextrine polyéthylène glycol- à base de  $\beta$ -CD ou  $\gamma$ -CD avec la curcumine et la méthode utilisé pour l'étude aPDT contre *Escherichia coli* (*E. coli*) and

*Enterococcus faecalis*. Ils ont trouvé que le complexe a un effet phytochimique contre *E. coli* [74].

#### **IV .3.3. Résultats des études**

D'après notre synthèse bibliographique sur l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne de la curcumine et du CD/*Curcumine*, nous pouvons constater que :

- ❖ Le *curcumine* a un pouvoir antibactérien contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus, Serratia* par contre il n'a pas d'activité contre *S.typhi* ;

- ❖ La méthode de diffusion en puits est plus sensible que la méthode de diffusion par disque aussi, elle est la meilleure méthode pour l'évaluation de l'activité antibactérienne ;

- ❖ L'activité antioxydante du complexe CD/*Curcumine* est mieux par rapport l'activité de *curcumine* ;

- ❖ L'activité antioxydante de la curcumine et du CD/*Curcumine* est liée proportionnellement à la concentration ;

- ❖ La méthode d'ABTS est la meilleure méthode pour évaluer l'activité antioxydante du complexe mais le DPPH est la meilleure pour l'activité antioxydante de la *curcumine* ;

- ❖ La cyclodextrine augmente l'activité antioxydante de *curcumine* ;

- ❖ La *curcumine* et le complexe  $\beta$ -CD/*curcumine* ont la même efficacité antibactérienne.

#### **IV .4. Conclusion**

À la fin de ce chapitre et d'après les recherches effectuées, et si les conditions étaient meilleures et nous permettent de faire la partie expérimentale de cette étude nous avons choisis la méthode de micro-onde pour extraire la *curcumine* et nous probablement obtiendrons un bon rendement. Pour faire le complexe d'inclusion nous utiliserons la HP- $\beta$ -CD comme molécule cage et la méthode de co-précipitation pour la formation du complexe ; enfin, pour évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne du complexe nous utiliserons la méthode d'ABTS et la méthode de diffusion en puits.

## Conclusion générale

L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire est l'étude théorique de l'extraction de *curcumine* à partir du *Curcuma* par la comparaison entre deux méthodes d'extraction, l'extraction conventionnelle par la macération et l'extraction moderne par micro-onde, ensuite nous avons procédé à l'étude théorique de la complexation de cyclodextrine avec la *curcumine* et enfin nous avons fait une étude théorique et comparative sur l'activité biologique (antibactérienne et antioxydante) entre la *curcumine* et le complexe CD/*Curcumine*.

D'après nos études, nous avons conclu que l'extrait de *Curcuma longa* obtenu avec des rendements convenables par les deux méthodes d'extraction, mais l'extraction assistée par micro-onde a donné un meilleur résultat (6,5% après 6min) par rapport à la macération. Pour le solvant utilisé dans l'extraction nous avons trouvé que le méthanol est le meilleur solvant par rapport à l'éthanol et l'acétone.

D'après l'étude de la complexation de *Curcumine* avec la Cyclodextrine nous avons trouvé que la co-précipitation est la méthode la plus appropriée pour obtenir un complexe CD/*curcumine* stable et efficace. Aussi nous avons confirmé que la cyclodextrine a augmenté la solubilité ( $4,41 \times 10^{-5} \text{M}$ , était  $1,91 \times 10^{-5} \text{M}$ ), la stabilité ( $K_s = 401,817$ ) et par conséquent la biodisponibilité de *curcumine*.

L'évaluation de l'activité antioxydante de *Curcumine* et du complexe CD/*Curcumine* par l'utilisation des méthodes DPPH et ABTS, montre que la *curcumine* est un excellent inhibiteur du radical DPPH et le complexe est un excellent inhibiteur du radical ABTS ; l'activité antioxydante du complexe CD/*Curcumine* est bonne par rapport à l'activité de *curcumine*. Ces résultats ont confirmé que la cyclodextrine améliore l'activité antioxydante de *curcumine*.

