



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
جامعة الشهيد حمزة لخضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakdhar- EL OUED  
كلية العلوم الطبيعية والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية  
Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences biologiques  
Spécialité : Toxicologie

### THEME

*Evaluation de la quantité de la nicotine et étude  
des activités biologiques de trois formes de tabac:  
tabac commercial et tabac traditionnel et  
Nicotiana tabacum*

Présenté Par :

M<sup>me</sup> : KAROUI Asma

M<sup>elle</sup> : CHERIET Salsabil

M<sup>elle</sup> : MEISSA Asma

M<sup>me</sup> : GHEZAL Chaima

Devant le jury composé de :

Présidente M<sup>me</sup>.BOURAS Biya M.A.A , Université d'El Oued.

Examinatrice M<sup>me</sup>.MEDILA Ifriqya M.C.A , Université d'El Oued.

Promotrice M<sup>me</sup>.ADAIKA Aicha Docteur en pharmacochimie ,  
Université d'El Oued.

Année Universitaire:2021/2022



# *Remerciements*



## Remerciement

Nous tenons à remercier en premier lieu **ALLAH**, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour Nous tenons à remercier notre encadreur **Dr ADAIKA Aicha**, docteur en **BIOLOGIE**-Université d'El Oued, pour son sérieux et ses efforts Afin de nous aider et de nous orienter ,

Merci également pour votre disponibilité et votre gentillesse. Nous vous adressons notre profonde reconnaissance pour vos remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.

Nous remercions **Pr.Touhamilanez**, directeur du laboratoire de **VTRS**, d'université Echahide Hamma Lakhdar d'El Oued ; ainsi que Mr **Tlibaali** et **Nani sadok** ingénieurs du laboratoire .

Nous réservons une mention particulière à toutes les personnes qui nous ont apporté leur soutien et leur aide et tout particulièrement: l'ingénieur d'laboratoire pédagogique **Karoui radja** , professeur **Laouini salah eddine** , **Dr berra djamila** , **Dr dia Wahida**.

Nous exprimons nos vifs remerciements à **Mme.BOURAS Biya.**, maître de assistant A la faculté des sciences de la nature et de la vie -Université d'El Oued, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire. Aussi, nous tenons à exprimer également notre profonde reconnaissance à **Dr.MEDILA Ifriqya**, maître conférence A la faculté des sciences de la nature et de la vie -Université d'El Oued, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Un grand merci à toute l'équipe de laboratoire **d'EL MEDJED** et spécialement **djihad chenna** pour ses aides afin d'obtenir des bons résultats.

# Dédicace

*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail*

*: À La lumière de ma vie ; Mes parents :*

*Mon père : TAHER et Ma mère : HOURIA*

*À l'homme de ma vie, À celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au*

*Long de ce projet : mon mari MEHDI.*

*À la flamme de mon cœur, la lumière de mes jours, Mes filles :*

*MIRAL, NADA, NOUR, DJANA.*

*La source de mes efforts, celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au*

*long de ce projet ; ma sœur RADJA.*

*À l'âme pure de mon cher frère AMDJED, À mes très chères sœurs :*

*RANIA, SAHAR, MANAR, SOUHA*

*À mon petit frère : YACIN.*

*À mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au*

*Cours de mon cursus à l'université :*

*SALSABIL, CHAIMA, ASMA.*



**KAROUI ASMA**

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail en signe de respect et de*

*Reconnaissance à :*

*Mes très chers parents qui m'ont tant donné au cours de ma vie qu'ils trouvent ici l'expression de mes soutient les plus profonds pour leurs soutient, conseils et leur aide durant mes études.*

*Mes chers frères et mes sœurs et ma familles surtout les petits enfants,*

*Nadir, Rofane, Retal, Tamim .*

*Mes très chères amies Asma ,Asma ,Chaima.*

*Toutes mes amies l'université et tous les biologistes promotion 2022.*

*A tous ceux qui m'aiment et souhait ma réussite.*



*Salsabil.✍*

# Dédicace

*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail :*

*À La lumière de ma vie Mon père et Ma mère sans eux je ne suis pas pu être ce que je suis, qui ont œuvrés pour ma réussite, de par leurs amours, leurs soutiens, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute assistances et leurs présences dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soient-ils, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*A ma sœur : WIAM*

*A mes chers frères : ILYASE, AISSA, MOUSA, MOUHAMAD*

*A celui et qui m'a soutenue tout au long de ce projet mon fiancé :*

*MAHMOUD*

*A tous mes chers amis.*

*A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à*

*l'université : ASMA, SALSABIL, CHAIMA*

*A tous les étudiants de ma promotion.*



*MEISSA ASMA ✍*

# Dédicace

*Je dédie cet humble travail*

*À l'homme de ma vie, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, mon père **Abdelkader**.*

*À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, le flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur.*

*À la personne que j'aime tant et qui m'a soutenu tout au long de ce projet : mon mari **Ammar**, et mon petit cher fils **Soulaïman***

*À ma deuxième famille, mama **Zohour**, baba **Abderrahman**, mes belles-sœurs, **Lamia, Khawla, Roumiassa, Hana**, et beaux-frères **Larbi, Yahya et Anas**.*

*À ma soeur et mon à me sœur **Hadia**, qui m'a aidée sans relâche ou sans s'ennuyer et qui a guidée mon chemin dans ce projet,*

*À celles qui ont partagé la vie aigre douce de la vie sous un même toit, mes sœurs **Fouzia, Karima, Aïcha; Hayet**. Et mes frères **Abderrahman, Mosbah, Abdessalam**, et à ma gentille nièce **Zineb** Et aux femmes de mes frères, chacun avec son nom **Aïcha, Souad et Kalthoum**, et mes tantes surtout ma tante **Naima**. Je n'oublie pas non plus **Mohammed et Aymen** mes neveux et les poussins : **siradj, Anas, Nidhal, Khadidja, Hadjer, Razan, Sarah, Rinad**.*

*À celui que le destin m'a le mieux connu, qui est comme mon frère **Mohammed**.*



**Chaima** ✍️

*Résumé*

*Abstract*

الملخص



## Résumé

Le but de notre travail est de faire une étude comparative entre trois formes de tabac à savoir tabac commercial, tabac traditionnel et la *Nicotiana*. Pour cela nous avons préparé les différents extraits de ces types de tabac. En effet, le test de screening phytochimique a approuvé la présence de : polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, terpènes et coumarine, Le rendement d'extraction a été estimé à *Nicotiana tabacum* 4,35 % et tabac traditionnel 10,33% et tabac artificiel 14,33%.

En parallèle nous avons fait une extraction des alcaloïdes totaux par la méthode solvant apolaire afin d'évaluer la concentration de la nicotine par rapport au standard la nicotine. En effet, la concentration de la nicotine dans les extraits a été évaluée par deux méthodes spectroscopiques UV-Vis et HPLC. Les résultats montrent que le tabac traditionnel contient 0,01mg/g de la nicotine et 61,1937mg/g dans l'extrait de la *Nicotiana tabacum* et 90,31748 mg/g dans tabac artificiel. En revanche les résultats ont été confirmés par la méthode HPLC

En outre, nous avons étudié quelques activités biologiques sur ces trois extraits. Cependant, L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et anti hémolyse montre des bons résultats pour les deux extraits : *Nicotiana* et le tabac traditionnel, par contre l'extrait de tabac artificiel provoque l'hémolyse et ne montre aucune activité anti inflammatoire.

L'activité anticancéreuse a été évaluée par l'interaction avec l'ADN, l'extrait de la *Nicotiana tabacum* et le tabac traditionnel montre une bonne activité anti tumorale, en revanche les résultats sont inversés pour le tabac artificiel, ces résultats ont été confirmé par l'activité antioxydant de ces extraits.

En fin L'activité antibactérienne n'a montré aucun effet antibactérien vis -à- vis les souches référenciées utilisées, d'ailleurs ces bactéries ont eu une résistance envers ces extraits à cause de la concentration élevés en alcaloïde (la nicotine). En conclusion, l'activité cancéreuse et pro-inflammatoire et hémolytiques du tabac artificiel est causé par les composant toxique ajouté dans sa préparation (goudron, monoxyde de carbone métaux lourds... et non pas la nicotine

**Mots clés :** Nicotine, Screening phytochimique, activité biologique, tabac traditionnelle, tabac commercial, *Nicotiana tabacum*, Activité anticancéreuse, HPLC, activité antibactérienne.

## Abstract

The aim of our work is to make a comparative study between three forms of tobacco namely commercial tobacco, traditional tobacco and *Nicotiana*. In fact, The phytochemical screening test approved the presence of: polyphenols, flavonoids, alkaloids, tannins, terpenes and coumarin, The extraction yield was estimated *Nicotiana tabacum* 4.35 % and traditional tobacco 10.33% and artificial tobacco 14.33%.

In parallel, we carried out an extraction of the total alkaloids by the apolar solvent method in order to evaluate the concentration of nicotine compared to the standard nicotine. Indeed, the concentration of nicotine in the extracts was evaluated by two spectroscopic methods UV-Vis and HPLC. The results show that traditional tobacco contains 0.01mg/g of nicotine and 61.1937mg/g in the extract of the *Nicotiana tabacum* and 90.31748 mg/g in artificial tobacco. On the other hand the results were confirmed by the HPLC method

In addition, we studied some biological activities on these three extracts. However, the evaluation of the anti-inflammatory and anti-hemolysis activity shows good results for both extracts: *Nicoriana* and traditional tobacco, on the other hand the artificial tobacco extract causes hemolysis and shows no anti-inflammatory activity.

The anticancer activity was evaluated by the interaction with DNA, the extract of *Nicotiana tabacum* and traditional tobacco shows a good anti-tumor activity, on the other hand the results are reversed for artificial tobacco, these results were confirmed by the antioxidant activity of these extracts.

In the end The antibacterial activity showed no antibacterial effect with respect to the referenced strains used, moreover these bacteria had a resistance towards these extracts because of the high concentration of alkaloid (nicotine).In conclusion, the cancerous and pro-inflammatory and hemolytic activity of artificial tobacco is caused by the toxic component added in its preparation (tar, carbon monoxide heavy metals... and not nicotine

**Key words:** Nicotine, Phytochemical screening, biological activity, traditional tobacco, commercial tobacco, *Nicotiana tabacum*, Anticancer activity, HPLC, antibacterial activity.

## الملخص:

الهدف من عملنا هو إجراء دراسة مقارنة بين ثلاثة أشكال من التبغ وهي التبغ التجاري والتبغ التقليدي ونيكوتيانا. لهذا قمنا بإعداد مقتطفات مختلفة من هذه الأنواع من التبغ ثم قمنا بإجراء الفحص الكيميائي النباتي من أجل تحديد تكوين المستقلب الثانوي، في الواقع، وافق اختبار الفحص الكيميائي النباتي على وجود : البوليفينول، الفلافونويد، القلويدات، التانينات، التربينوالكومارين، تم تقدير محصول الاستخراج في نيكوتيانا تاباكوم 4.35% و التبغ التقليدي 10.33% و التبغ الاصطناعي 14.33%.

في موازاة ذلك، قمنا باستخراج القلويدات الكلية بواسطة طريقة المذيبات القطبية من أجل تقييم تركيز النيكوتين مقارنة بالنيكوتين القياسي. في الواقع، تم تقييم تركيز النيكوتين في مقتطفات من قبل اثنين من الطرق الطيفية الأشعة فوق البنفسجية المرئية. أظهرت النتائج أن التبغ التقليدي يحتوي على 0.01 مجم/جم من النيكوتين و61.1937مجم/جم في مستخلص نيكوتيانا تاباكوم و90.31748مجم / جم في التبغ الاصطناعي. من ناحية أخرى تم تأكيد النتائج من خلال طريقة

## HPLC

بالإضافة إلى ذلك ، درسنا بعض الأنشطة البيولوجية على هذه المقتطفات الثلاثة. ومع ذلك، فإن تقييم النشاط المضاد للالتهابات ومضاد انحلال الدم يظهر نتائج جيدة لكل من المستخلصات : نيكوتيانا والتبغ التقليدي، من ناحية أخرى، فإن مستخلص التبغ الاصطناعي يسبب انحلال الدم ولا يظهر أي نشاط مضاد للالتهابات.

النشاط المضاد للسرطان تم تقييمه من خلال التفاعل مع الحمض النووي ،ويظهر مستخلص نيكوتيانا تاباكومو التبغ التقليدي نشاطا جيدا مضادا للورم، ومن ناحية أخرى يتم عكس النتائج بالنسبة للتبغ الاصطناعي، وقد تم تأكيد هذه النتائج من خلال النشاط المضاد للأكسدة لهذه المستخلصات.

في النهاية ،لم يظهر النشاط المضاد للبكتيريا أي تأثير مضاد للبكتيريا في ما يتعلق بالسلاطات المشار إليها المستخدمة ،علاوة على ذلك ،كانت لهذه البكتيريا مقاومة تجاه هذه المستخلصات بسبب التركيز العالي للقلويد (النيكوتين). في الختام ،فإن النشاط السرطاني والمؤيد للالتهابات والانحلالي للتبغ الاصطناعي ناتج عن المكون السام المضاف في تحضيره (القطران، أو لأكسيد الكربون المعادن الثقيلة... وليس النيكوتين).

الكلمات المفتاحية : النيكوتين، الفحص الكيميائي النباتي، النشاط البيولوجي، التبغ التقليدي، التبغ التجاري، نيكوتيانا تاباكوم، النشاط المضاد للسرطان **HPLC**، النشاط المضاد للبكتيريا.

## Liste des Figures

Numéro	Titre	Page
<b>01</b>	<b>Figure 01:</b> Les compositions toxiques du tabac	<b>07</b>
<b>02</b>	<b>Figure 02:</b> Aspect endoscopique d'un cancer du poumon	<b>10</b>
<b>03</b>	<b>Figure 03:</b> Aspect macroscopique du poumon d'un fumeur en post mortem	<b>10</b>
<b>04</b>	<b>Figure 04 :</b> Les maladies liées au tabac artificiel	<b>11</b>
<b>05</b>	<b>Figure 05 :</b> Classification des alcaloïdes selon leur noyau hétérocyclique	<b>15</b>
<b>06</b>	<b>Figure 06:</b> Structure chimique la nicotine	<b>16</b>
<b>07</b>	<b>Figure 07:</b> Structure chimique de la caféine et Atropine	<b>16</b>
<b>08</b>	<b>Figure 08 :</b> Structure chimique d'acides aminés	<b>17</b>
<b>09</b>	<b>Figure 09 :</b> Structure Chimique de la nicotine	<b>20</b>
<b>10</b>	<b>Figure 10 :</b> La balance pro-oxydante et anti-oxydatif	<b>25</b>
<b>11</b>	<b>Figure 11 :</b> <i>Nicotiana tabacum</i>	<b>39</b>
<b>12</b>	<b>Figure 12:</b> Juniperus oxycedrus	<b>30</b>
<b>13</b>	<b>Figure 13 :</b> Aire de répartition des genévriers en région méditerranéenne	<b>32</b>
<b>14</b>	<b>Figure 14:</b> Effet anti-inflammatoire de la berbérine	<b>36</b>
<b>15</b>	<b>Figure15:</b> Les quatre principaux alcaloïdes benzyloquinoléines entraînant une activité bactéricide	<b>38</b>
<b>16</b>	<b>Figure16:</b> Schématisation du Principe de la mise en œuvre de l'antibiogramme	<b>39</b>
<b>17</b>	<b>Figure:</b> Protocole de CCM	<b>42</b>
<b>18</b>	<b>Figure 18:</b> Principe et appareillage d'une chaîne d'HPLC	<b>43</b>
<b>19</b>	<b>Figure:</b> Allure générale d'un voltampérogramme cyclique	<b>45</b>
<b>20</b>	<b>Figure20 :</b> <i>L'espèce Nicotiana Tabacum</i>	<b>49</b>
<b>21</b>	<b>Figure21 :</b> carte de la zone d'étudiée	<b>50</b>

22	<b>Figure22:</b> L'espèce <i>Nicotiana tabacum</i>	50
23	<b>Figure23:</b> tabac artificiel	51
24	<b>Figure24 :</b> tabac traditionnel	51
25	<b>Figure25 :</b> les étapes de la préparation de l'extrait brut	54
26	<b>Figure26:</b> les étapes de la préparation d'extrait des alcaloïdes totaux	55
27	<b>Figure27:</b> protocole d'extraction des alcaloïdes totaux.	56
28	<b>Figure 28 :</b> Ensemencement avec l'écouvillon	66
29	<b>Figure 29 :</b> sélection la souche bactérienne avec micropipette	66
30	<b>Figure 30 :</b> CCM des extraits d'alcaloïde et différents plantes révélé par dragendroff.	69
31	<b>Figure31:</b> Spectre d'absorption de <i>Nicotiana tabacum</i>	71
32	<b>Figure32:</b> Spectre d'absorption de tabac traditionnel	71
33	<b>Figure33:</b> Spectre d'absorption de tabac artificiel	71
34	<b>Figure 34:</b> Spectre d'absorption de <i>Nicotiana tabacum</i>	71
35	<b>Figure35:</b> Spectre d'absorption de tabac traditionnel	71
36	<b>Figure36:</b> Spectre d'absorption de tabac artificiel	71
37	<b>Figure 37:</b> Voltampérogramme cyclique d'extrait tabac traditionnel	72
38	<b>Figure 38:</b> Voltampérogramme cyclique d'extrait tabac artificiel	72
39	<b>Figure 39:</b> Voltampérogramme cyclique d'extrait <i>Nicotiana tabacum</i>	72
40	<b>Figure 40 :</b> Spectre IR de la nicotine	73
41	<b>Figure 41:</b> Spectre IR de tabac traditionnel	73
42	<b>Figure 42 :</b> Spectre IR de tabac artificiel	74
43	<b>Figure 43:</b> Spectre IR de <i>Nicotiana tabacum</i> .	75
44	<b>Figure 44 :</b> Courbe d'étalonnage de la nicotine par l'HPLC	76

<b>45</b>	<b>Figure 45:</b> profil chromatographique HPLC de la nicotine d'extrait du <i>Nicotiana tabacum</i> .	<b>76</b>
<b>46</b>	<b>Figure 46:</b> profil chromatographique HPLC d'extrait de tabac traditionnel.	<b>77</b>
<b>47</b>	<b>Figure 47 :</b> profil chromatographique HPLC de la nicotine d'extrait de Tabac artificiel.	<b>77</b>
<b>48</b>	<b>Figure 48:</b> Spectre d'absorption	<b>77</b>
<b>49</b>	<b>Figure 49 :</b> courbe d'étalonnage de nicotine standard	<b>79</b>
<b>50</b>	<b>Figure50:</b> Spectre d'absorption UV-Vis d' atropine standard	<b>79</b>
<b>51</b>	<b>Figure51:</b> Spectre d'absorption UV-Vis d'atropine standard	<b>80</b>
<b>52</b>	<b>Figure 52 :</b> courbe d'étalonnage de l'atropine standard	<b>80</b>
<b>53</b>	<b>Figure 53:</b> Les courbe d'étalonnage d'acide gallique par la voltammétrie cyclique	<b>81</b>
<b>54</b>	<b>Figure 54:</b> Spectre d'absorption de l'ADN.	<b>82</b>
<b>55</b>	<b>Figure 55:</b> Spectre d'absorption UV-Vis de tabac traditionnel en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate pH7.2	<b>83</b>
<b>56</b>	<b>Figure 56 :</b> Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN	<b>83</b>
<b>57</b>	<b>Figure57:</b> Spectre d'absorption UV-Vis de tabac artificiel en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate pH7.2	<b>84</b>
<b>58</b>	<b>Figure 58:</b> Droite de régression de rapport $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN	<b>84</b>
<b>59</b>	<b>Figure59 :</b> Activité anti cancéreuse de tabac artificiel.	<b>84</b>
<b>60</b>	<b>Figure 60:</b> Spectre d'absorption UV-Vis de <i>Nicotiana tabacum</i> en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate pH7.2	<b>85</b>
<b>61</b>	<b>Figure 61 :</b> Droite de régression de l'absorbance $A_0/(A - A_0)$ en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN	<b>85</b>