L'évaluation de l'effet antibactérien des extraits du *curcuma* a été faite par différentes méthodes tandis que la diffusion sur disque est la plus utilisée, les résultats ont montré que le *Curcuma* a un pouvoir inhibiteur contre toutes les souches *E. coli*, *S. Aureus*, *Serratia*, *B. Subtilise* tandis que le complexe a un pouvoir inhibiteur contre *S. Saures* et *E. coli*.

- [1] François Nsemi. M., *thèse de doctorat*, identification de polyphenols, evaluation de leur activite antioxydante et etude de leurs proprietes biologiques, Université Paul Verlaine Metz,SPÉCIALITÉ : Chimie organique,**2010**.
- [2] Belkhiri Farida.,*Thèse de doctorat*, Activité antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales: salvia verbenaca et lepidium sativum, Université Ferhat Abbas Sétif 1,spécialité :microbiologie, **2018**.
- [3] Christelle hamburger.,*Thèse de doctorat*, Lecurcuma de l’pice au médecament , université de lorraine, spécialité : pharmacie,**2010**.
- [4] Huet, M. ; Fleurentin J., Curcuma, thé vert et chardon-marie : quelle stratégie adopter En prévention du cancer ou en complément des traitements,*Hegel* ; 3 (4) : 268-281, **2013**
- [5] Khatun, B.;Baishya, P.; Ramteke, A.; &Maji, T. K., study of the complexation of structurally modified curcumin with hydroxypropyl beta cyclodextrin and its effect on anticancer activity.*New journal of chemistry*, **2020**.
- [6] Lecerf J.-M., Effets métaboliques du Curcumine (obésité, lipides circulants, insulino-résistance, diabète et athérosclérose). *Phytothérapie*,10 :100-104, **2012**.
- [7] Ravindran, P. N.; BabuNirmal, K.; Sivaraman, K., Turmeric: The GenusCurcuma; CRC Press, 2007.Rivera-Espinoza Y., Muriel P., Liver Int. 29, 1457–1466,**2009**.
- [8] Strimpakos A. S.; Sharma R. A.,Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials.*Antioxid.Redox. Signal.* 10, 511-545,**2008**.
- [9] Jean-Pierre Jourdan., *thèse de doctorat*,Curcuma et curcumine : de l’histoire aux intérêts thérapeutiques.Université De Cean Spécialité innovation pharmaceutique et recherche décembre,**2015**.
- [10] Jansen P.C.M. ; Grubben G.J.H. ; Cardon D., *Ressources végétales de l’Afrique tropicale 3. Colorants et tanins*. Wageningen. Pays-Bas: PROTA: 238,**2005**.
- [11] Goel, A.;Kunnumakkara, AB.; Aggarwal, BB.,Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic *Biochem. Pharmacol.* 75, 787–809,**2008**.
- [12] Zakaria Cheikh Ali.,*thèse de doctorat*, Études chimiques et biologiques d’Aframomum sceptrum (Zingiberaceae) et de la curcumine. Université Paris Sud - Paris XI, Spécialité :pharmacie,**2012**.
- [13]Aggarwal, BB.;Bhattid,; Ichikawa.H.; Ahn, KS.; SETHI ,G.;Sandur ,SK.,et al. Curcumin biological and medicinal properties. Turmeric: the genus Curcuma. *Taylor and Francis Group*.297–368,**2006**.
- [14] Loap,S .;Stringher,C.; Chevalier C., Le curcuma (parti I),*Phytothérapie* 6 : 22–28 ,**2008**.
- [15] Edeas, M., la curcumine, *Phytothérapie* Numéro : 5, 230-233,**2006**.