<b>62</b>	<b>Figure 62:</b> Pourcentage d'inhibition de différents extraits d'alcaloïde comparé avec celle de standard Diclofénac	<b>87</b>
<b>63</b>	<b>Figure 63:</b> Pourcentage d'inhibition de différents extraits hydro éthanolique comparé avec celle de Diclofénac.	<b>88</b>
<b>64</b>	<b>Figure 64 :</b> Pourcentage de protection de différents extraits comparé avec le standard l'Aspirine.	<b>89</b>
<b>65</b>	<b>Figure 65 :</b> Observation de la zone d'inhibition provoquée par l'antibiotique, DMSO et l'extrait de <i>Nicotiana tabacum</i> sur quelques souches bactériennes	90
<b>66</b>	<b>Figure 66:</b> Observation de zone d'inhibition provoquée par l'antibiotique, DMSO et l'extrait de tabac traditionnel sur quelques souches bactériennes	90
<b>67</b>	<b>Figure 67:</b> Observation de zone d'inhibition provoquée par l'antibiotique, DMSO et l'extrait de tabac artificiel sur quelques souches bactériennes	90

## Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
<b>01</b>	<b>Tableau 01:</b> Les principales espèces réactives de l'oxygène	<b>26</b>
<b>02</b>	<b>Tableau 02:</b> Espèces réactives à l'oxygène primaires et secondaires	<b>28</b>
<b>03</b>	<b>Tableau 03 :</b> Conditions expérimentales du dispositif (HPLC) de séparation des composés phénoliques étudiés.	<b>60</b>
<b>04</b>	<b>Tableau 04 :</b> les changements du rapport de phase mobile A et B en termes de temps	<b>60</b>
<b>05</b>	<b>Tableau05 :</b> Rendements d'extrait sec	<b>67</b>
<b>06</b>	<b>Tableau 06:</b> Mise en évidence de certaines métabolites secondaires dans l'extrait brut de : <i>Nicotiana tabacium</i> ,tabac traditionnel ,tabac artificiel .	<b>67</b>
<b>07</b>	<b>Tableau 07 :</b> CCM des extraits	<b>69</b>
<b>08</b>	<b>Tableau 08 :</b> les valeurs de l'absorbance et $\lambda$ max de différents extraits étudiées	<b>69</b>
<b>09</b>	<b>Tableau 09 :</b> Paramètres électrochimiques des fractions.	<b>71</b>
<b>10</b>	<b>Tableau10 :</b> la concentration de la nicotine dans les différents extraits étudiées par HPLC.	<b>77</b>
<b>11</b>	<b>Tableau 11 :</b> résultats des concentrations de nicotine standard (mg /ml)avec les Absorbances	<b>77</b>
<b>12</b>	<b>Tableau12 :</b> détermination de concentration de la nicotine dans l'extrait préparé par rapport au courbe standard de nicotine	<b>78</b>
<b>13</b>	<b>Tableau 13 :</b> <b>Tableau :</b> résultats des concentrations de l'atropine standard (mg /ml)avec les Absorbances	<b>79</b>
<b>14</b>	<b>Tableau 14 :</b> détermination de concentration de la nicotine dans l'extrait préparés par rapport au courbe standard de l'atropine	<b>80</b>
<b>15</b>	<b>Tableau 15:</b> Activité antioxydant totale d'extrait	<b>81</b>
<b>16</b>	<b>Tableau 16:</b> Représentation des résultats des ratios $DO_{260}/DO_{280}$ des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes.	<b>82</b>
<b>17</b>	<b>Tableau17 :</b> résultats des valeurs de l'inverse des concertations de l'ADN avec les rapports A0/A-A0	<b>82</b>
<b>18</b>	<b>Tableau 18:</b> résultats des valeurs de l'inverse de les concertations de l'ADN avec les rapports A0/A-A0	<b>83</b>

<b>19</b>	<b>Tableau 19</b> : résultats des valeurs de l'inverse de les concertations de l'ADN avec les rapports A0/A-A0	<b>84</b>
<b>20</b>	<b>Tableau 20</b> : Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison K et $\Delta G$ obtenu de différents extraits étudiées à partir des données spectroscopique UV-Vis.	<b>85</b>
<b>21</b>	<b>Tableau 21</b> : Etude de l'activité inhibitrice des différents extraits d'alcaloïdes étudiés	<b>86</b>
<b>22</b>	<b>Tableau 22</b> : Etude de l'activité inhibitrice des différents extraits hydro éthanoliques étudiées	<b>87</b>
<b>23</b>	<b>Tableau 23</b> : Etude de pourcentage de protection d'extraits hydro-éthanoliques.	<b>88</b>
<b>24</b>	<b>Tableau 24</b> : Etude de l'activité inhibitrice de différents extraits étudiés	<b>90</b>

## Liste des abréviations

CCM : chromatographie sur couche mince

MSS: Ministère de la santé de l'hygiène et de la prévention du Sénégal

HPLC : La chromatographie liquide haute performance

FT-IR : Spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier

SBA : Sérum bovine albumine

OD : la densité optique

AC : absorbance du contrôle négatif.

ADN : acide désoxyribonucléique

UFC : unité formant colonies

min : minute

nm: nanomètre

ml : millilitre

O<sub>2</sub> :Le dioxygène

μl :microlitre

C° : Degrés Celsius C

UV : Ultraviolet

PH : potentiel Hydrogène

R (%) : Rendement en %

HCl : Acide chlorhydrique

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Acide sulfurique

CHCl<sub>3</sub>: Chloroforme

$\text{FeCl}_3$  : Chlorure de fer

$\text{NH}_4\text{OH}$  : Hydroxyde d'ammonium

$\text{NH}_3$  : Ammoniac

$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  : éthanol

$\text{H}_2\text{O}$  : eau

$\text{NOH}$  : hydroxyde de sodium

CV: La voltampérométrie cyclique

CPG: La chromatographie en phase gazeuse

IPCS: International Programme on Chemical Safety

DDT :dichlorodiphényltrichloroéthane

IR : . Spectroscopie Infrarouge

CO : monoxyde de carbone

BPCO :Broncho pneumopathie chronique obstructive

VEMS :Volume expiratoire maximal par seconde

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$  : Nicotine

ORL L'oto-rhino-laryngologiste

SM: Le métabolite secondaire

AGPI : acide gras polyinsaturé

ERO :espèces réactives de l'oxygène

OH: radical hydroxyl

BSA :Albumine de Sérum bovin

# Sommaire

## Contents

Remerciement.....	4
Dédicace .....	5
Dédicace .....	7
Dédicace .....	8
Liste des Figures.....	13
Liste des tableaux .....	17
Liste des abréviations .....	19
Introduction générale.....	1
Chapitre I: Généralités sur Tabac .....	4
I.1.Historique .....	5
I.2.Définition de Tabagisme .....	6
I.3. Définition de tabac .....	6
I.4. Différents types de tabac .....	6
I.4.1.Tabac traditionnel.....	6
I.4.2. Le tabac artificiel ou commercial .....	7
I.5. Les compositions toxiques du tabac.....	7
I.6.Les additifs .....	7
I.7.Les différentes formes de la consommation du tabac .....	8
I.8. Toxicité des produits à base de tabac artificiel .....	8
I.9.Les maladies liées au tabac artificiel.....	9
I.9.1. Les cancers .....	9
I.9.2. Les maladies respiratoires non cancéreuses .....	10
I.9.3. Les maladies cardiovasculaires .....	10
I.9.4. Effet de tabac artificiel chez la mère et l'enfant .....	11
Chapitre II : les métabolites secondaires : Les alcaloïdes, et les activités biologiques.....	12
I-Les métabolites secondaires.....	13
I.1. Généralité.....	13
I.2. Définition.....	13
I.3. Rôle biologique.....	13
I.5.Différentes classes des métabolites secondaires.....	14

I.5.1. Terpènes.....	14
I.5.2. Composés phénoliques.....	14
I.5.3. Alcaloïdes .....	14
I.5.3.1. Caractérisation des alcaloïdes .....	15
I.5.3.2. Classification des alcaloïdes.....	16
I.5.3.2.1. Alcaloïdes vrais .....	16
I.5.3.4. Distribution et localisation des alcaloïdes.....	17
I.5.3.5. Extraction des alcaloïdes.....	17
I.5.3.6. Dosage des alcaloïdes.....	17
I.5.3.7. Biosynthèse des alcaloïdes .....	18
I.5.3.8. Activité biologique et action pharmacologique des alcaloïdes .....	18
I.6.Composition du tabac .....	19
<input type="checkbox"/> La nicotine ;.....	19
<input type="checkbox"/> Le monoxyde de carbone ; .....	19
<input type="checkbox"/> Les composés irritants ;.....	19
<input type="checkbox"/> Les goudrons ; .....	19
I.6.1. La nicotine .....	20
I.6.1.1. La structure Chimique de la nicotine .....	20
I.6.1.2. Métabolisme de la nicotine .....	21
II- Métabolite secondaire et le stress Oxydatif.....	24
II.1. Le stress Oxydatif.....	24
II.1.1. Introduction .....	24
II.1.2. Définition.....	25
II.1.3. L'origine du stress oxydatif.....	25
II.1.4. Les dérivés actifs de l'oxygène .....	26
II.1.5. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène .....	27
II.1.5.1. Radicaux libres.....	28
II.1.5.2. Espèces réactive de l'oxygène .....	28
III- Les plantes étudiées.....	28
III.1. <i>Nicotiana tabacum</i> .....	28
III.1.1. La culture de <i>Nicotiana tabacum</i> : .....	28
III.1.2. Description .....	29
III.2 <i>Juniperus oxycedrus</i> .....	30

III.2.1. Origine.....	31
III.2.2. Répartition.....	31
III.2.3. Utilisation.....	32
IV -Etudes des activités biologiques .....	33
IV.1. Activité anti-oxydatif.....	33
IV.2. L'activité anticancéreuse .....	34
IV.2.4. L'ADNune cible moléculaire des anticancéreux .....	35
IV.3. Les activités anti-inflammatoires.....	35
IV.5. Les activités antibactériennes .....	37
IV.5.1. Définition .....	38
IV.5.3. Intérêt de Méthode de la diffusion en disque .....	39
Chapitre III : Les techniques d'analyse expérimentales .....	40
I.Introduction .....	41
I.1.Technique chromatographique .....	41
I.1.1. Chromatographie sur couche mince.....	41
I.1.1.1. Définition .....	41
I.1.1.2. Protocole expérimental.....	41
I.2. Technique spectroscopique.....	44
I.2.1.Spectroscopie Ultraviolet (UV) .....	44
I.2.2. La voltampèromètre cyclique .....	44
I.2.3. Spectroscopie Infrarouge (IR).....	46
I. Matériels et méthode .....	49
I.1. Matériels .....	49
I.1.1. Matériels biologiques.....	49
I.1.1.1. Matériel végétal.....	49
I.1.1.2. Les microorganismes utilisés : (Souches microbiennes).....	51
I.1.2.Matériels d'étude au laboratoire .....	52
I.2. Méthodes .....	53
I.2.1 Préparation des extraits .....	53
I.2.1.1 Extraction de l'extrait brut .....	53
I.2.1.2. Détermination du rendement de l'extrait brut .....	53
I.2.1.3. Extraction des alcaloïdes totaux.....	55
I.2.1.4. Screening phytochimique.....	56

I.2.1.5. Caractérisation des extraits.....	58
I.2.1.6. Evaluation des activités biologiques .....	61
I.2.1.6.1. Activité Anti-inflammatoire .....	61
I.2.1.6.2. Test hémolyse .....	62
I.2.1.6.3. Activité anticancéreuse.....	62
I.2.1.6.4. Etude de l'activité anti oxydante Totale.....	63
I.2.1.6.5. Détermination de l'activité antibactérienne.....	64
CHAPITRE II : .....	67
Résultat et discussion.....	67
I- Résultats : .....	68
1-Détermination de rendement d'extraits étudiées : .....	68
2-Résultat des tests phytochimiques : .....	68
3-Caractérisation des extraits obtenues : .....	69
3-1 Caractérisation par CCM : .....	69
3-2 Caractérisation par UV visible : .....	70
3-3 Caractérisation par électrochimie : .....	72
3-4 Caractérisation par IR: .....	73
3-5 Caractérisation par HPLC : .....	75
4- Détermination de la concentration des alcaloïdes : .....	78
4-1 Concentration de la nicotine dans l'extrait préparé par rapport à courbe standard de nicotine : .....	78
4.2 Concentration de l'atropine dans les extraits préparés par rapport au standard l'atropine : .....	80
5- Etude de l'activité biologique de différents extraits: .....	81
5-1 Etude de l'activité antioxydante totale AAT .....	81
5-2 Etude de l'activité anticancéreuse : .....	82
5-3 Etude de l'activité anti inflammatoire (test analgésique) : .....	86
5-3-1-Evaluation de l'activité analgésique des extraits d'alcaloïde totaux .....	86
5-3-2-Evaluation de l'activité analgésique des extraits hydro-éthanolique.....	87
6-Etude de l'activité hémolytique : .....	88
6-1-Evaluation de l'activité hémolytique des extraits hydro-éthanoliques : .....	88
7-Résultat de l'activité anti bactérienne : .....	89
II-Discussion : .....	92

Conclusion et perspectives .....	98
Références bibliographique : .....	101
Annexes : .....	112

# *Introduction générale*

## **Introduction générale**

Dans les 50 prochaines années le nombre de décès dus au tabagisme est estimé à 450 millions de personnes. Les effets de l'épidémie de tabagisme sur la santé des populations dans le monde ne sont plus à démontrer.

En Afrique, au moins 845000 personnes meurent du fait de tabagisme chaque an. La moitié des fumeurs réguliers qui commencent à fumer dès l'adolescence mourront du tabagisme. Si cette tendance continue, le tabagisme sera responsable de la mort de 250 millions d'enfants et d'adolescents dont les majorités sont dans les pays en développement. On sait que dans un grand nombre de pays l'usage du tabac est la principale cause évitable de décès prématuré.

L'Algérie n'échappe pas à ce phénomène, elle constitue un terrain propice à son développement. Elle fait partie des nombreux pays où l'on commence à fumer.

La consommation du tabac est l'une des plus graves menaces qui ayant jamais pesé sur la santé publique mondiale. Elle cause la mort de près de 6 millions de personnes chaque année. Plus de 5 millions d'entre elles sont des consommateurs ou d'anciens consommateurs, et plus de 600 000 des non-fumeurs involontairement exposés à la fumée. Une personne environ meurt toutes les six secondes du fait de ce fléau, ce qui représente un décès d'adulte sur 101. De nos jours, Les effets sur la santé de la consommation du tabac sont nombreux : cancers, maladies respiratoires et cardiovasculaire.

Dans la tradition de notre région plusieurs types de tabac traditionnel sont consommés. En effet, le tabac traditionnel le plus consommé est l'arar(mélange du feuilles de *Nicotiana* avec *Juniperus*), l'utilisation de ce type ne montre pas des effets indésirables sur les consommateurs a longue durés surtout les maladies malignes tel que le cancer, ainsi nos ancêtre utilisent ce type de tabac pour traiter certains maladies.

Notre objectif est de faire étude comparative entre les deux types de cigarettes (tabac artificiel et traditionnel) ainsi que le principe actif des plantes du tabac(*Nicotiana Tabacum*), pour cette raison plusieurs questions se posent afin de mieux comprendre leurs effets sur la santé, la composition phytochimique .

Quelle est le type de tabac traditionnel ou commercial qui contient plus de nicotine ? Quel est le type le plus dangereux et cancérigène ? Quelles sont les composés toxiques dans le tabac qui cause les problèmes de la santé.

Pour réaliser ce travail, nous avons préparé l'extrait brut de ces trois types de tabac ainsi l'extrait des alcaloïdes totaux, ensuite plusieurs méthodes de caractérisation ont été utilisées afin de bien connaître leurs compositions et en fin nous avons testé quelques activités biologiques pour pouvoir comparer les différents types de tabac.

En fin, notre manuscrit est constitué de deux parties : partie bibliographique composée de trois chapitres : 1<sup>er</sup> chapitre Généralités sur Tabac ; les métabolites secondaires : Les alcaloïdes, et les activités biologiques ; Les techniques d'analyse expérimentales.

La deuxième partie expérimentale comporte deux chapitres matériels et méthodes et les résultats obtenus, ensuite une discussion vient expliquer les résultats obtenus. En fin une conclusion générale et les perspectives pour les prochaines études.

*Partie I*

*Synthèse bibliographique*

*Chapitre I*  
*Généralités sur le Tabac*

## I.1.Historique

L'usage du tabac remonte à l'ancienne civilisation américaine et jouait un rôle important dans les rituels religieux. Les anciens Mayas utilisaient la fumée de tabac comme « encens solaire » pour faire pleuvoir pendant les périodes de sécheresse. Quant aux Aztèques, en plus d'être symbolique dans certains rituels, ils le croquaient avec de la chaux pour lui restituer ses propriétés euphorisantes. Ainsi, en 1492, les Amérindiens étaient les premiers et les seuls fumeurs lorsque Christophe Colomb découvrit le Nouveau Monde.

Le mot « tabac » est dérivé du nom indien de la pipe d'origine. Il provient également du tabac espagnol. Le nom a été donné après la découverte de l'Amérique par les Espagnols, qui ont apporté le tabac en Europe. Vingt ans plus tard, Juan Ponce de Leon a introduit le tabac au Portugal, où il était cultivé.

En 1565, Raleigh a introduit l'habitude de fumer en Angleterre. La propagation rapide du tabac à travers le monde fut le résultat d'un commerce, en partie, semble-t-il, des marins de l'époque, qui y ont peut-être trouvé une arme contre l'ennui, la solitude et le mauvais goût de la nourriture sur des navires calmes. L'église a permis l'utilisation du tabac par le clergé, peut-être comme une aide au maintien de la virginité. A-t-on déjà douté de l'effet du tabac sur la qualité érectile ? Le pape Innocent X de 1644 à 1655 aurait interdit l'usage du tabac dans les églises afin de protéger les trésors de peinture. Au 17<sup>e</sup> siècle, le cardinal de Richelieu, constatant qu'il ne pouvait enrayer la propagation du tabac, décida de le taxer... tous les gouvernements depuis lors.

Les cigarettes ont été inventées par des mendiants à Séville, qui ramassaient les extrémités des cigares et coupaient les résidus de tabac en brindilles, qui étaient ensuite roulées dans du papier pour fumer. Des années 1910 aux années 1920, les stratégies industrielles de production et de commercialisation des cigarettes ont assuré une domination progressive du marché du tabac.

Ces dernières années, de nombreux pays ont introduit de nouvelles législations visant à réduire l'usage du tabac. Ces lois comprennent des interdictions de fumer dans les lieux publics, des restrictions sur la publicité et la promotion des produits du tabac et des obligations de mise en garde sanitaire. **(Mohamed , 2006) .**

## I.2. Définition de Tabagisme

L'utilisation de tabac sacré et la consommation de tabac commercial à des fins récréatives, particulièrement la cigarette, n'ont ni les mêmes objectifs ni les mêmes fonctions.

Les peuples des Premières nations utilisaient le tabac à des fins médicinales et rituelles avant leur contact avec les Européens.

Le tabac est offert et brûlé dans le cadre de cérémonies pour établir un lien direct avec le monde spirituel. Lors de l'utilisation traditionnelle du tabac, l'inhalation est minime.

En revanche, la consommation de tabac commercial à des fins récréatives, qui consiste à inhaler la fumée de produits commerciaux à forte concentration en nicotine et en additifs toxiques, est toxicomanogène et nuisible. Les Aînés des Premières nations soutiennent que la consommation de tabac à des fins récréatives dénote un manque de respect envers la tradition.

Lors des cérémonies, l'Assemblée des Premières nations préconise l'utilisation du tabac traditionnel, *Nicotiana tabacum* et non des tabacs commerciaux, tels que les cigarettes. L'utilisation de tabac commercial à des fins rituelles sèmerait la confusion dans l'esprit des enfants et des adolescents (Orisatoki, 2012).

## I.3. Définition de tabac

Est un produit psychoactif fabriqué à partir des feuilles séchées de la plante de tabac commune (*Nicotiana Tabacum*) originaire d'Amérique centrale. Avec la découverte des Amériques, l'usage du tabac s'est largement répandu dans le monde. Sa commercialisation est souvent un monopole d'État et les taxes varient considérablement d'un pays à l'autre. Le tabac est très addictif et sa consommation est responsable de 6 millions de décès par an dans le monde, ainsi que de nombreuses maladies (M, Ahmed, 2001).

## I.4. Différents types de tabac

### I.4.1. Tabac traditionnel

En Algérie et typiquement le sud algérien. Le tabac traditionnel est considéré comme un médicament sacré utilisé comme moyen de guérison et est une partie importante de la culture de nombreux pays. Le tabac traditionnel a de nombreux types, y compris sauvage, le tabac à chiquer et le tabac à priser sec ou humide et pipes, Dans la région d'Oued Souf la préparation du tabac traditionnel est fait par la nicotiana et *Juniperus*. On catégorise généralement le tabac à pipes en deux types distincts : le tabac "naturel", autrement appelé "tabac pur" car non aromatisé, le tabac "aromatisé. Le tabac traditionnel est très différent du tabac commercial.

En revanche, le tabac à chiquer est composé du tabac plus de *Hamada elegans* ils ont utilisé comme un moyen de guérison (anonyme 01, 2022).

#### I.4.2. Le tabac artificiel ou commercial

➤ Le tabac commercial est fabriqué par des entreprises pour une utilisation récréative et habituelle dans des produits comme les cigarettes, les cigarettes électroniques, les cigares. Il contient plus de 7000 substances chimiques, dont beaucoup sont carcinogènes lors de leur combustion (Y.Martinet et al, 2001).

#### I.5. Les compositions toxiques du tabac



Figure 01: Les compositions toxiques du tabac (cigarette)

(Anonyme 02, 2022).

#### I.6. Les additifs

Les dangers du tabac ne résident pas seulement dans les dangers de la nicotine, mais aussi dans les 4 000 constituants chimiques présents dans la fumée. Les additifs rendent la fumée plus douce et moins irritante, ce qui la rend plus facile à inhaler et plus confortable.

Certains additifs augmentent la disponibilité de la nicotine pour les fumeurs. L'acide glycyrrhizique dilate les bronches, facilitant ainsi l'inhalation.

L'acide lévulinique modifie la sensibilité des récepteurs à la nicotine. Selon le fabricant de tabac, les additifs «acquièrent le goût, la texture, l'aspect et l'arôme du tabac ». Par conséquent, les additifs peuvent augmenter la dépendance ! Ils sont considérés comme du marketing chimique car ils améliorent la vente des cigarettes (Chloé, 2013).

### **I.7. Les différentes formes de la consommation du tabac**

Les différentes formes de consommation : (Tounkara,2005). Le tabac est utilisé sous forme manufacturée, les formes non industrielles de consommation du tabac sont rencontrées dans les pays en développement et qui constituent modes de consommation de la production locale. Elles sont difficiles à évaluer car généralement exclues des statistiques. Il s'agit du tabac en vrac pour pipe et des poudres à priser et à chiquer en Afrique et des cigarettes artisanales en Asie du sud-est. Les principaux modes de consommation du tabac correspondent à cinq (5) types courants de produits industriels du tabac qui sont :

- Les cigares ;
- Le tabac à mâcher ;
- Le tabac à priser ;
- Le tabac pour pipe ;
- Les cigarettes ;

### **I.8. Toxicité des produits à base de tabac artificiel**

Pour comprendre le rôle des additifs, il faut d'abord savoir comment fonctionne la cigarette. Le succès durable de l'industrie du tabac découle directement du nature addictif de la nicotine et de la consommation du tabac.

Les industriels du tabac ont reconnu les premiers que la cigarette, qui est commercialisée comme accessoire d'un certain style de vie, est en fait un dispositif d'administration d'une drogue entraînant la dépendance. Il y a pléthore de documents émanant de l'industrie du tabac qui montrent que les produits à base de tabac remplissent essentiellement le rôle de systèmes sophistiqués d'administration de la nicotine, mettant en œuvre une haute technicité.

La fumée est sans aucun doute le meilleur véhicule de la nicotine, et la cigarette le meilleur distributeur de fumée.

- Le goudron se dépose dans les bronches et les poumons et provoque le cancer.
- Le monoxyde de carbone empêche l'oxygène de se fixer dans le sang et favorise les maladies cardiovasculaires.

- L'ammoniac ajouté par les fabricants de cigarettes pour faciliter l'absorption de la nicotine et maintenir ainsi la dépendance des fumeurs.
- Les substances et additifs contenus dans la cigarette sont extrêmement toxiques. En fumant vous absorbez environ 4'500 substances naturellement contenues dans le tabac.
- la nicotine (qui engendre une dépendance), le monoxyde de carbone (dangereux car il empêche l'oxygène de se fixer dans le sang), l'arsenic et les cyanides (composés de cyanure et d'hydrogène).

Les particules et les gaz de la fumée de tabac dans laquelle est transportée la nicotine comprennent des milliers de substances chimiques dont beaucoup sont toxiques ou cancérigènes. Alors que c'est la nicotine qui amène les gens à fumer, ce sont d'autres substances qui sont à l'origine de la plupart des dégâts sur la santé. Ces autres substances sont souvent regroupées sous le terme de « goudrons », et elles confèrent l'arôme et d'autres sensations gustatives. Ces goudrons, ainsi que les gaz qui résultent de la combustion, comme le monoxyde de carbone, provoquent des cancers, des maladies coronaires et respiratoires, et bien d'autres troubles. La législation a tenté de réduire l'exposition aux goudrons en exigeant une diminution des taux de goudron(**Philip, 1972**).

## **I.9. Les maladies liées au tabac artificiel**

### **I.9.1. Les cancers**

Le tabagisme est responsable de plus de 30 % de tous les décès par cancer. Le cancer du poumon primitif est sans aucun doute la maladie ayant la relation causale la plus forte avec le tabagisme, avec jusqu'à 85 % des cancers du poumon associés au tabagisme. Globalement, les fumeurs ont un risque relatif de développer un cancer du poumon de 10.

Le risque augmente avec le nombre de cigarettes fumées par jour, en particulier la durée du tabagisme. L'âge d'apparition, en particulier avant 15 ans, est également important. Le risque augmente avec la teneur en goudron, l'absence de filtre, l'inhalation et l'utilisation de tabac brun.

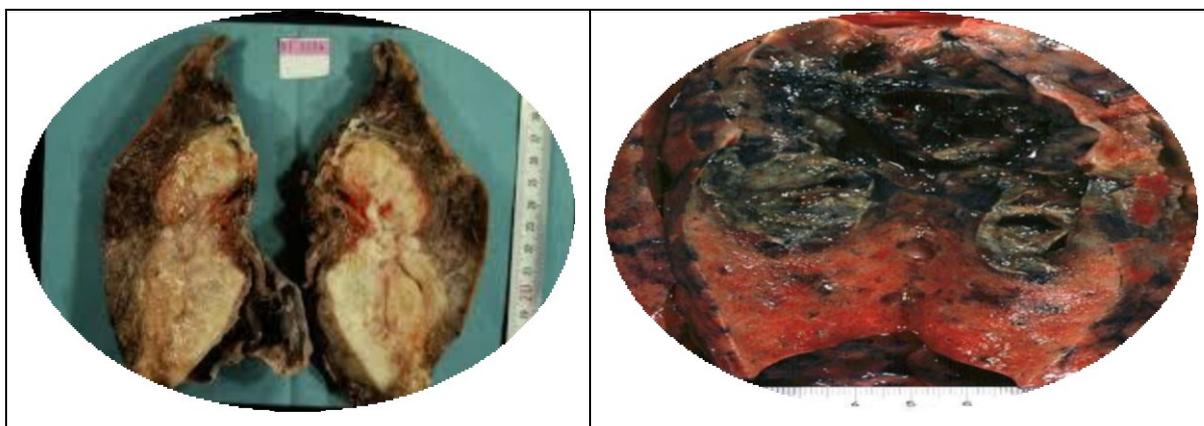
Après l'arrêt du tabac, il a diminué de façon exponentielle après une brève augmentation paradoxale, revenant à risque dans les populations non fumeuses après 10 à 15 ans. Parmi les cancers nous avons : ORL, Œsophage, Vessie, Rein, Pancréas, Col de l'utérus, Bouche(**Sylla,2009**).



**Figure 02:**Aspect endoscopique d'un cancer du poumon (M.Ahmed ,2001)

### I.9.2. Les maladies respiratoires non cancéreuses

Le tabac commercial une responsabilité majeure dans la survenue des BPCO prédominant surtout les autres facteurs étiologiques. Le déclin du VEMS chez le fumeur est prouvé, de même que son ralentissement à l'arrêt du tabac. Environ 10 à 15 % des fumeurs développent une obstruction clinique bronchique. L'histiocytome X est une maladie ne se développant pratiquement que chez les grands fumeurs(Sylla ,2009).



**Figure 03:**Aspect macroscopique du poumon d'un fumeur en post mortem(M.Ahmed ,2001)

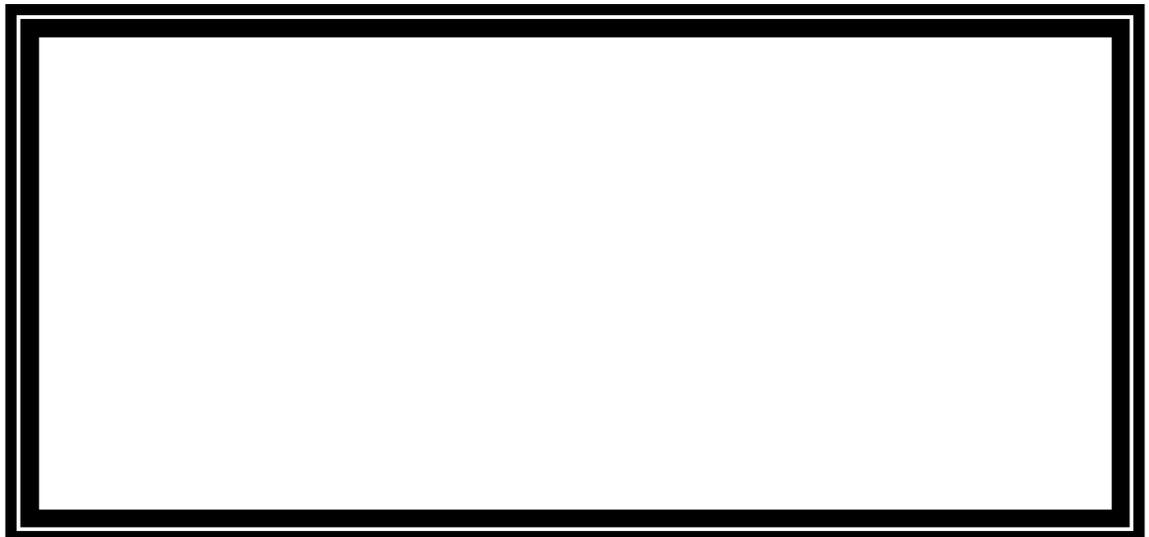
### I.9.3. Les maladies cardiovasculaires

Au niveau cardiovasculaire, le tabac commercial est l'un des facteurs de risque de développement de l'hypertension, des maladies coronariennes et des maladies artérielles chroniques des membres inférieurs.

La réduction de la teneur en goudron de cigarette n'a pas modifié l'incidence de l'infarctus du myocarde chez les fumeurs. Le risque de maladie coronarienne chez le fumeur de plus de 20 cigarettes par jour est multiplié par trois par rapport au non-fumeur (MSS, 2007).

#### I.9.4. Effet de tabac artificiel chez la mère et l'enfant

Le tabagisme est responsable d'une diminution de la fertilité, d'une augmentation des avortements spontanés et d'une augmentation significative de la mortalité périnatale et néonatale. Les projections jusqu'en 2025 prévoient 165 000 décès prématurés par an dus au tabac, soit un doublement du nombre de décès chez les hommes et une multiplication par dix chez les femmes par rapport aux conditions actuelles. Le poids moyen à la naissance est inférieur d'environ 150 à 250 grammes. La mort subite du nourrisson est plus fréquente lorsque l'enfant est exposé au tabac de sa mère. La leucémie et le cancer du cerveau sont plus fréquents chez les enfants exposés in utero. Chez la femme, le tabagisme associé à la prise de pilule multiplie par 20 le risque d'AVC et l'association doit être fortement déconseillée.(Toukara, 2005).



**Figure 04** : Les maladies liées au tabac artificiel(M.Ahmed ,2001)

*Chapitre II : les métabolites secondaires :  
Les alcaloïdes,  
et les activités biologiques*

## **I-Les métabolites secondaires**

### **I.1. Généralité**

Au lieu de métabolites primaires, les plantes possèdent des métabolites dits "secondaires", comme les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés varient selon les espèces, même si leur rôle reste mal connu (**Krief, 2003**). Ces métabolites secondaires interviennent dans la structure des plantes (lignines et tannins) (**Gobbiet *al*, 2014**).

Et sont aussi se trouvent dans toutes les cellules végétales et nécessaire à leur croissance et à leur développement (**Raven et *al*, 2000**). Aussi n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (**Guignard, 1996**).

### **I.2. Définition**

Le terme « métabolite secondaire », qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes, ils sont responsables des fonctions périphériques indirectement essentielles à la vie des plantes (**Nesba et *al*. 2018**) .

### **I.3. Rôle biologique**

Les métabolites secondaires sont impliqués dans l'adaptation des plantes à leur environnement et dans la régulation de la symbiose et d'autres interactions plante-animal. Ils interviennent donc de manière très efficace dans la tolérance des plantes aux différents stress. Action anti-herbivore, inhibe l'attaque des pathogènes bactériens et fongiques, se nourrit d'insectes, résiste à la sécheresse et aux rayons ultraviolets.

Ils peuvent également attirer des agents responsables de la pollinisation ou de la dissémination des fruits ; mais ils peuvent être des anti-nutriments. De nombreux métabolites secondaires sont toxiques et sont alors stockés dans des vésicules ou vacuoles spécifiques (**Mansour, 2015**).

### **I.4. Distribution et localisation**

Les métabolites secondaires (SM) sont présents dans toutes les plantes supérieures et ont une distribution limitée dans les organismes végétaux (**Hartmann, 2007**). Celles-ci sont souvent caractérisées par de faibles concentrations dans les tissus végétaux (souvent quelques

pour cent du carbone total si la lignine n'est pas incluse dans cette catégorie) (Nesba et al, 2018).

Les métabolites secondaires sont biosynthétisés à partir des métabolites primaires (Peeking et al ,1987) et sont généralement produits par trois voies de biosynthèse : la voie du shikimate, la voie du mévalonate et la voie du pyruvate (Aref et al, 2015).

### **I.5. Différentes classes des métabolites secondaires**

#### **I.5.1. Terpènes**

Toutes les terpènes et les stéroïdes possèdent un point commun qui formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unité penta carbonée ramifiée dérivée du 2-méthylebutadiène (l'isoprène). Les terpénoïdes et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires, comme les dérivés des acides gras (Bruneton,1993).

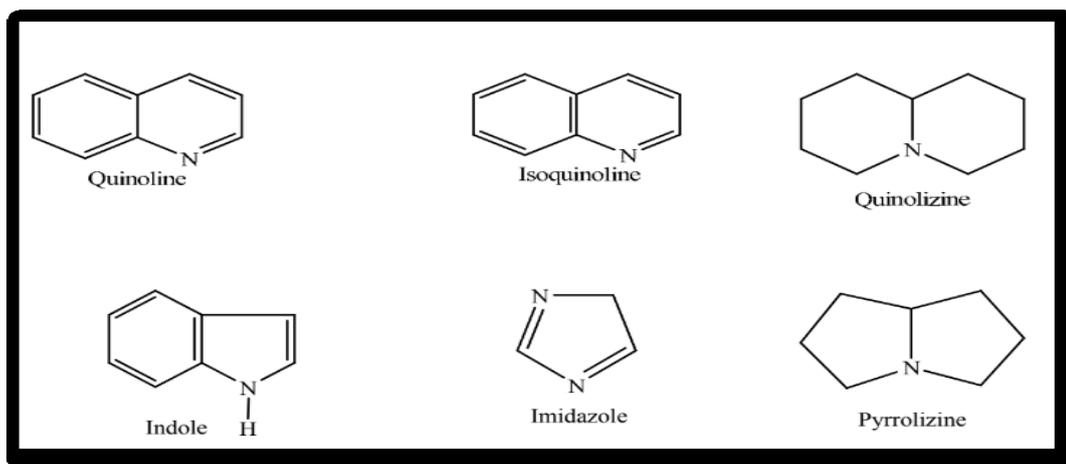
#### **I.5.2. Composés phénoliques**

L'appellation polyphénols ou composés phénoliques, désigne un vaste ensemble de substances qui présentent toutes un point commun, la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) . A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiés. Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000(Harbone, 1993).

#### **I.5.3. Alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des substances organiques naturelles dont les propriétés rappellent celles des alcalis ; Ces substances azotées se trouvent le plus souvent dans les sources végétales. Dans le règne animal, il n'a qu'une poignée de représentants. On les trouve le plus souvent sous forme de sels (citrate, sulfates, nitrates, tartrates...) ou associés aux tanins des végétaux.

Ce sont des composés trouvés principalement dans les angiospermes dicotylédones. Ils sont situés dans les tissus périphériques tels que l'écorce des tiges et des racines, le tégument... (Bruneton, 1999). Ils se voient conférer des propriétés pharmacodynamiques importantes à faibles doses et sont reproductibles par synthèse. Les alcaloïdes, dont le poids moléculaire varie de 100 à 900, sont la narcotine de l'opium. D'un point de vue chimique, ils sont classés selon la nature du noyau hétérocyclique présent dans la molécule (Woolley ,2001) (Figure 09).



**Figure 05 :** Classification des alcaloïdes selon leur noyau hétérocyclique (Woolley,2001).

Les alcaloïdes non oxygénés sont liquides à température ambiante, volatils et peuvent être cultivés à la vapeur d'eau, comme la taroline, la nicotine, etc. En revanche, les alcaloïdes oxygénés sont des solides cristallisables et parfois colorés : berbérine, sanguinarine, etc, Certains alcaloïdes ont la capacité de tourner.

Ils ont des propriétés salifiâtes et amères. Les alcaloïdes alcalins sont généralement insolubles ou peu solubles dans l'eau et solubles dans des solvants organiques non polaires ou légèrement polaires. Leurs sels sont généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués (Bruneton ,1999).

#### **I.5.3.1. Caractérisation des alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont caractérisés par plusieurs réactions de précipitation qui diffèrent par leur composition.

Ajouter quelques gouttes d'eau distillée acidifiée avec de l'acide sulfurique 0,5N ( $H_2SO_4$ ) à une pincée de farine végétale. L'extrait obtenu après filtration de la solution est reparti sur des tubes à essai puis soumis aux réactifs suivants

- ❖ Réactif de Bouchardat (iodo - ioduré) : Précipité brun.
- ❖ Réactif de Valser Mayer (tétraiodomercurate de potassium): Précipité blanc jaunâtre.
- ❖ Réactif de Dragendorff (tétraiodobismuthate de potassium) : Précipité orangé à rouge.
- ❖ Réactif de Bertrand (silico-tungstique ou phospho-tungstique) : Précipité blanc jaunâtre (Mohamed,2010).