- [16] Upendra R. S.; Khandelwal P.; and A. H. M. Reddy., “Turmeric powder (Curcuma longa Linn.) as an antifungal agent in plant tissue culture studies. *International Journal of Engineering Science*, 3(11), 7899–7904, **2011**.
- [17] Priyadarsini, K.I., The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*. 19(12), 20091, **2014**.
- [18] Bendali, A. ; Oulebsir, C. ; El-Hadi, D.; Djazouli, Z. E., Impact of the formulation on the potential anti-fungal activity essential oil of *Citrus aurantium* L. *Revue Agrobiologia* 9(2), 1677-1693, **2019**.
- [19] Chahboub, A., *Thèse de Magister*, optimisation de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus lab. ENP, Alger **1995**.
- [20] Hamitouche, T.I., *thèse de doctorat*, Etude de l'autovaporisation instantanée dans l'intensification de l'extraction de l'huile essentielle du bois de santal, Université de la Rochelle, Discipline : Génie des Procédés, **2016**.
- [21] Poirot R., *thèse doctorat*, méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale, Institut National Polytechnique de Toulouse, **2007**.
- [22] Turon, F., Recettes de macérât huileux : intérêt pour la cosmétique. *Oléagineux, corps gras, lipides*, 11(6), 411-413, **2004**.
- [23] Dibert, K.; Cros, E., Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee Part II: Kinetic data. *Journal of Food Engineering* .10(3), 199-214, **1989**.
- [24] Al-Bandak, G., & Oreopoulou, V., Antioxidant properties and composition of Majorana anasyriaca extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(3), 247–255, **2007**.
- [25] Spigno, G.; Tramelli L.; De Faveri, D. M, Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 200-208, **2007**.
- [26] Lakhdar, L., *thèse de doctorat*, évaluation de l'activité antibactérienne d'huile essentielle marocaine sur aggrégatibacter action mycète concomitantes: étude in vitro, Université de Mohammed V de Rabat, faculté de médecine dentaire de Rabat, **2015**.
- [27] Halliwell, B.; Biochemistry of oxidative, *Biochemical Society Transactions* 35(5), 1147-1150, **2007**.
- [28] Auberval, N., *Thèse de doctorat*, Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle Ecole doctorales des sciences, université de Strasbourg, **2010**.

- [29] Goudable, J. ;Favier, A. ;Radicaux libres oxygénés et antioxydants, *Nutrition Clinique et Metabolism*, 11(2);115-120,**1997**.
- [30] Fang, Y.l.; Yang ,S.; and Wu,G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879, **2002**.
- [31] FoncJ.Haleng .; J. Pincemail .; J.O. Defraigne .;C. Charlier .; J.P. Chapelle .; Le stress oxydant•*Rev Med liege* ;62(10),628 -638, **2007**.
- [32] Benchiha .; W.,*Thèse doctorat*, Phyto-ecologie et étude biochimique des composants phynoliques (traitement in vivo contre hépatite) de rhamnus alaternus L. des monts de tessala wilaya de sidi bel abess, Université Djillali liabes ,Spécialité : Environnement ,**2016**.
- [33] Menvielle-Bourg, F. J. ; Lasuperoxydedismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie*,118-121, **2005**.
- [34] Defaigue.J.O. ; Pinceemail ,J .Stress oxydant et antioxydant: mythes et réalités, *Revmedliège* ;63 ,10-19, **2008** .
- [35] Carange.J., *Thèse de doctorat*, Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinosteroides, une nouvelle stratégie de neuroprotection ,Université du Québec Trois-Rivières,spécialité biophysique et biologie cellulaire,**2010**.
- [36] Alain Favier.,Le stress oxydant ,Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, p 109\_115. novembre-décembre **2003**.
- [37] Hart.T., Shears.P., *Atlas de proche de microbiologie.*, 1<sup>ere</sup> édition., Médecine-Sciences Flammarion, Paris., p 71, **1997**.
- [38] Ulanowska.K.; Majchrzyk.A.; Moskot.M.; Jak-bkiewicz-Banecka. J.; W\_Âgrzyn.;GAssessment of antibacterialeffects of flavonoids by estimation of generation times in liquidbacterial cultures. *Biologia*: 62, 132-135, **2007**.
- [39] Villiers, A., Chimie organique : sur la fermentation de la féculé par l'actiondu ferment butyrique. C.R. *Acad. Sci.* 112:536, **1891**.
- [40] Duchêne,D.;Debruyères, B.; Brétilon, A., Les cyclodextrins. Nature, Origine et intérêts en pharmacie galénique. *Labo. Pharm-Prob. Tech* 32, 842-850, **1984**.
- [41] Szejtli, J.,Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry,*Chem. Rev.* 98 1743-1753, **1998**.
- [42] Szejtli, J., *Past, present and futute of cyclodextrin research. Pure and AppliedChemistry*, 76(10),1825-1845,**2004**.
- [43] Jacquet, R.,*Thèse de Doctorat*, Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométrique et complexante. Utilisation de la chromatographie en phase

liquide et de la spectrométrie de masse ,Université D'Orléans, Discipline : Chimie et physicochimie des composés d'intérêt biologique, **2006**.