### I.5.3.2. Classification des alcaloïdes

La classification des alcaloïdes est basée sur plusieurs critères, à savoir l'origine biologique, la voie de biosynthèse, la structure et les propriétés spectroscopiques spectrométriques (Hesse, 2002). Une autre classification a été rapportée par (Bennett et al, 1994) où les alcaloïdes ont été divisés en trois grandes classes en fonction des précurseurs et la structure finale :

#### I.5.3.2.1. Alcaloïdes vrais

Ils sont des dérivés des acide aminés, basique et contiennent l'azote dans l'hétérocycle, par exemple la nicotine t l'atropine.

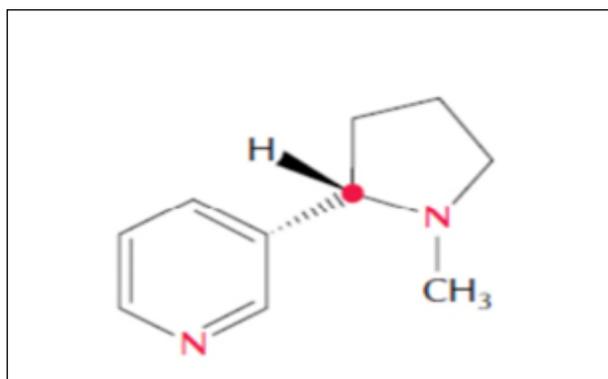


Figure 06: Structure chimique la nicotine (Rodney et al ,2000).

#### I.5.3.2.2. Pseudo-alcaloïdes

Ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, ils sont basiques mais ne sont pas dérivés des acides aminés, par exemple caféine et solanidine.

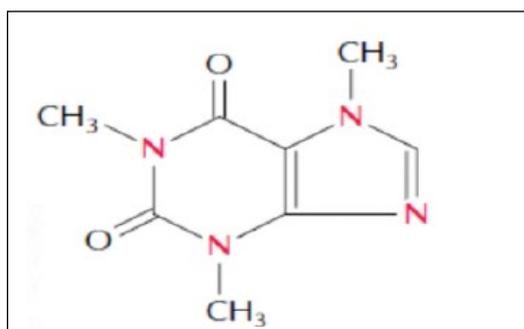


Figure 07: Structure chimique de la caféine et Atropine (Rodney et al,2000).

### I.5.3.2.3. Proto-alcaloïdes

Sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés.

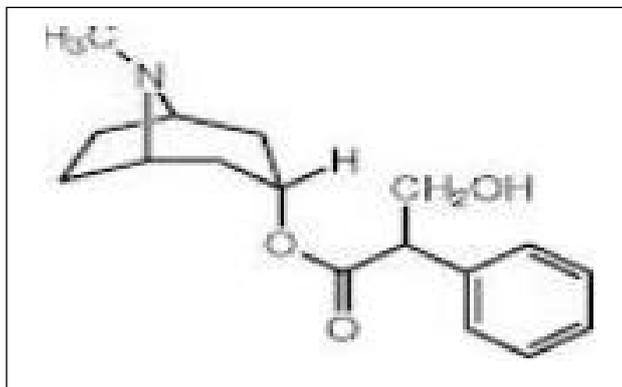


Figure 08 : Structure chimique d'acides aminés. (Rodney et *al*,2000).

### I.5.3.4. Distribution et localisation des alcaloïdes

Chez les végétaux, les alcaloïdes sont des composés essentiellement présents chez les Angiospermes, ils sont exceptionnels chez les bactéries (pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*), et assez rares chez les champignons (ergolines des *Claviceps*). Ils existent également chez les animaux (Breneton,1999).

### I.5.3.5. Extraction des alcaloïdes

L'extraction est basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes en milieu acide et en milieu alcalin (solubilité des sels et des bases dans l'eau et les solvants organiques) ; ils vont ainsi pouvoir être séparés des autres constituants du végétal qui possèdent la même solubilité quel que soit le pH.

Il existe trois types d'extraction des alcaloïdes :

- ↳ Extraction par les solvants organiques non polaires.
- ↳ Extraction par les solvants organiques polaires.
- ↳ Extraction par l'eau acide (Guessoumi,2015).

### I.5.3.6. Dosage des alcaloïdes

#### ➤ Dosage pondéral

Il consiste à peser le résidu d'alcaloïdes totaux. Ex : Cocaïne de la Coca.

➤ **Dosage volumétrique**

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

➤ **Dosage colorimétrique et spectro -photométrique**

Certains alcaloïdes peuvent donner des réactions colorées plus ou moins spécifiques pouvant être évaluées au spectrophotomètre. **Ex** : alcaloïdes du Quinquina rouge.

➤ **Autres méthodes**

Elles sont diverses : Densitométrie après chromatographie sur couche mince semi-quantitative, CPG, HPLC(**Guessoumi,2015**).

**I.5.3.7. Biosynthèse des alcaloïdes**

La biosynthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, la basicité de la plupart de ces alcaloïdes impose leur compartimentation dans les vacuoles cellulaires.

Leur synthèse s'effectuent le plus souvent au niveau de sites précis, ils sont ensuite transportés dans leurs sites de stockage (**Rios et al, 2005**).

L'ornithine et la lysine, acides aminés diamines, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, acides aminés aromatiques, sont le point de départ de la synthèse de nombreux alcaloïdes. La première étape consiste dans tous les cas à la décarboxylation des acides aminés par des décarboxylases spécifiques. La tyrosine et la phénylalanine, composés à l'origine du noyau aromatique sont les précurseurs de l'important groupe des alcaloïdes isoquinoléiques (**Breneton, 1999**).

**I.5.3.8. Activité biologique et action pharmacologique des alcaloïdes**

Ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité biologique des alcaloïdes, qui forcément dépend de leur composition chimique en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer.

Les alcaloïdes sont des substances très intéressantes par leurs activités

Pharmacologiques des plus variées :

- ❖ Sur le système nerveux central comme anti-dépresseurs : Codéine, Morphine...
- ❖ Sur le système nerveux autonome excitant du sympathique : Hordéine, Ephédrine...
- ❖ Sur les vaisseaux : vasodilatateur hypotenseur (éphédrine) ou vasoconstricteur hypertenseur (résérpine).

❖ Sur la circulation sanguine : vincamine.

La plupart de ces substances sont des phytotoxiques très actifs avec des effets spécifiques. La médecine les utilise le plus souvent à l'état pur. A noter que les alcaloïdes à faible dose agissent comme :

- Anesthésiques locaux (cocaïne)
- Antalgiques (morphine)
- Antibiotiques
- Antiparasitaires
- Antipaludéens (quinine)
- D'anti-tumoraux (vinblastine)
- D'amoebicides (émétine)

Ces différentes activités conduisent à une utilisation importante des drogues à alcaloïdes. Si certaines ne sont employées que sous la forme de préparations galéniques (Belladone, Stramoine), beaucoup ne sont que des matières premières pour l'extraction industrielle d'alcaloïdes qu'elles renferment : Morphine de la paille de Pavot. Une partie des alcaloïdes extraits peuvent être transformés : l'essentiel de la codéine est obtenu par méthylation de la morphine (Hémisynthèse).

La plupart du temps, les alcaloïdes agissent à faibles doses, mais peuvent posséder même à très faibles doses, une forte toxicité (Ex. Aconitine : Dose unitaire 0,2mg ; dose mortelle 1mg) (**Bourgouet *al*, 2016**).

### **I.6.Composition du tabac**

La fumée de cigarette contient environ 4000 substances différentes, dont 40 sont cancérogènes. Les 4 principaux composants sont :

- La nicotine ;
- Le monoxyde de carbone ;
- Les composés irritants ;
- Les goudrons ;

La fumée du tabac est caractérisée par trois courants :

- Le courant primaire, inhalé par le fumeur (fumée principale du tabac).

- Le courant secondaire correspond à la fumée se dégageant d'une cigarette se consumant librement et résulte de la combustion complète ou incomplète du tabac. Il est responsable de l'exposition environnementale (fumée secondaire du tabac).

- Le courant tertiaire correspond à la fumée exhalée par le fumeur et aux particules de fumée du tabac qui restent en suspension. Lorsque la cigarette est allumée, la combustion entraîne la formation de nombreux composés toxiques comme les goudrons, divers gaz toxiques (monoxyde de carbone, oxyde d'azote, acide cyanhydrique, ammoniac), des métaux lourds (cadmium, plomb, chrome, mercure), ainsi que des substances irritantes (Clere, 2011).

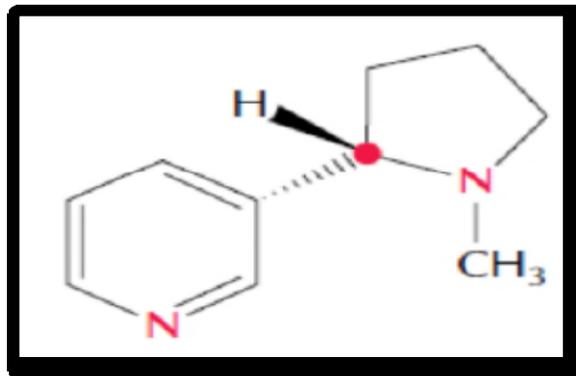
### **I.6.1. La nicotine**

La nicotine appartient à la famille des nicotiniques et il est extraite de la plante de tabac. Sa plus grande utilisation est dans les produits du tabac, les cigarettes, le tabac à chiquer, le tabac à priser, les dispositifs électroniques de pulvérisation (cigarettes électroniques) et les chauffe-tabac. La nicotine est interdite en Europe en tant que pesticide et utilisée dans les programmes de sevrage tabagique depuis 2008(Bingham ,2012).

#### **I.6.1.1. La structure Chimique de la nicotine**

Sa synthèse chimique est possible mais plus compliquée car elle fournit un mélange racémique des deux énantiomères dont l'un seulement, à savoir le lévogyre, est pharmacologiquement actif dans les feuilles de tabac par contre, on ne retrouve que le composé lévogyre.

✚ Formule Chimique de la nicotine :  $C_{10}H_{14}N_2$



**Figure 09** :Structure Chimique de la nicotine (Rodney *et al*, 2000).

### **I.6.1.2. Métabolisme de la nicotine**

#### **A. Absorption**

L'absorption de la nicotine à travers les membranes biologiques dépend du pH : en milieu acide, la nicotine est présente sous forme ionisée et ne passe pas facilement les membranes.

Par voie orale, sa biodisponibilité est incomplète (de 20 à 45 %, pour le tartrate et bitartrate de nicotine) en raison d'un effet de premier passage. Après ingestion, le pic de concentration sanguine est atteint entre 30 minutes et 1 heure. L'importance ou la vitesse d'absorption varient considérablement selon les individus.

Par voie cutanée, la nicotine est bien absorbée : dans une étude sur 12 volontaires, l'absorption moyenne à partir d'un patch transdermique est de 14 %.

Par voie respiratoire, 9960 à 80 % de la nicotine est absorbée. Certains auteurs ont considéré que fumer une cigarette entraînerait une absorption d'environ 2 mg de nicotine (équivalent à une concentration plasmatique de 0,03 mg/L(**anonyme 03 ,2009**)).

#### **B. Distribution**

Après absorption, environ 5 % de la nicotine se retrouvent liés aux protéines plasmatiques; compte tenu de la demi-vie d'élimination très rapide (environ 2 heures mais grande variabilité inter-individuelle), aucune accumulation de la nicotine n'est attendue.

L'affinité de la nicotine est la plus élevée dans le foie, les reins, la rate, les poumons, et est faible dans le tissu adipeux. La nicotine se lie également aux tissus du cerveau avec une affinité élevée (liaison aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine). La nicotine est également retrouvée dans le suc gastrique et la salive, ainsi que dans le lait maternel ; elle traverse la barrière placentaire et est retrouvée dans le sérum fœtal ainsi que dans le liquide amniotique, dans des concentrations légèrement supérieures à celles du sérum maternel(**Benowitz et al, 2009**).

#### **C. Métabolisation**

85 à 90 % de la nicotine sont métabolisés avant excrétion. Six métabolites primaires de la nicotine ont été identifiés, les 2 principaux étant la cotinine et la nicotine N-oxyde.

La cotinine est formée par oxydation hépatique de la nicotine par des cytochromes P450 (CYP 2A6, principalement), correspondant à la voie de détoxification majeure. Soixante-dix à 80 % de la nicotine sont métabolisés en cotinine, qui est ensuite hydroxylée en trans-3'-hydroxycotinine (métabolite majeur de la cotinine) ; la cotinine N-oxyde et la 5'-hydroxycotinine ont également été identifiées comme métabolites de la cotinine dans l'urine humaine.

La cotinine inchangée représente 10 à 15 % de la nicotine et des métabolites totaux retrouvés dans l'urine (Benowitz *et al*, 2009).

#### **D.Élimination**

La nicotine, la cotinine et les autres métabolites sont principalement excrétés via l'urine. L'excrétion de la nicotine inchangée (5 à 10 %) dépend du taux de filtration glomérulaire et de la sécrétion tubulaire, avec une réabsorption possible en fonction du pH urinaire.

La demi-vie d'élimination urinaire de la nicotine est d'environ 2 heures, mais présente une grande variabilité inter-individuelle (1 à 3 heures). Par exemple, la clairance semble plus élevée chez la femme que chez l'homme. De la même façon, il a été montré qu'une courte abstinence chez les fumeurs était associée à une augmentation de la clairance.

Plusieurs facteurs influencent la toxicocinétique de la nicotine, parmi lesquels : l'âge, le sexe, le régime alimentaire, les traitements médicaux (Benowitz *et al*, 2009).

#### **E. Mode d'action dans l'organisme**

La nicotine stimule les récepteurs de l'acétylcholine dits de type nicotinique. Elle imite l'action de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques nicotiniques des systèmes nerveux central et périphérique. L'effet éveillant serait due à l'action de la nicotine sur le locus coeruleus, un noyau impliqué dans le contrôle de l'éveil. L'effet coupe-faim serait due à l'action de la nicotine sur les centres de la faim (hypothalamus).

Comme toutes les substances psychoactives induisant une dépendance, elle a une action sur le système mésolimbique. Au niveau périphérique, la nicotine stimule le système neurovégétatif et a donc un effet sur les fonctions respiratoires, digestives, circulatoires. La nicotine augmente en particulier la pression artérielle et accélère le rythme cardiaque en stimulant les glandes surrénales. La durée courte de l'effet de la nicotine s'expliquerait par la désensibilisation rapide des récepteurs nicotiniques (Hammond, 2022).

### ✓ La pharmacocinétique de la nicotine

La nicotine est absorbée à travers la peau, les alvéoles pulmonaires et le tractus gastro-intestinal. Lors de l'inhalation de la fumée de cigarette, la nicotine diffuse rapidement des alvéoles pulmonaires aux capillaires alvéolaires et rejoint la circulation artérielle. En moins de 10 secondes, elle parvient au cerveau pour se fixer sur les récepteurs nicotiques. Les fumeurs contrôlent individuellement la quantité de substances absorbées de la fumée du tabac en faisant varier le volume, la fréquence des bouffées et la profondeur de l'inhalation. La nicotine qui arrive rapidement au cerveau est aussi très vite métabolisée et éliminée avec une demi-vie de 2 heures (Faure S, 2014). Une partie de la nicotine est ingérée et se trouve faiblement absorbée au niveau gastrique. La nicotine est éliminée de l'organisme progressivement par deux voies : directement dans les urines, ou par destruction métabolique par le foie (Hukkanen, 2005).

### ✓ La pharmacodynamie de la nicotine

La nicotine exerce ses effets par l'activation des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (R-AchN), présents au niveau du système nerveux central (SNC), au niveau de la médullosurrénale et ganglion lymphatique ainsi que la jonction neuromusculaire. Ces récepteurs ont aussi été identifiés au niveau des kératinocytes, épithélium bronchique, et sur les cellules induisant l'inflammation. Ce sont des canaux ioniques constitués de 5 sous unités protéiques transmembranaires. La nicotine est un agoniste cholinergique, et sa fixation sur ces récepteurs entraîne, par changement de conformation, son ouverture. Cette ouverture permet l'entrée d'ions sodium et une dépolarisation membranaire. Les récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  sont tenus pour responsable de la majorité des effets centraux de la nicotine (Berlin, 2017).

#### **I.6.4. Les effets centraux de la nicotine**

Les R-AchN sont présents dans plusieurs régions du cerveau (noyau accumbens, cortex préfrontal, le cervelet) et ceux-ci se trouvent aussi bien sur les neurones noradrénergiques, dopaminergiques, sérotoninergiques que GABA ou glutamatergiques. La plupart des effets positifs relatés à propos de la nicotine : amélioration de l'attention, des performances cognitives, de l'humeur ... sont dus à la stimulation de différents systèmes effecteurs.

La sensation de plaisir a été reliée à la stimulation de la libération de dopamine, l'éveil à la stimulation des systèmes noradrénergiques et cholinergique, la suppression de

l'appétit et la régulation de l'humeur aux systèmes sérotoninergiques et noradrénergiques, et l'effet sur la mémoire au système cholinergique, mais aussi par voie indirecte : l'amélioration de l'humeur. En agissant sur l'ensemble de ces systèmes, la nicotine stimule le circuit cérébral de la récompense (Berlin,2017).

#### ✓ Les effets périphériques de la nicotine

La nicotine exerce des effets au niveau musculaire et endocrinien, elle possède un effet myorelaxant sur le muscle squelettique, elle induit la sécrétion de nombreuses hormones (ACTH, prolactine, cortisol,  $\beta$ -endorphine). Elle régule le poids corporel en augmentant les dépenses énergétiques, en modifiant le métabolisme lipidique et en induisant la production de leptine par les adipocytes. Sur le tractus gastro-intestinal, la nicotine relâche le tonus musculaire gastrique et ralentit la vidange gastrique. Elle favorise les reflux gastro-oesophagiens et duodéno-gastriques. Elle aggrave le risque d'ulcères. Sur le plan cardiovasculaire, elle augmente le débit, la fréquence cardiaque et la pression artérielle. Cependant, à l'inverse d'une administration aiguë, l'exposition chronique ne serait pas associée à des troubles cardiovasculaires en raison d'un phénomène de tolérance (Clere,2011).

#### **B. Les autres composants**

Les effets toxiques du tabagisme chronique sur l'organisme sont liés principalement au monoxyde de carbone, aux composés irritants de la fumée, aux composés cancérigènes et à la nicotine (HAS, 2015).

- Le monoxyde de carbone ;
- Les substances cancérigènes ;
- Les métaux lourds ;
- Les substances irritantes ;
- Les additifs;

## **II- Métabolite secondaire et le stress Oxydatif**

### **II.1.Le stress Oxydatif**

#### **II.1.1. Introduction**

L'intérêt pour les antioxydants naturels et leurs propriétés thérapeutiques a considérablement augmenté ces dernières années. Diverses études scientifiques spécialisées

ont été menées pour extraire, identifier et quantifier ces composés de plusieurs substances naturelles plantes médicinales et produits agricoles (D.Huang et al,2005).

### II.1.2. Définition

Le stress oxydatif serait défini comme un déséquilibre entre la formation d'espèces réactives de l'oxygène aux propriétés pro-oxydantes et la régulation de leur production d'antioxydants en faveur des premières (Halliwell,1993).

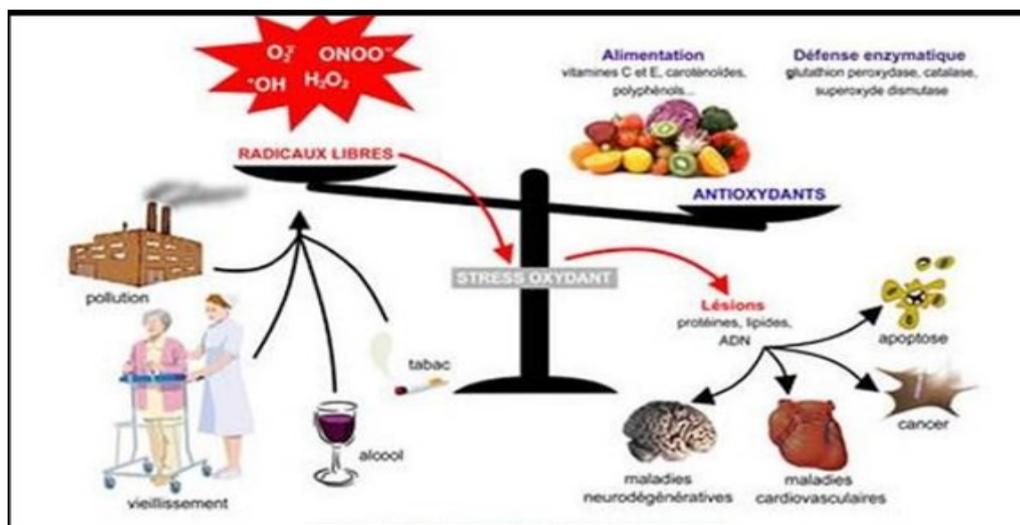


Figure 10 :La balance pro-oxydante et anti-oxydatif

(Bouhamed et al,2019).

Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente selon :

- Excès des espèces réactives d'O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ou Cl<sub>2</sub>.
- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes).
- Mécanismes de réparation insuffisants (Favier, 2003).

### II.1.3. L'origine du stress oxydatif

On peut résumer l'origine du stress oxydant par multiples éléments :

- Intoxications aux métaux lourds (mercure, plomb, cadmium).
- Irradiations (UV, rayons X...).
- Phénomènes d'ischémies/reperfusion (thromboses, exercice).
- Carences nutritionnelles (vitamines, oligo-éléments).

- Anomalies génétiques (mauvais codage pour une protéine) (Pincemail et al, 2003).

#### II.1.4. Les dérivés actifs de l'oxygène

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe (Dean, 1997). Cette caractéristique lui confère une réactivité importante : les radicaux libres réagissent avec des molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (Baril, 2007).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire, elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie (Valko et al, 2007).

Les ERO sont majoritairement produits au sein de 2 sites cellulaires : d'une part la mitochondrie et d'autre part la membrane plasmique (Kehrer, 1993).

Tableau 01 : Les principales espèces réactives de l'oxygène (Ceretta, 2012).

Espèces réactives	Réaction de formation	Propriétés
<b>L'Anion superoxyde (<math>O_2^{\cdot-}</math>)</b>	Formé par la réduction mono électrique de l'oxygène : addition d'un seul électron $O_2 + 1e^- \rightleftharpoons O_2^{\cdot-}$	C'est le radical le moins réactif mais le précurseur des autres ERO
<b>Le peroxyde d'hydrogène (<math>H_2O_2</math>)</b>	Produit à partir de l'anion superoxyde, réaction catalysée par la superoxyde dismutase $SOD, 2H^+ \rightleftharpoons O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$	La majeure partie de la toxicité de l'oxygène provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ )
<b>Le radical hydroxyle (<math>OH^\cdot</math>)</b>	Formé par la réaction de Fenton à partir de $H_2O_2$ en présence de métaux de transition : l'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène (1997). $H_2O_2 + Fe$	Le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) est le radical le plus avide d'électron et le plus dangereux pour l'organisme
	Le NO est formé à partir de l'un	

<p><b>Le monoxyde de d'azote (NO)</b></p>	<p>des deux atomes d'azote terminal du groupement d'une part, et de l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) d'autre part, et de l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) d'autre part en présence de cofacteur: NADH,H<sup>+</sup> réaction catalysé par les NO synthase (NOS) .</p>	<p>Le NO est un radical libre qui est surtout réputé pour ses propriétés physiologiques (agit sur le tonus vasculaire).</p>
<p><b>Le peroxydinitrite (ONOO<sup>o</sup>)</b></p>	<p>En l'absence d'une quantité suffisant de cofacteurs ou de substrat (arginine), les NOS Produisent de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>o</sup>) plutôt que du NO• L'O<sub>2</sub><sup>o</sup> Produit lie le NO• pour former du peroxydinitrite .</p>	<p>Très réactif et sans doute responsable d'un stress oxydant, il engendre des Oxydations irréversibles et des nitration diverses (surtouts des résidus tyrosines) .</p>

### II.1.5. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides).

- **L'oxydation des acides nucléiques** susceptibles d'entraîner des modifications des bases azotées, des fragmentations de l'ADN, des ruptures de brins ou à des pontages entre des bases altérant ainsi l'expression génétique (Cooke et al, 2003).

-**La peroxydation des lipides** surtout des acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont facilement oxydables, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane cellulaire, altérant de ce fait ses fonctions d'échanges, de barrières et d'informations (Koechlin et al, 2006).

-**L'oxydation des protéines**, Il s'ensuit une fragmentation de la protéine, une oxydation des chaînes latérales des acides aminés ou une formation de liaisons croisées entre deux protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées.

-L'oxydation des glucides, générant ainsi des intermédiaires réactifs. Les dommages se propagent via l'attaque des radicaux libres formés sur d'autres molécules. C'est toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée (Davies, 2003).

#### II.1.5.1. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des particules chimique (molécules ou atomes) ayant un électron non apparié dans leur périphérie. Cet électron cherchera à se lier avec un autre électron, en s'arrachant à une autre molécule qui devient alors déséquilibrée donc instable. Un tel mécanisme peut enclencher une réaction en chaîne conduisant à la dégradation des molécules et à leur désintégration en molécules plus petites (Morelle et al, 2003).

#### II.1.5.2. Espèces réactive de l'oxygène

L'appellation "espèces réactives de l'oxygène" (ERO) se rapporte aux radicaux libres de l'oxygène (radicaux primaires) (Novelli, 1997) :

Tableau 02 : Espèces réactives à l'oxygène primaires et secondaires (Novelli, 1997).

ROS pri maire	ROS secondaire
Radical superoxyde ( $O_2 \bullet-$ )	Des radicaux alkyle ( $R\bullet$ )
Radical hydroxyle ( $OH\bullet$ )	Alkoxyde ( $RO\bullet$ )
Monoxyde d'azote ( $NO\bullet$ )	Alkyle peroxyde ( $ROO\bullet$ )

### III- Les plantes étudiées

#### III.1. *Nicotiana tabacum*

##### III.1.1. La culture de *Nicotiana tabacum* :

Le tabac (*N. tabacum*, tabac, figure 13) fait partie de la famille des solanacées, au même titre que la tomate (*Solanum lycopersicum*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) ou le poivron (*Capsicum annuum*). Originaire d'Amérique centrale et du Sud, il est cultivé pour ses feuilles, dont la taille varie de 30 à 60 cm, et se consomme sous diverses formes.

Après séchage, ces feuilles sont découpées en fines lamelles appelées scaferlatis, qui peuvent être utilisées dans des compositions pour cigarettes ou cigares. Le tabac peut également être mâché ou consommé sous forme de chewing-gum. Outre sa valeur agronomique, le tabac est une plante modèle pour la communauté scientifique, notamment en

raison de sa facilité de transformation génétique et de son rendement foliaire élevé. La culture du tabac représente un intérêt économique majeur dans un marché mondial.

Elle est pratiquée dans des centaines de pays, les trois principaux étant la Chine, le Brésil et l'Inde. Dans ces pays, le tabac est une importante source de revenus pour les producteurs et leurs gouvernements. Des progrès considérables ont été réalisés sur cette culture, permettant au fil des années d'augmenter significativement le rendement et la qualité des feuilles récoltées. Cependant, la législation de certains pays, en particulier dans les pays développés, exerce une forte pression sur l'industrie et souligne la nécessité pour les consommateurs de se procurer des produits moins nocifs (**Layten et al, 1999**).

### **III.1.2. Description**

Le genre « Tabac » (nom créé en 1565 en l'honneur de Jean Nicot) de la famille des Solanacées (qui comprend de nombreuses autres plantes d'importance agricole : pommes de terre, tomates, aubergines, poivrons, etc.), comprenant tous les tabacs cultivés.

Le genre a été décrit pour la première fois par Tournefort en 1719 : Plantes à tiges herbacées ou sous-ligneuses, feuilles solitaires et entières, inflorescence complexe, cymes plus ou moins ramifiées ; calice tubulaire ; corolle en tube ; feuilles à cinq feuilles ; corolle à cinq étamines ; ovaire à deux ou quatre lobes, base entourée de nectaires, stigmate à tête aplatie, capsule à deux ou quatre pétales bilobés ; graines très petites, téguments à reliefs recourbés ; embryons charnus (**Diallo,2005**).

#### **A. Classification *Nicotiana tabacum***

Espèce	<i>Nicotiana tabacum</i>
Genre	Nicotiana,
Famille	Solanacée
Ordre	Personnatae.
Sous classe	Dialypetales
Classe	Dicotylédones
Sous division	Angiospermes
Division	Spermaphytes
Règne	Végétal



Figure 11 :*Nicotiana tabacum*  
(anonyme04,2022).

## B. Deux grandes espèces de tabac sont connues

*Nicotiana tabacum L.* (grand tabac) : il représente 90% de la production mondiale. Avec une taille de 2 mètres, *Nicotiana tabacum L.* est une plante peu ramifiée aux feuilles simples, alternes, sessiles, velues et vigoureuses, ovales et lancéolées courtement acuminées au sommet décurrent à la base. Les fleurs sont grandes cymes terminales rougeâtres, blanches, roses parfois crémees, infundibuliformes, corolle de 4 cm de long, calice de 1,5 cm à lobes longuement acuminés. Les fruits sont des capsules ovoïdes de 2 cm de long renferment une multitude de grains brunâtres minuscules. (Impact) (Tchuindem,2002).

### III.2 *Juniperus oxycedrus*

Le genévrier cade, ou encore oxycède est une plante de la famille des cupressacées. Il a été décrit par Linne en 1753 sous le nom de *Juniperus Oxycedrus*. Le nom oxycedrus provient de deux mots grecs «oxys» et «cedros» qui signifient respectivement aigu et cèdre, c'est-à-dire «cèdre à feuilles épineuses», (Mesli et al, 2015).

#### II.2.1. Classification de *Juniperus Oxycedrus*

<b>Règne</b>	<b>Végétal</b>
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>S.Embranchement</b>	Gymnospermes
<b>Classe</b>	Conifères
<b>Ordre</b>	Coniférales
<b>Sous ordre</b>	Taxales
<b>Famille</b>	Cuprèssacées
<b>Genre</b>	<i>Juniperus</i>
<b>Espèce</b>	<i>JuniperusoxycedrusL,</i>



Figure 12: *Juniperus oxycedrus* (BelKacem, 2015).

<b>Nom français</b>	genévrier, cade, cadier, petit cèdre, petit cèdre d'Espagne	
<b>Nom</b>	Arar (Arabe) Taga (Berbère)	

### III.2.1. Origine

Le genévrier oxycèdre est une espèce originaire de la région méditerranéenne, (Belkacem, 2015). On distingue couramment trois sous-espèces :

- Subsp. *Oxycedrus*, à port érigé, à feuilles très étroites, à fruits petits ;
- Subsp. *acrocarpa*, plus buissonnant et à gros fruits, commune sur tout le littoral, Subsp. *rubescens*, fruit plus petit et de couleur brun rougeâtre. Elle est très commune dans toute l'Algérie (Quezel et al, 1962).

Il existe des formes de passage entre les deux dernières sous-espèces. A noter cependant, dans une monographie récente consacrée au genre *Juniperus*, propose de faire de *macrocarpa* une espèce à part entière (*J. Macrocarpa*) et de diviser la sous-espèce *oxycedrus* en deux : *J. oxycedrus* (Ouest du bassin méditerranéen), et *Juniperus delipides* (Est du bassin) (Mesli et al, 2015).

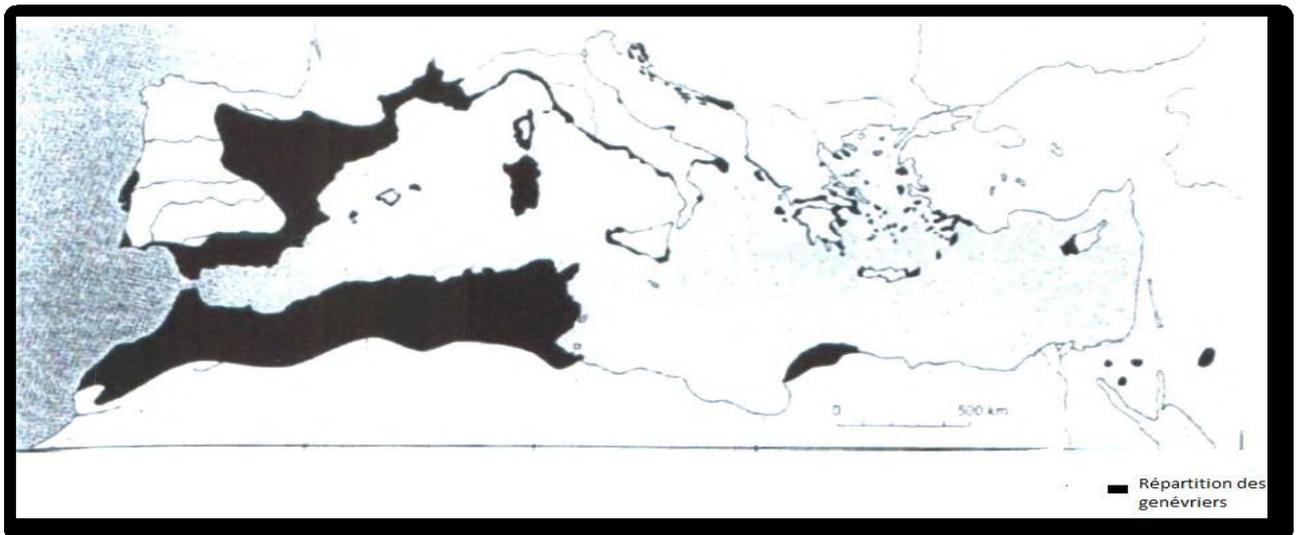
### III.2.2. Répartition

Communément présent le long du littoral méditerranéen (du Maroc à l'Iran), l'Oxycèdre est l'une des plantes caractéristiques de l'arbrisseau et du maquis, le plus commun des genévriers méditerranéens, présent dans tout le bassin méditerranéen. Il vit dans le sud de l'Europe (Espagne, France).

C'est une espèce méditerranéenne qui pousse dans les pays du Moyen-Orient. En France, il est commun dans tout le bassin méditerranéen, d'où il s'étend en devenant assez rare jusqu'à l'Aveyron, la Lozère, l'Ardèche et la Drom (Gaston, 1990).

En Algérie mentionnent que le genévrier est commun dans les hautes terres (Alanay, Algérie et Constantine) ainsi que dans l'Atlas saharien (Quezel et al, 1962).

Ont mentionné que *Juniperus oxycedrus subsp macrocarpa* est commun sur toute la côte, tandis que *Juniperus Oxycedrus subsp rufescens* est commun sur toute l'Algérie (Klaus, 1991), a mentionné que cette espèce est répandue partout dans l'Afrique du Nord surtout dans les montagnes.



**Figure 13** : Aire de répartition des genévriers en région méditerranéenne (Quezel *et al*,1962).

### III.2.3. Utilisation

En médecine traditionnelle, cette plante est utilisée pour traiter diverses maladies telles que l'hyperglycémie, l'obésité, la tuberculose, la bronchite et la pneumonie, Les et baies du genévrier oxycède sont diurétiques, stimulantes et vermifuges, Pour l'usage interne, l'huile de cade peut être préconisée comme vermifuge et contre la lithiase biliaire, Chronic Nephritis and Pyelitis, Ce genévrier est surtout connu pour l'huile obtenue par distillation de son bois, nommée huile de cade, L'huile est utilisée depuis longtemps comme remède topique pour de nombreuses affections cutanées : eczéma sec chronique, acné, psoriasis et lichens. De plus, ont rapporté que l'huile de cade a des propriétés kératolytiques et antiprurigineuses et une activité antibactérienne *in vitro* (Boudy, 1950).

Elle a longtemps été utilisée comme antiseptique et antiparasitaire, sous forme de pommades pour traiter certaines affections cutanées (dont la gale), et aujourd'hui cette huile essentielle est également recommandée pour le traitement des animaux de compagnie, ainsi qu'en dermatologie pour les affections du cuir chevelu et le déparasitage agent (Meseli *et al* 2015).

## **IV -Etudes des activités biologiques**

### **IV.1. Activité anti-oxydatif**

La consommation d'oxygène est un processus physiologique très important dans la croissance cellulaire. L'utilisation de l'oxygène par le corps conduit à la production d'une gamme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ERO comprennent des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle (OH). A certaines concentrations, ils peuvent être nécessaires au fonctionnement cellulaire. Mais ils détruisent également des biomolécules importantes telles que les acides nucléiques, les lipides, les protéines, les acides gras polyinsaturés et les glucides. Selon **(Gülçin et al, 2010)**.

Les antioxydants sont des molécules qui ralentissent ou arrêtent l'oxydation d'autres produits chimiques. Selon les travaux de **(Lai et al ,2001)**, les antioxydants naturels protègent l'organisme en assurant de multiples fonctions telles que la réduction des maladies chroniques, l'inhibition de la croissance des bactéries pathogène et retardent la progression des radicaux libres dans le système biologique ainsi que la peroxydation lipidique. Les alcaloïdes sont de puissants agents antioxydants, dans ce contexte on peut citer quelques exemples :

#### ➤ **La caféine**

Elle est connue pour être un stimulant du système nerveux central, mais elle possède également une activité antioxydante : elle réduit la formation de radicaux libres dans les cellules de la peau en fournissant un puissant piègeur de radicaux libres ( $OH\bullet$ ,  $CH_3O\bullet$ ,  $HOO\bullet$ ). Cet alcaloïde a des propriétés anticancéreuses grâce à cette propriété qui affecte les cellules endommagées par la lumière UV tout en provoquant la division des cellules avant de se transformer en cellules cancéreuses. C'est pourquoi il est ajouté aux cosmétiques **(Herman, 2013)**.

#### ➤ **La pipérine**

Le poivre noir, un alcaloïde au potentiel antioxydant, est abondant dans le poivre noir, et son activité de piégeage des radicaux libres peut être utilisée pour la chimio prévention et le contrôle de la progression tumorale **(Butt et al, 2013)**.

➤ **Les alcaloïdes isoquinoléines**

Qui présentent une activité de piégeage des radicaux libres et d'inhibition de la lipoxygénase (Noureddine et al,2013).

➤ **Galantamine**

C'est un piègeur de ROS qui ralentit le stress oxydatif associé à diverses maladies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, le syndrome de Down, l'athérosclérose, les maladies vasculaires, le cancer, le diabète de type 1 et 2 et l'arthrite psoriasique (Tsvetkova et al,2013).

➤ **Capsaïcine**

Qui est caractérisé par le groupement hydroxyle responsable de l'activité antioxydante (Si,w ,Lianget al, 2012). Plusieurs autres molécules alcaloïdes, linéarilobine, lycocotonine, 14-acétyltalatzamine, brownie, cammaconine, talatzamine, cochléarénine, cochléarénine présentent aussi cette activité antioxydante potentielle (Kolaket al, 2006).

D'après (C.Azevedo et al ,2019),l'évaluation du potentiel antioxydant à partir des extraits des alcaloïdes, peut se réaliser par des tests in vitro caractérisés par l'utilisation des réactifs, généralement c'est :

- 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH).
- Superoxyde dismutase (SOD).
- 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acides (ABTS).
- Test avec l'acide tribarbiturique (TBARS).

#### **IV.2. L'activité anticancéreuse**

Le cancer est la présence de cellules anormales qui se multiplient de manière incontrôlée. Selon (Badiaga, 2011), le cancer se caractérise par l'anarchie et le développement perturbé de cellules « anormales » dans l'organisme, conduisant à la formation de tumeurs ou de « masses ».Ce groupe de cellules attaque et détruit l'organe dans lequel il est implanté, et peut migrer vers d'autres parties du corps (ce qu'on appelle alors métastase).