[44] Deunf, E., *Thèse de Doctorat*, préparation, caractérisation et activation électrochimique de nouveaux complexes Métallo-cyclodextrine, Université D'Orléans, Spécialité : chimie,**2010**.

[45] Szente, L.; Szejtli, J., high soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties and trends in development. *Advanced drug delivery reviews*, 36(1), 17-28, **1999**.

[46] Hanna, K., *Thèse de Doctorat*, étude de faisabilité de l'utilisation de molécule cage dans la dépollution des sols: solubilisation et extraction de polluant organique par les cyclodextrines, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Ecole doctorale : Chimie de Lyon (Chimie, Procédés, Environnement), Spécialité : Sciences et techniques du déché, **2004**.

[47] Sebaaly, C., *thèse de doctorat*, Préparation à petite et grande échelle des liposomes encapsulant l'huile essentielle de clou de girofle libre et sous forme de complexe d'inclusion dans l'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine : caractérisation des nanostructures et évaluation de leur effet antioxydant , université de claud bernard lyon,spécialité :biochimie/ pharmacotechnie, **2016**.

[48] Loftsson, T.; Douchene, D., cyclodextrin and their pharmaceutical application. *International journal of pharmaceutics* 329 (1-2), 1-11, **2007**.

[49] Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; and Khar, R. K, cyclodextrins drug delivery: an updated review, *AAPS pharmacitech*, 6(2), E 329- E 357, **2005**.

[50] Kfoury, M., *Thèse de Doctorat*, Préparation, caractérisation physicochimique et évaluation des propriétés biologiques de complexes d'inclusion à base de cyclodextrines : applications à des principes actifs de type phénylpropanoïdes, université de Littoral -côte d'opale et université de libanaise, **2015**.

[51] Essalim, A.; Serve, D., étude électrochimique et spectrophotométrique des complexes d'inclusion du diazino-2-2' bis(ethyl-3 sulfonate-6 benzothiazole) avec les cyclodextrines en milieux aqueux. *Electrochimica acta*.37(1), 149-157, **1992**.

[52] Del valle, E.M.M., cyclodextrins and their uses: review. *Process biochem.* 39(9), 1033-1046, **2004**.

[53] Cavallaria, C.; Abertinia, B.; Gonzalez Rodriguezb, M. L.; Rodriguez, L., Improved dissolution behaviour of steam-granulate dpiroxicam. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 54(1), 65-73, **2002**.

- [54] yurtdas, G.; Demirel, M.; Genç,L., inclusion complexes of fluconazole with $\beta$ -cyclodextrin: physicochemical characterization and in vitro evaluation of phenomena and macrocyclic chemistry, 70(3-4), 429-435, **2010**.
- [55] Teffaha, F., *Thèses de Doctorat*, caractérisation physico-chimique et thermodynamique de complexe d'inclusion cyclodextrine/tetracaine, Université d'Oran, faculté des sciences, département de chimie, spécialité : chimie-physique, **2010**.
- [56] Bisson-Boutelliez, C., *Thèse de Doctorat*, Desulfovibrio spp. dans la maladie parodontale: interaction avec les cellule épithéliales KB et activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur des formes extracellulaires et intracellulaires, Université Henri Poincaré, Nancy-1, spécialité : Pharmacologie, **2009**.
- [57] Zidane,S.; Maiza, A.; Bouleghlem,H.; Fenet, B.; and Chevalier,Y., Inclusion complex of Tramadol in  $\beta$ -cyclodextrin enhances fluorescence by preventing self-quenching, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, Springer Verlag, 93 (3-4),253-264, **2019**.
- [58] Yang, H.;Parniak, M. A.; Hillier, S. L.; Rohan, L. C.,thermodynamic study of the cyclodextrin -UC781 inclusion complex using a HPLC method . *journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 72(3-4), 459-465, **2011**.
- [59] Benhadi,S., *thèse de doctorat*, Greffage de cyclodextrine modifiées par traitement corona sur matériaux cellulosique ,Université Henri Poincaré Nancy 1, Spécialité :Chimie physique, **2010**.
- [60] Oulmou, F., *Mémoire de magister*, Fonctionnalisation sélective de la  $\beta$ -Cyclodextrine en vue de la complexation de l'amlodipine, Université de Bejaia, Filière génie des procédés, option génie des polymères, **2014**.
- [61] Mehta, S.K.;Bhasin, K.K.; Dham,S.,Energetically favorable interactions between diclofenac sodium and cyclodextrin molecules in aqueous media, *Journal of Colloid and Interface. Science*, 326, 374-381, **2008**.
- [62] Brewster, M.E.; Loftsson. T., cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced drug delivery reviews*,59(7), 645-666, **2007**.
- [63] Beghdad Nesrine.; Beghdad Loubna., *mémoire de master*, extraction de la curcumine du curcuma, étude de ses propriétés par DFT et évaluation de ses activités antibactérienne, antioxydant et antiinflammatoire, Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana spécialité chimie pharmaceutique ,**2018**.
- [64] Kavirayani Indira Priyadarsini., The Chemistry of Curcumin:From Extraction to Therapeutic Agent, *Molecules* ,19, 20091-20112, **2014**.