Il a été démontré que le composé alcaloïde modifie l'activité de divers enzymes et facteurs de transcription, inhibant ainsi l'invasion, les métastases et l'angiogenèse. Fait

intéressant, la pipérine a une activité antimutagène et les alcaloïdes alfène, qui contiennent un grand nombre de structures complexes, constituent une classe importante de produits naturels.

L'activité anticancéreuse de ces composés bioactifs est devenue un domaine de recherche sur les médicaments ces dernières années.

Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine activés par la nicotine peuvent activer plusieurs voies de signalisation avec des effets tumorigènes, et ces récepteurs peuvent être ciblés pour le traitement ou la prévention du cancer. À cette fin, les connaissances émergentes sur les mécanismes des effets cancérigènes de la nicotine doivent être prises en compte lors de l'évaluation des réglementations relatives à la fabrication, à la distribution et à la commercialisation des produits à base de nicotine (**Grando, 2014**).

#### **IV.2.1. L'ADN une cible moléculaire des anticancéreux**

L'ADN est la principale cible intracellulaire des médicaments anticancéreux. De nouveaux médicaments plus efficaces ciblant l'ADN, causant des dommages aux cellules cancéreuses et bloquant leur division et même entraînant sa mort, ce qui peut accélérer la découverte de médicaments et les processus de développement. Ainsi, il a été jugé utile d'étudier l'interaction des composés à base de métal avec l'ADN pour une meilleure compréhension de leurs propriétés pharmacologiques, de ce fait aujourd'hui les mécanismes complexes expliquant les processus de la production de lésions dans l'ADN jusqu'à la mort cellulaire, ouvrant des perspectives prometteuses dans la mise au point de nouveaux agents anti-tumoraux plus sélectifs et plus performants (**Maolin et al, 2017**).

- **La chimiothérapie**

La chimiothérapie est traditionnellement basée en grande partie sur l'interaction de ligands cytotoxiques avec l'ADN. Elle se repose sur le fait d'empêcher les cellules de se reproduire et bloquer la réplication de l'ADN dans le noyau cellulaire (**Nafees et al, 2014**).

#### **IV.3. Les activités anti-inflammatoires**

L'inflammation est la réponse d'un tissu vivant vascularisé à une agression d'origine physique, chimique ou biologique pour l'entretenir. Parfois, il peut être nocif en raison de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du dérèglement du processus inflammatoire, de la quantité ou de la qualité anormale des cellules impliquées dans l'inflammation (**Rousselet et al, 2005**).

Les anti-inflammatoires sont des produits chimiques très divers qui agissent de manière purement symptomatique et sont destinés à traiter les réactions inflammatoires et les maladies qui en découlent (Muster, 2005). Bien évidemment les alcaloïdes font partie de la liste des anti-inflammatoires tels que :

➤ **La colchicine**

Possède de multiples mécanismes d'action affectant le processus inflammatoire. Il empêche l'assemblage des microtubules, perturbant ainsi l'activation de l'inflammasome, la chimiotaxie des cellules inflammatoires, la production de leucotriènes et de cytokines et la phagocytose. Cet alcaloïde est utilisé dans la prévention et le traitement de l'arthrite goutteuse (Dalbeth et al, 2014). On a suggéré que la colchicine pourrait être utilisée avec succès pour la prévention secondaire de l'athérosclérose.

➤ **La berbérine**

De nombreuses études ont démontré son activité anti-inflammatoire au niveau du système digestif, contribuant principalement à la protection de la barrière épithéliale intestinale et à la régulation des cytokines inflammatoires intestinales et de la transcription (Zou et al, 2017). La (figure 18) résume les effets de la berbérine.

➤ **Noscapine bromés**

Inhibe la libération de cytokines et de chimiokines sans affecter la viabilité cellulaire

Les effets anti-inflammatoires des alcaloïdes peuvent être révélés par des tests in vitro, via l'examen de l'effet inhibiteur sur la production d'oxyde nitrique dans les macrophages qui sert de médiateur pour la réponse immunitaire (Zughaier, et al, 2010).

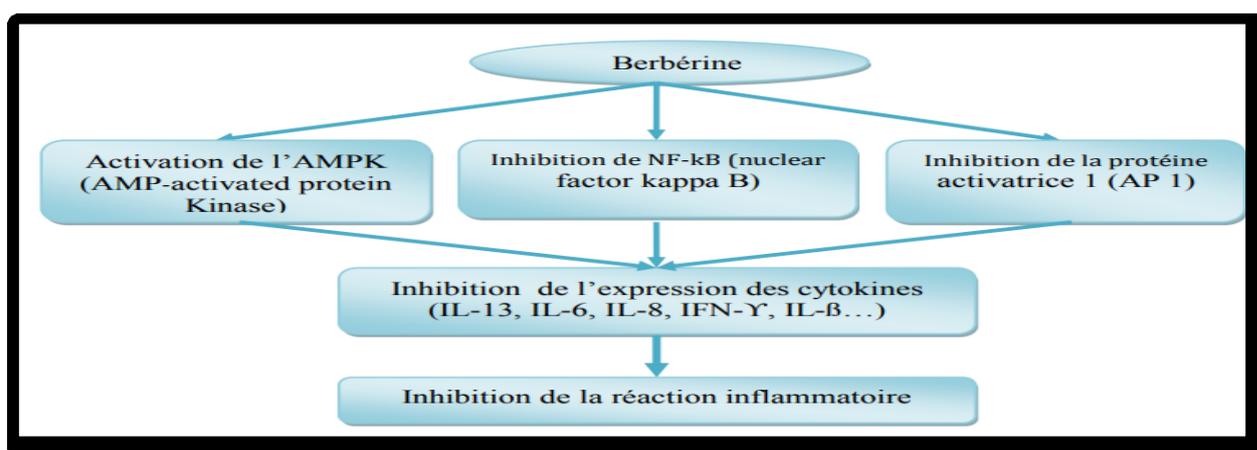


Figure 14: Effet anti-inflammatoire de la berbérine (Zou et al, 2017).

#### **IV.4. Test antihémolyse**

Cette méthode est basée sur l'instabilité induite par la chaleur de la membrane des globules rouges. Le milieu réactionnel contient 1 ml d'extrait à différentes concentrations (100 - 600 µg/ml) et 1 ml de suspension d'érythrocytes préparée (**Patel et al,2016**). Des témoins négatifs ont été préparés en parallèle en mélangeant 1 ml d'eau physiologique avec 1 ml de suspension de globules rouges, et l'acide acétylsalicylique (aspirine) a été utilisé comme étalon à différentes concentrations (**Reshma et al, 2014**).

Après 30 min d'incubation à 60°C), les tubes sont centrifugés pendant 5min à 3000 rpm (**Rathirse PR et al, 2013**). L'absorbance du surnageant est effectuée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. **Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse suivant :(Patel et al ,2016).**

$$\left(\frac{Ac - At}{Ac}\right) \times 100$$

**Ac** : Absorbance du contrôle négatif.

**At** : Absorbance d'extrait testé.

#### **IV.5. Les activités antibactériennes**

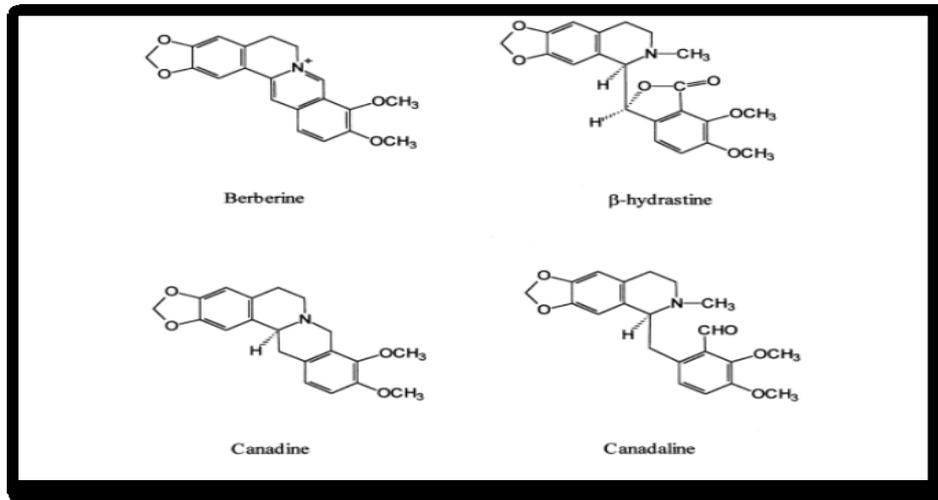
La sensibilité des bactéries aux extraits d'alcaloïdes a été testée par la Méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les tests d'activité antibactérienne in vitro utilisent Méthode de diffusion de disque ou méthode de diffusion de trou.

La détermination de l'activité antibactérienne en fonction du diamètre de la zone inhibition autour des puits (ou disques) après 24 heures de culture à température suffisante. Par conséquent, les souches bactériennes seront considérées comme sensibles, très Sensible, extrêmement sensible ou résistant (**Bernaouiet al,2018**).

Les alcaloïdes d'isoquinoline existent principalement dans certains espèces papaveraceae et rutaceae ; plusieurs extraits de ces espèces sont traditionnellement utilisés Pour l'activité antibactérienne, la berbérine est considérée comme le principal contributeur à l'activité, il est actif contre un certain nombre de bactéries Gram+ positives et Gram-négatives.

Certaines plantes vivaces, comme hydrastis canadensis, dont les rhizomes ou Racines d'alcaloïdes utilisées comme désinfectants, elles sont utilisées avec succès dans Herbes pour le traitement des maladies infectieuses des voies gastro-intestinales et génito-urinaires Système respiratoire (**Scazzocchioet al, 2001**). Dans cette usine, 10 Des alcaloïdes

debenzylisoquinoline à activité bactéricide ont été isolés, notamment Il existe principalement la berbérine, la bêta-amoxicilline, la canadine et la canadaline, comme le montre la figure suivante :



**Figure 15 :** Les quatre principaux alcaloïdes benzyloquinoléines entraînant une activité bactéricide (El-Shazly et al ,2001).

#### IV.5.1. Définition

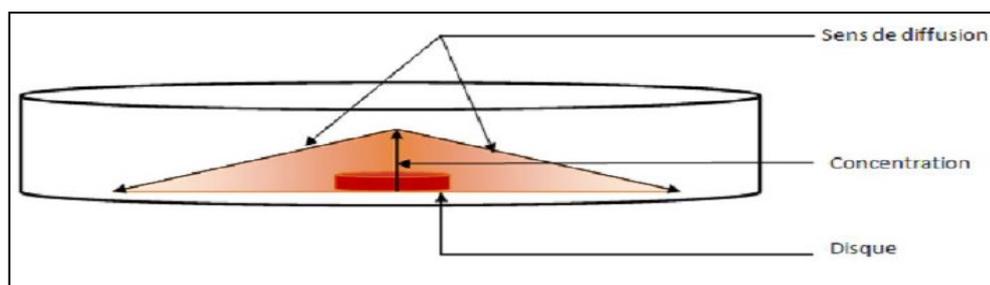
L'activités antibiotique (nous parlerons pour notre part et dans la suite du document antibactérienne) correspond à activité d'une molécule ou composé présent au sein d'un végétal qui à très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou la tue.

La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien. Face à un antibactérien donné, la sensibilité d'une bactérie peut être très différente selon la souche d'appartenance (Nicols et al,1998).

#### IV.5.2. Principe de l'antibiogramme

La réalisation d'un antibiogramme consiste en la recherche de la sensibilité d'une bactérie à un certain nombre d'antibiotique.

Parmi les multiples méthodes appliquées, celle dite de diffusion en milieu gélosé s'avère la plus utilisée pour réalisation d'un antibiogramme. Cela consiste à placer un disque de papier imprégné d'antibiotiques sur la gélose inoculée au préalable. L'antibiotique s'humidifie puis diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du disque(Mille . Allane , 2009).Nous pouvons schématiser tout ce processus comme suit figure :



**Figure 16:** Schématisation du Principe de la mise en œuvre de l'antibiogramme(Mlle.Allane,2009)

Ainsi la bactérie se développera t- elle si la concentration en antibiotique est inférieure à la concentration minimale inhibitrice ce qui se matérialisera par l'apparition d'une zone circulaire d'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque (Nicols et al ,1998).

#### **IV.5.3. Intérêt de Méthode de la diffusion en disque**

La diffusion en disque est facile à mettre en œuvre, reproductible et ne nécessite pas d'équipement couteux. On doit noter en plus la facilité de modification des disques antimicrobiens si nécessaire(Nicols et al, 1998).

*Chapitre III : Les  
techniques d'analyse  
expérimentales*

## I. Introduction

Ces techniques fournissent des données conduisant à l'identification de structures moléculaires organiques. Les plus utilisés dans nos travaux sont : **CCM,HPLC,UV,CV, IR.**

### I.1. Technique chromatographique

La chromatographie est une technique souvent utilisée pour séparer et identifier les produits chimiques qui composent les objets.

Bien que la technique ait été développée à l'origine pour séparer les substances colorées par leur nom (couleur khrôma en grec), elle est très efficace pour l'analyse des substances organiques(**Mohamed, 2010**).

#### I.1.1. Chromatographie sur couche mince

##### I.1.1.1. Définition

La chromatographie sur couche mince est un phénomène d'adsorption, principalement pour l'analyse et la séparation des substances chimiques qui composent les objets, et l'équipement utilisé pour la chromatographie sur couche mince est relativement simple. Il se compose d'une plaque et d'une fente rectangulaire pour l'élution. Cette dernière dépend du choix de la phase stationnaire et de la phase mobile (éluant), les phases stationnaires les plus couramment utilisées en chromatographie sur couche mince sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose en poudre. Nous rapportons ci-dessous le protocole réalisé pour l'huile essentielle de Bryon(**Mohamed ,2010**).

##### I.1.1.2. Protocole expérimental

Sur une planche en silicone de 2×5 cm, utilisez un crayon pour tracer une ligne horizontale à 0,5 cm du bord inférieur et à 0,2 cm du bord supérieur. Diluer H.E dans de l'éther et déposer une goutte sur la ligne du bord inférieur. La plaque est ensuite placée dans une cuve avec éluant : éther/éther de pétrole (1 :4) à une hauteur de 0,5 cm. Lorsque l'éluant atteint l'avant de la plaque, retirer la plaque du réservoir Puis sécher (**Mohamed ,2010**).

Les taches apparaissant à l'aide d'un révélateur sont caractérisées par un facteur de rétention (Rf) qui est défini comme étant le rapport entre la distance parcourue par la substance (X) sur la distance parcourue par le front de l'éluant (Y) :

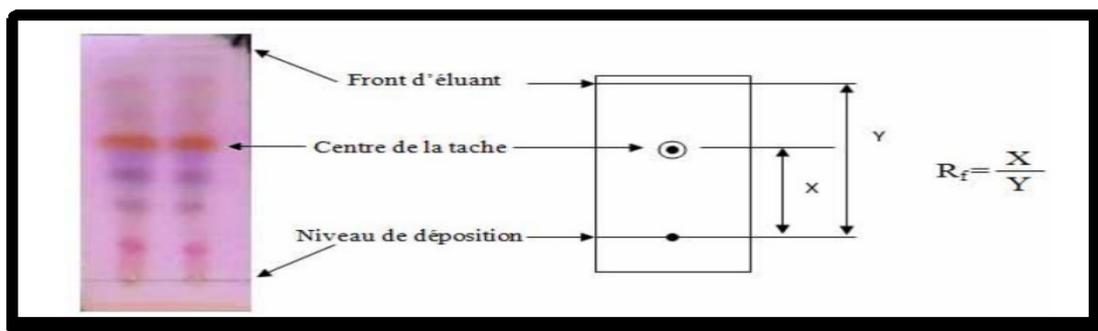


Figure 17 : Protocole de CCM (Mohamed ,2010).

### I.1.2. La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance consiste à exploiter les interactions des solutés avec deux phases l'une mobile et l'autre stationnaire sous haute pression. Les solutés sont séparés en fonction de plusieurs paramètres tels que l'affinité du soluté dans l'éluant, la polarité ou la charge électrique. Après leur séparation, les solutés sont identifiés et dosés à l'aide d'un détecteur couplé à la colonne chromatographique .

Le mode de fonctionnement de la HPLC est largement décrit. Ainsi, à un instant donné, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne, et se trouve entraîné par la phase mobile. Les constituants du mélange sont ensuite recueillis et identifiés en fonction de leurs vitesses d'adsorption et de désorption. La chromatographie aboutit à un tracé représentatif de constituant (pic) en fonction de leur temps de rétention à la sortie de la colonne : c'est un chromatogramme(Panaiva, 2006).

#### I-1-2-1 Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme .Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés

d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire.(Jean ,2001). Ce principe est traduit par le schéma suivant :

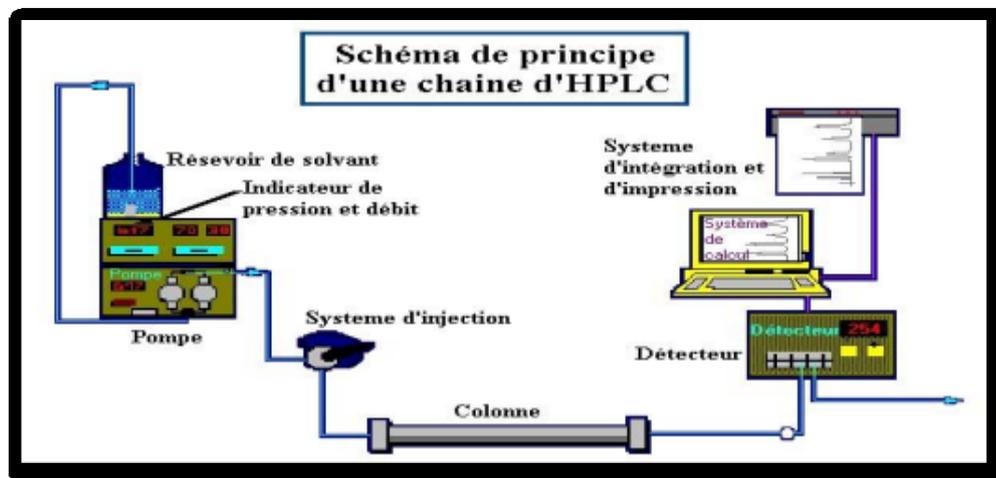


Figure 18: Principe et appareillage d'une chaîne d'HPLC(Colomb ,2016).

### I-1-2-2 Appareillage :

HPLC est composée des éléments suivants (Ghnimi, 2015):

- **La colonne** : généralement c'est un tube en acier de 5 à 15 cm de longueur et de diamètre de 5 mm qui contient une phase stationnaire. Il existe plusieurs types de phases stationnaire parmi lesquelles on trouve principalement
  - **Les silices non greffées**
  - **Les silices greffées par des groupements polaires** : pour lesquelles l'éluant utilisé est apolaire. On parle alors de chromatographie en phase normale.
  - **Les silices greffées par des groupements apolaires** (chaines carbonées linaires plus ou moins longues) : pour lesquelles l'éluant utilisé est polaire, dans ce cas il s'agit de chromatographie en phase inverse.
- **Injecteur** : il est constitué d'une vanne haute pression appelé vanne rhéodyne et d'une boucle d'échantillonnage d'une capacité comprise entre 10 et 50  $\mu$ l. Cette boucle permet une fois remplie de déposer l'échantillon à l'entrée de la colonne sans perte de pression.
- **La pompe**: elle permet d'introduire la phase mobile dans l'appareil sous un débit constant et à forte pression.
- **Détecteur** : il existe plusieurs types des détecteurs. Parmi les quels, des détecteurs à absorptiomètre dans l'UV-Visible, des réfractomètres différentiels ou des détecteurs électrochimiques.

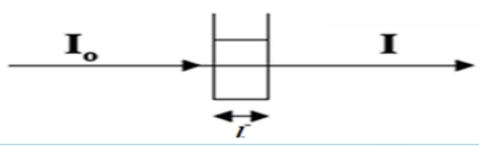
## I.2. Technique spectroscopique

L'identification des structures moléculaires organiques est généralement réalisée en utilisant une combinaison de plusieurs techniques spectroscopiques, la spectroscopie UV, la spectroscopie IR.

### I.2.1. Spectroscopie Ultraviolet (UV)

La spectroscopie UV est une technique simple et rapide qui fournit des informations sur les propriétés chimiques, les propriétés structurelles physiques et les propriétés optiques des composés. Dans un composé, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien définie. L'absorption moléculaire du rayonnement UV se traduit généralement par diverses bandes d'absorption électroniques constituées de nombreuses lignes.

Chaque raie est le résultat d'un électron passant de l'état fondamental à l'un des nombreux états d'énergie vibrationnelle rotationnelle associés à chaque état électronique excité, ce qui permet de caractériser notamment les molécules à doubles liaisons conjuguées. Les mesures d'absorption UV permettent également de comprendre ou de déterminer la composition chimique d'un mélange par comparaison avec un témoin (Skoog *et al.*, 1997).



The diagram shows a horizontal arrow labeled  $I_0$  entering a rectangular cell from the left. A double-headed vertical arrow below the cell is labeled  $l$ . A horizontal arrow labeled  $I$  exits the cell to the right.

$$A = \epsilon lc = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

Loi de Beer-Lambert (Masson, 2016).

**L**: Parcours optique (cm).

**T**: Transmittance.

**c**: Concentration de l'E (mol/l).

$\epsilon$ : Coefficient d'absorptions molaire (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

### I.2.2. La voltampèromètre cyclique

La voltampèremètre de tension à balayage de ligne est une méthode électrique utilisée pour étudier la dynamique des systèmes électrochimiques. Dans ce type de méthode, une tension est appliquée à une électrode et l'évolution du courant qui la traverse au cours du temps est étudiée. La deuxième méthode consiste à "revenir" dans le sens inverse, afin de

revenir au potentiel de départ, après quoi un cycle est ainsi effectué. Effectué (B.Gorrec ,2005).

Dans ce cas, la méthode est appelée "voltampèremètre cyclique", qui est son nom standard. Le voltamètre ne peut montrer sa véritable puissance que lorsqu'elle est pratiquée à plusieurs reprises. C'est le voltamètre cyclique, qui est basée sur un balayage de potentiel linéaire à partir du potentiel initial  $E_i$  tel que :

$$E = E_i \pm vt$$

Ou  $v$  : la vitesse de balayage, le signe  $+$  correspond à un balayage vers les potentiels positifs, le signe  $-$  à un balayage vers les potentiels négatifs.

L'évolution à travers le courant  $I(t)$  à travers le système électrochimique pendant le voltamètre, représenté sur le graphique par la valeur  $E(t)$ , porte le nom de voltammogramme ou voltampérogramme ou aussi courbe de polarisation.

Dans le cas du voltamètre cyclique, le sens de balayage est indiqué par des flèches. La (figure22) montre l'allure générale du voltammogramme

$I=f(E) \Leftrightarrow$  La grandeur caractéristique du voltammogramme est:

**$I_{pc}$ ,  $I_{pa}$** : courant de pic cathodique et anodique ;

**$E_{pc}$ ,  $E_{pa}$** : potentiel de pic cathodique et anodique ;

**$E_{pc}/2$ ,  $E_{pa}/2$** : potentiel à mi-hauteur des pics cathodique et anodique ;

**$\Delta E_p$**  : différence de potentiel entre  **$E_{pc}$**  et  **$E_{pa}$** .

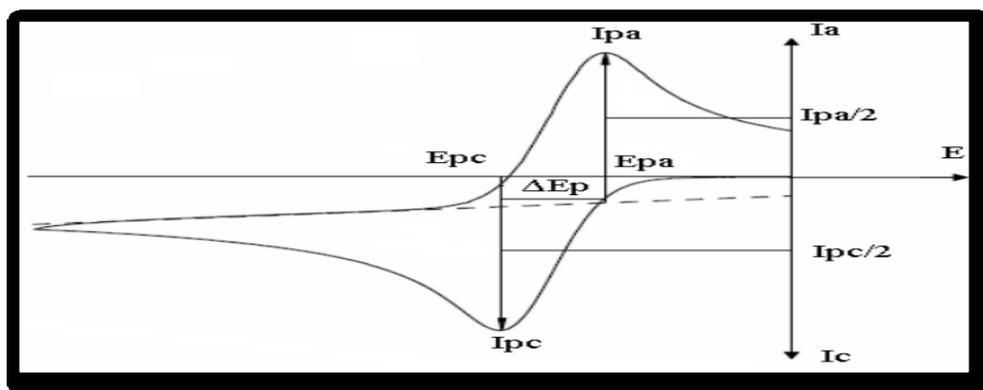


Figure 19: Allure générale d'un voltampérogramme cyclique(A.Sevic et al, 1948).

### Expressions mathématiques des courants et des potentiels de pic dans un transfert de charge

Les expressions mathématiques pour le courant de crête et le potentiel ont été développées à l'origine pour le balayage vers l'avant (voltampèremètre linéaire).

Pour les systèmes rapides et Delahaye pour les systèmes lents. Cette théorie a été étendue

Vers un système semi-rapide. Les travaux deont permis le développement de relations décrivant des courbes expérimentales pour des balayages cycliques.

En cas de transfert de charge rapide (Nickolson *et al*,1964).



### I.2.3. Spectroscopie Infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique analytique principalement utilisée pour déterminer la présence de groupes fonctionnels dans la structure des molécules organiques et de certaines molécules simples. Il est basé sur l'absorption du rayonnement infrarouge par l'échantillon à analyser. Les fonctions chimiques présentes dans l'échantillon sont analysées,(Peter *et al*,2004).

Les nombres d'onde  $\tilde{\nu}$ , il est défini comme :

$$\tilde{\nu} = 1/\lambda$$

Où  $\lambda$  est la longueur d'onde dans le vide mesurée en cm. L'unité du nombre d'onde est donc le  $\text{cm}^{-1}$ .

Par exemple, les nombres d'onde des raies d'émission de l'atome d'hydrogène sont données par :

$$\tilde{\nu} = R \left( \frac{1}{n_1^2} - \frac{1}{n_2^2} \right)$$

➤ R est la constante de Rydberg

➤  $n_1$  et  $n_2$  sont les numéros des orbitales avec  $n_1 > n_2$ .

NP :

➤ Proche IR 0.8-2.5  $\mu\text{m}$ .

➤ IR moyen 2.5-25  $\mu\text{m}$ .

➤ IR lointain 25-1000  $\mu\text{m}$ .

Nombres d'onde  $\tilde{\nu}$

13300-4000  $\text{cm}^{-1}$

4000-400  $\text{cm}^{-1}$

400-10  $\text{cm}^{-1}$

# *Partie pratique*

*CHAPITRE I:*  
*Matériels et*  
*méthodes*

## I. Matériels et méthode

### I.1. Matériels

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar d'EL Oued. L'activité antimicrobienne a été effectuée au sein du laboratoire médical EL-MEDJED.

#### I.1.1. Matériels biologiques

##### I.1.1.1. Matériel végétal

###### ➤ *Nicotiana Tabacum*

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail comporte les parties aériennes de plante récoltées l'espèce *Nicotiana Tabacum*.



**Figure20 : L'espèce *Nicotiana Tabacum* (photo originale).**

#### A-Site de prélèvement

L'espèce *Nicotiana tabacum* a récoltée de dira de guemar à 14 km de willaya de el oued. Pour la période d'échantillonnage, le printemps septembre –octobre (2021).

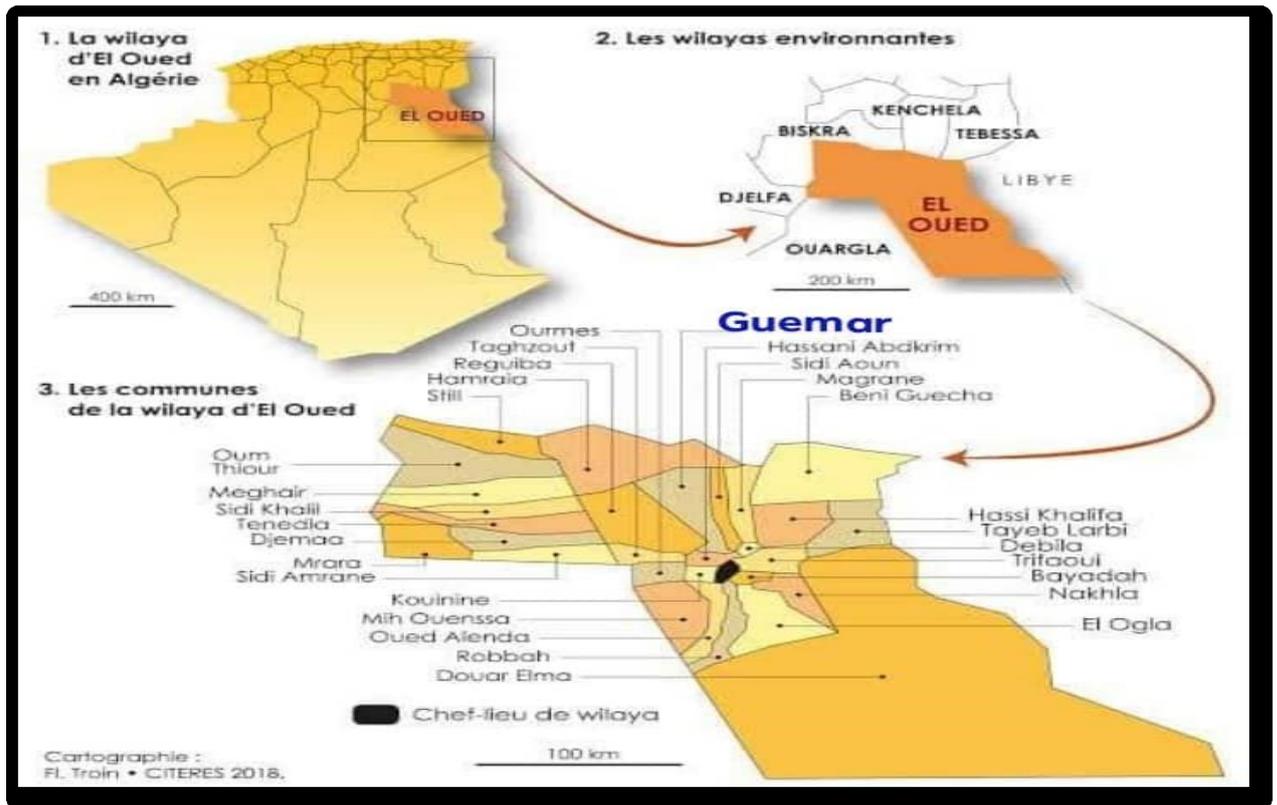


Figure21 : carte de la zone d'étudiée (Kadri, et al,2018).

### B-Technique de séchage

Après la récolte, le matériel végétal est nettoyé des tout débris et poussier. Ensuite les échantillons sont séchés à l'ombre et conservés avant utilisation.

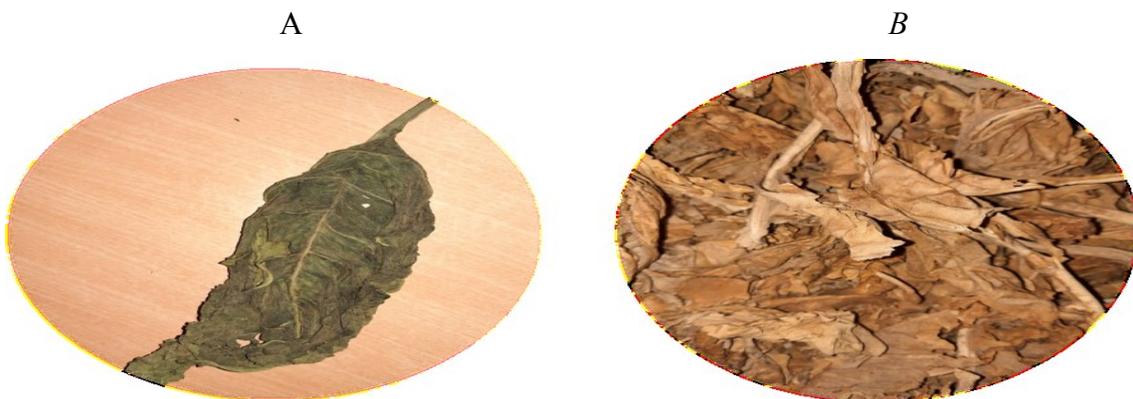


Figure22: L'espèce *Nicotiana tabacum*(A: plante fraîche ; B: plante séchée) (original, 2022).

#### ➤ tabac traditionnel

Dans l'Algérie et typiquement dans sud algérien, le tabac traditionnel est consommé largement chez certains tranche d'âge, en effet le tabac traditionnel est un mélange de la feuille de la plante *Nicotiana* et *Juniperus* , il se diffère d'une région a une autre; ce mélange est vendu sous forme d'une herbe séché et moulu grossièrement(anonyme 05, 2022).

➤ **tabac artificiel**

Le tabac artificiel a été fourni par le vendeur choisit aléatoirement (**anonyme 06, 2022**).



**Figure23:** tabac artificiel (photo original). **Figure24 :** tabac traditionnel(photo original).

**1.1.1.2. Les microorganismes utilisés : (Souches microbiennes)**

- **Les bactéries Gram négatif**

- ***Escherichia coli* (ATCC 25922)**

- Bacille, appartient à la famille des Entero bacteriaceae De forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$ . *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (**Steven et al, 2004**).

- ***Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)**

*Pseudomonas aeruginosa*, autrement connue sous le nom de bacille pyocyanique, est un bacille à Gram négatif du genre *Pseudomonas*. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart de l'isolé ou en diplobacilles (**Minoet al ,1989**). Temps *Pseudomonas aeruginosa* est très répandu dans l'eau et les milieux humides, il peut aussi coloniser l'Homme (**Nauciel et al,2005**).

-***Klebsilla pneumonie* (ATCC 700603)**

Genre de bactérie, non mobiles de famille Enterobacteriaceae, capsulés avec des colonies à aspect de muqueuses.

Il est un type de bactérie qui est souvent répandu dans les unités de soins intensifs ou les maisons de soins infirmiers. Il se trouve généralement dans le tractus intestinal, où il fait partie d'écosystème d'un côlon sain. Ce bactérie preuve se propager à d'autres parties du corps, cependant provoquer des maladies mortelles (**Anadriamololona, 2010**).

### **Les bactéries Gram positif**

#### **Staphylococcus aureus (ATCC 25923)**

Est l'espèce la plus pathogène du genre Staphylococcus. Elle est très répandue chez l'Homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez l'Homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses (principalement les fosses nasales) et des zones cutanées humides (périnée, aisselles). La transmission interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage). Elle peut aussi être indirecte par les vêtements, la literie, ou les aliments.

Staphylococcus aureus peut causer des infections urinaires, des septicémies et des intoxications Alimentaires (**Nauciel et al, 2005**).

#### **Streptococcus pneumoniae**

Est une espèce appartenant au genre Streptococcus. Son nom initial était Diplococcus pneumoniae en 1926. Il a été rebaptisé Streptococcus pneumoniae en 1974 vu sa croissance en chaînes dans les milieux liquides. A cause de son implication comme agent pathogène dans les pneumonies, il a longtemps été dénommé simplement pneumocoque. Streptococcus pneumoniae est une bactérie commensale des voies aériennes supérieures, et l'agent pathogène le plus fréquent des pneumonies communautaires bactériologiquement documentées. Les bronchites et broncho-pneumopathies sont observés surtout chez les patients insuffisants respiratoires chroniques.

Streptococcus pneumoniae est aussi responsable des otites moyennes aiguës de l'enfant avant l'âge de deux ans, des méningites, septicémies et bactériémies (**Freney et al, 2007**).

### **I.1.2. Matériels d'étude au laboratoire**

Les réactifs et les matériels utilisés dans les différents tests et sont présenté dans l'annexe 01.

## I.2. Méthodes

### I.2.1 Préparation des extraits

#### I.2.1.1 Extraction de l'extrait brut

L'extraction des principes actifs est effectuée par la macération, Les poudres des plantes étudiées sont mises à macérer pendant 48 heures à température ambiante, dans un mélange éthanol-eau (70 :30 V/V).

Les macéras sont réunis et filtrés sur papier filtre. Le solvant est éliminé du filtrat sous vide à 40oC à l'aide d'un Rotavapor.

L'extraction des principes actifs est effectuée par la macération, Les poudres des plantes étudiées sont mises à macérer pendant 48 heures à température ambiante, dans un mélange éthanol-eau (70 :30 V/V).

Les macéras sont réunis et filtrés sur papier filtre. Le solvant est éliminé du filtrat sous vide à 40oC à l'aide d'un Rotavapor.