- [65] yadav, V. R.; suresh. S, Devi. K,&Yadav. S., effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and inflammatory activity in rat colitis model. *AAPS pharm SciTech*, 10(3), 752-762, **2009**.
- [66] Maria Nabih, D.;Mishra, S.R.; Wang, L.; Helmy, A.; Osma, A. S.; Salah El-dahan, M.; Jablonski, M. M., Water-soluble complex of curcumin with cyclodextrin: Enhanced physical properties for ocular drug delivery, *current drug delivery*, 14(6), 875-886, **2017**.
- [67] Mangolim, C.S.;Moriwaki, C.;Claudia, N. A.; Sato, F.; Baesso, M. L.; Medina Neto, A.; Matioli, G., curcumin- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: stability, solubility, characterization by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and application, *food chemistry* 154 361-370, **2014**.
- [68] Jantararat, C.;Sirathanarun, P.; Ratanapongsai, S.; watcharakan, P.; Sunyapong, S &Wadu, A., curcumin- hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex preparation methods: effect of common solvent evaporation, freeze drying, and PH shift on solubility and stability of curcumin. *tropical journal of pharmaceutical research*, 13(8), 1215, **2014**.
- [69] Ansari, MJ.; Ahmed, MM.; Fatima, F.; Anwer, MK.; Jamil, S.; AL-Shdefat, R.; and Ali, BE., Solubility and stability enhancement of curcumin through cyclodextrin complexation, *international journal of biology, pharmacy and allied sciences(IJBPAS)*, 3(11), 2668-2675, **2014**.
- [70] Intan Atirah ,M .;Wan ,AN .;Wan ,A.;Wan,A, Ramli ,NS. ;A.Ghafar.;N, Antimicrobial and antioxidant property of Curcuma longa linn.*International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*,8(11),2383-2388,**2019**.
- [71] Asouri, M.; Ataei, R.; Ahmadi, A A.; Amini,AH. ; Masoumeh, RM., Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Curcumin, *Asian Journal of Chemistry*; 25(13), 7593-7595,**2013**.
- [72] Alizadeh, N.; Malakzadeh,S., Antioxidant, antibacterial and anti-cancer activities of  $\beta$ - and  $\gamma$ -CDs/ curcumin loaded in chitosan nanoparticle, *International Journal of Biological Macromolecules* 147, 778–791,**2014**.
- [73] Chen, J. ;Qin,X. ;Zhong.S.;Chen,S .; Su,W.;Liu,Y . Characterization of Curcumin/Cyclodextrin Polymer Inclusion Complex and Investigation on Its Antioxidant and Antiproliferative Activities.*Molecules*,23, 1179,**2018**.
- [74] (Hegge ,AB., Nielsen. TT .,Larsen .KL .,Bruzel. E., Tossen .H, Impact of Curcumin Separation in Antibacterial Photodynamic therapy Effect Of Cyclodextrin Type and Amount Studies on Curcumin and Curcuminoids, *Journal Of pharmaceutical Sciences*,101, 4, **2014**.