#### I.2.1.2. Détermination du rendement de l'extrait brut

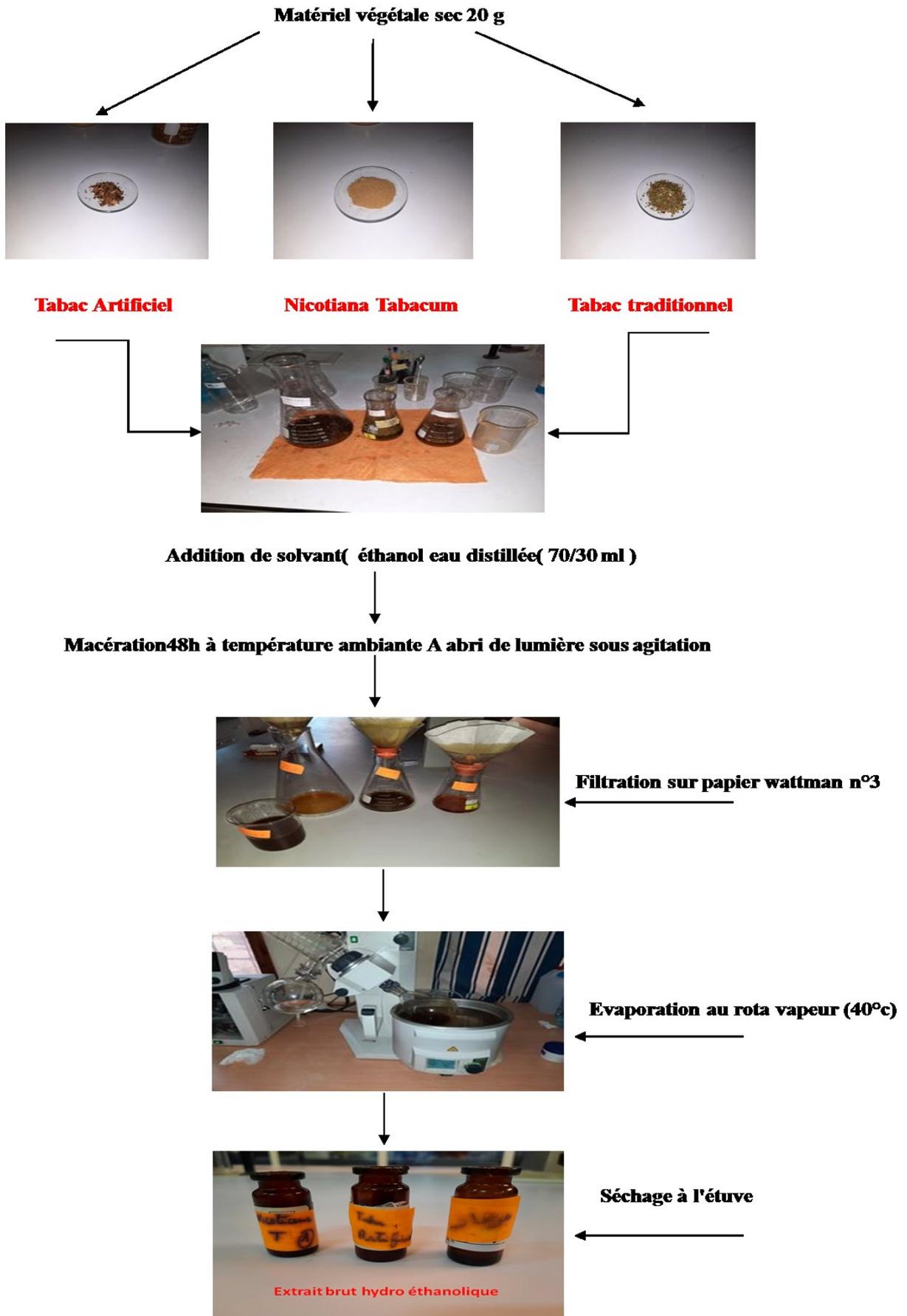
Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal. Ce rendement est calculé via l'équation :

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

**R(%)** : Rendement en%

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

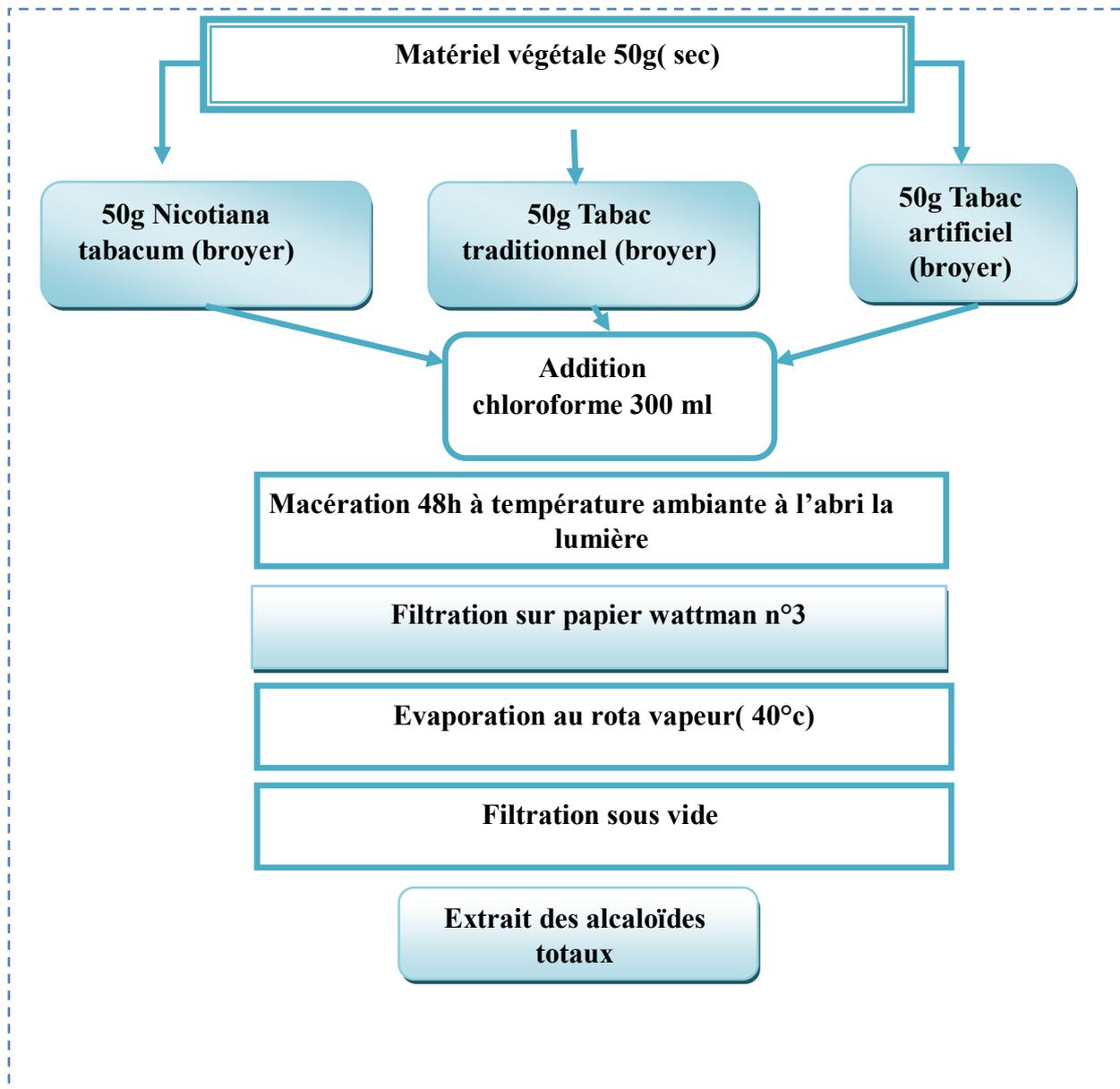
**Mv** : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction (**Harborne, 1998**).



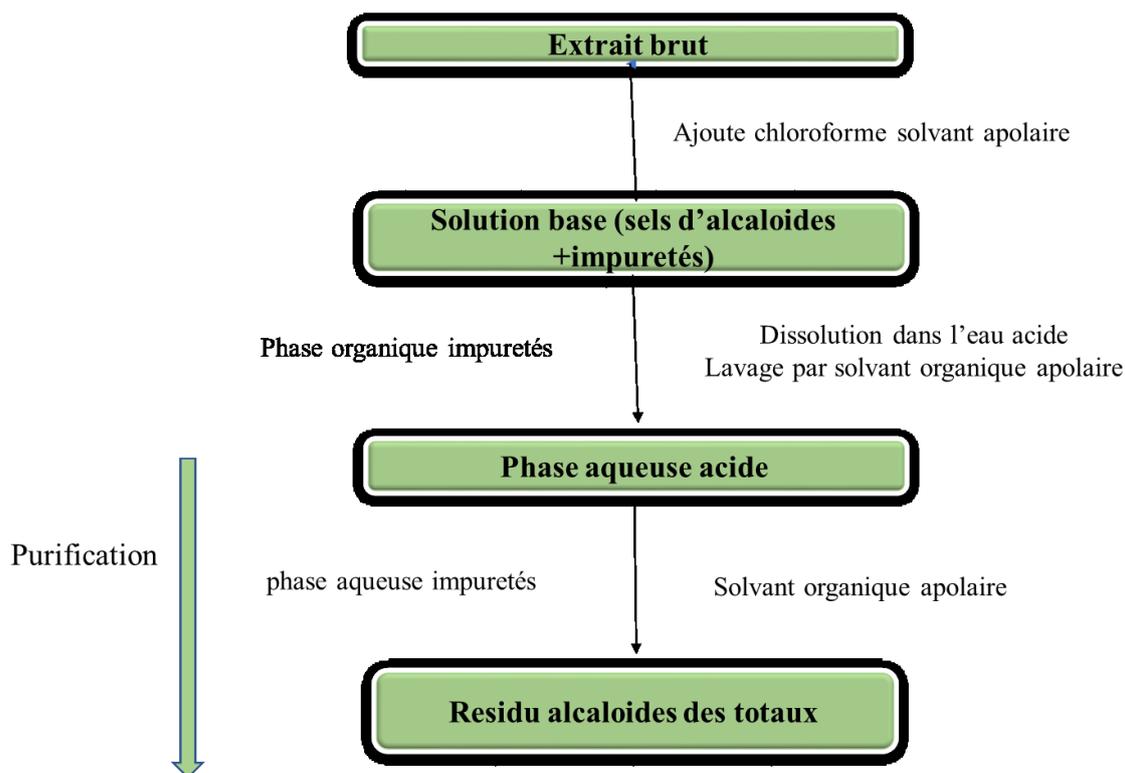
**Figure25** : les étapes de la préparation de l'extrait brut (hydro éthanolique).

### I.2.1.3. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction a été effectuée par la macération selon les étapes illustrées dans le schéma suivant:



**Figure26:** Les étapes de la préparation d'extrait des alcaloïdes totaux.



**Figure27:** Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux.

#### I.2.1.4. Screening phytochimique

L'un des buts essentiels d'un test phytochimique consiste dans la détection des différentes familles de métabolites secondaires existant dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation (Haoulia, 2015). La phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisée sur les extraits (Mohammedi, 2013).

Nous avons réalisé ces tests 3 extraits hydro-éthanolique (*Nicotiana Tabacum* ; tabac traditionnel et tabac artificiel).

#### Test saponosides (test de mousse)

Nous avons introduit 10ml de chaque extrait aqueux dans 3 tubes à essai ; les tubes sont agités pendant 15 min .et nous avons mesuré la hauteur de mousse persistante (Nesba et al, 2018).

✓ **Test des Alcaloïdes**

Deux méthodes ont été utilisées :

Dans 3 tubes mettre 0.5ml de chaque extrait hydro-éthanolique plus quelques gouttes de Hcl plus quelques gouttes de réactif de mayer.

Dans autre 3 tubes mettre 0.5 ml de chaque extrait hydro-éthanolique plus quelques gouttes de réactif de wagner, L'apparition d'un précipitâtes blanc ou blanc ou brun, respectivement révèle la présence des alcaloïdes(Nesba et al, 2018).

✓ **Test de Polyphénols**

Ajouté 2 gouttes de solution alcoolique de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) à 1% à 2ml de chaque extrait. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée (Bidie et al, 2011).

✓ **Test d'extrait Flavonoïdes**

Dans 3 tubes mettre 0.5ml de chaque hydro- éthanolique et ajouter quelques gouttes de Hcl concentré+0.5g de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur Rose ou rouge se développe en après 3minutes (Nesba et al, 2018).

✓ **Test de tannins**

Les tanins sont mis en évidence à partir de 0.5 ml d'extrait hydro-éthanolique placé dans trois tubes en présence de quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> (1% préparé au méthanol). Après l'agitation de L'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiqes (Nesba et al,2018).

✓ **Test de Trapénoïdes**

Dans un tube à essai, ajouter à 5ml d'extrait de plante, 2ml de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et 3ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentré. La formation d'une couleur brune rougeâtre indique la présence des Terpénoïdes (Nesba et al, 2018).

✓ **Test de Coumarine**

Nous avons mets dans trois tubes 1ml de chaque extrait (comme témoins).et dans autres trois tubes nous avons introduit 1ml de chaque extrait aqueux+ 0.1 ml d'ammoniac (NH<sub>4</sub>OH)

10 .%La fluorescence est observée sous UV a 366 nm une fluorescence intense dans le tube ou il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarine (**Hamid et al, 2018**).

### **I.2.1.5. Caractérisation des extraits**

#### **I.2.1.5.1. Par chromatographie sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation des composés qui permet d'analyser la complexité d'un mélange. Cette technique a été utilisée pour visualiser la séparation des molécules de l'extrait au cours de son fraction évaluer la complexité des fractions.

##### **• Mode opératoire**

La cuve de migration est partiellement remplie du mélange de solvant chloroforme (phase mobile) afin qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant ce qui facilite et améliore la migration. Une ligne de dépôt est tracée à 1,5 cm du bord, les échantillons (quelques gouttes de l'extrait brut) sont déposés, puis la plaque est mise en contact avec la phase mobile dans la cuve jusqu'à migration de la phase mobile à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque. Ces compositions ne sont bien sûr qu'indicatives et peuvent être adaptées aux besoins Spécifiques d'une analyse. Les CCM sont analysées en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et après révélation par les réactifs appropriés. L'utilisation de réactif Dragendorff sur les plaques de Chromatographie sur couche mince après élution, permet de comparer les profils des fractions. Séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes, d'obtenir des renseignements supplémentaires sur le type d'une molécule (cas de réactifs spécifiques) et éventuellement. Permettre de localiser certains composés, invisibles sans dérivatisation chimique.

#### **I.2.1.5.2. Par spectroscopiques UV visible**

##### **• Instruments utilisés pour les mesures spectroscopiques UV-Vis**

Le UV-Visible (spectrophotomètre UV-1800 Shimadzu ), cuve en quartz avec de longueur d'onde de 200-900 nm a été utilisé.

Les mesures UV-Vis ont été effectuées grâce au spectrophotomètre UV-Vis

(SHIMADZU 1800) lié à un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel de visualisation et acquisition des données (Logiciel UV probe Spectrum).

L'interaction se fait dans des cuves en quartz, l'appareil contient double emplacement des cuves en quartz, une pour le blanc (solution tampon approprié) comme référence et le deuxième pour les deux extraits (brut et hydro éthaonique avec l'adduit d'ADN), puis les données sont traitées en utilisant le logiciel d'analyses Origine 18.

#### **I.2.1.5.3. Par Electrochimique**

Nous avons utilisé un montage électrochimique classique à trois électrodes constituées d'une électrode de travail, d'une contre-électrode et d'une électrode de référence. Avant chaque mesure, la cellule de mesure est nettoyée avec de l'eau de robinet, puis à l'eau distillée et, enfin, séchée à l'acétone.

##### **• Mode opératoire**

La cellule électrochimique a été préparé par 1ml de chaque dérivé tabac dissout dans 25ml soit de solution tampon Après avoir nettoyé la surface de l'électrode de travail en carbone vitreux, il a été immergé dans la cellule avec l'électrode référence et l'auxiliaire. La cellule ensuite est saturée par le N<sub>2</sub> pendant 15min, le courant d'azote est maintenu au-dessus de la solution pendant la durée d'expérience pour chasser l'O<sub>2</sub> qui se trouve dans la cellule. La fenêtre du potentiel était de 0 à 2500 mV avec une vitesse de balayage de 100 mV/s. En premier temps les voltamogrammes de tabac ont été enregistré la cellule électrochimique.

#### **I.2.1.5.4. Par la chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

Certains de dispositif d'estimation des composés phénoliques Chromatographie en phase liquide à haute performance (RP-HPLC-SHIMADZU), installation Bamadchtan (Pompe A) Type (Pompe B) (LC 20 AL) pour le transfert de la phase mobile sous pression, le programme d'exploitation de l'installation (LC Solution), le type de colonne (VP-ODS-C18), (250 mm x 4,5 mm, 5 µm), réactif monochromatique (UV) de type (SPD-20A).

##### **✓ Détermination de certains acides phénoliques et flavonoïdes et alcaloïde par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).**

Certains composés phénoliques ont été estimés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) selon les conditions améliorées présentées dans le tableau

Les composants ont été séparés et quantifiés à l'aide de courbes étalons obtenues en améliorant les conditions de la méthode.

**Tableau 03 :** Conditions expérimentales du dispositif (HPLC) de séparation des composés phénoliques étudiés.

<b>Facture</b>	<b>les conditions</b>
<b>Système</b>	<b>phase inverse RP-HPLC</b>
<b>Colone</b>	<b>C18 (25cm x46nm)</b>
<b>volume de la seringue</b>	<b>20 µl</b>
<b>Le Moyenne de flux</b>	<b>1ml/min</b>
<b>longueur d'onde</b>	<b><math>\lambda = 268nm</math></b>
<b>Temp</b>	<b>50 min</b>
<b>Température</b>	<b>25 c°</b>
<b>La phase mobile</b>	<b>A(acetonitrile) B (asideacétique 0.2%)</b>

**Tableau 04 :** les changements du rapport de phase mobile A et B en termes de temps.

<b>Temp (min)</b>	<b>Le pourcentage (A)</b>	<b>Le pourcentage (B)</b>
<b>0.01</b>	10	90
<b>2.00</b>	10	90
<b>6.00</b>	14	86
<b>16.00</b>	17	83
<b>23.00</b>	19	81
<b>28.00</b>	23	77
<b>35.00</b>	23	77
<b>38.00</b>	40	60
<b>50.00</b>	10	90

#### • Réactifs

Acide formique 99–100 % (Prolabo), acétonitrile grade HPLC (Carlo Erba), eau ultra pure grade HPLC (Sigma Aldrich), Acétonitrile (Fluka Biochemika),(pH 3) (Schott Geräte). nicotine pure (Merck).

**• Mode opératoire**

La phase mobile est constituée d'un tampon formiate (contenant 10mM Ph03) et d'acétonitrile (78 : 22 % (v/v)). Le pH de la phase mobile est ajusté à 3 pour une meilleure résolution et pour éviter la traînée des pics chromatographiques. Le détecteur PDA est fixé à une longueur d'onde de 260 nm et la colonne est thermostatée à 40 °C. Le débit de la phase mobile est de 1 mL/min. Le volume d'injection est de 20 µL.

**I.2.1.5.5. Par Spectroscopie Infra-rouge à transformée de fourrier (FT-IR)**

On met une goutte de chaque extrait dans l'automate de l'IR, le spectre s'affiche sur l'écran.

**I.2.1.6. Evaluation des activités biologiques****I.2.1.6.1. Activité Anti-inflammatoire**

L'activité anti-inflammatoire in vitro d'extrait brut et d'alcaloïde a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. La solution d'essai (0,5 ml) composé de 450 µl de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (BSA) 0.5 % et 50µl d'extrait avec une concentration de 250 mg/ml.

La solution control test (0,5 ml) composé de 450 µl de la solution aqueuse de BSA 0.5 % et 50µl d'eau distillé. La solution contrôle produit (0,5 ml) composé de 450 µl d'eau distillé d'extrait 6mg avec une concentration de 250 mg/ml.

La solution standard test (0,5 ml) compose de 450 µl de la solution aqueuse de BSA 0.5% et 50µl ml de la solution de standard diclofénac sodium avec une concentration de 250 mg/ml.

Toutes les solutions au-dessus ont été ajustée à pH 6.52 par une solution tampon, les échantillons ont été incubées à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté pour garder les échantillons à 51°C puis la température 70 °C pendant 3 min, après refroidissement des tubes 250 µl de l'absorbance a été lue par le spectrophotomètre UV – visible à 416 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculée comme suit:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(OD \text{ of test solution} - OD \text{ of control} / OD \text{ of test control}] \times 100.$$

OD : la densité optique.

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparé avec le diclofénac sodium (250  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### **I.2.1.6.2. Test hémolyse**

Cette méthode basée sur la déstabilisation des membranes des globules rouges induite par la chaleur. Le milieu réactionnel contient 10ml d'extrait brut avec différentes concentrations (100 -600 $\mu\text{g/ml}$ ) et 2ml de suspension des globules rouges préparé

**(Patel et al 2016).**

Le contrôle négatif est préparé en parallèle en mélangeant 1ml de l'eau physiologique avec 2ml de la suspension des globules rouges. Aspirine est utilisé comme un standard avec différentes concentrations **(Reshma et al, 2014).**

Après incubation pendant 30 min à 60°C les tubes sont centrifugés pendant 5min **(Rathirise et al, 2013)**. L'absorbance du surnageant est effectuée à 560 nm à l'aide d'un spectrophotomètre

$$\text{Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse} = ((\text{Ac}-\text{At})/\text{Ac}) * 100$$

Ac: absorbance du contrôle négatif.

#### **I.2.1.6.3. Activité anticancéreuse**

En spectroscopie électronique, si un composé interagit avec l'ADN, absorbance et la longueur D'onde de ce composé subit une variation suite à l'addition d'ADN. Ces variations peuvent être utilisées pour la détermination des paramètres de liaison. Il est bien connu dans la littérature scientifique que les techniques spectroscopiques UV-visible sont particulièrement utilisées pour étude de l'interaction tabac avec l'ADN en raison de leur couleur intense, ce qui permet des mesures spectroscopiques dans le domaine visible.

##### **• Mode opératoire**

Les solutions mères ont été préparées dans des solvants appropriés selon leur solubilité. Dans un premier temps, les spectres des composés tabac avant ajout d'ADN ont été enregistrés. Ensuite, les spectres ont été enregistrés par addition de différentes concentrations d'ADN. Toute ; expérience a été réalisée en maintenant le volume et la concentration des composés constants tout en faisant varier la teneur de la quantité d'ADN.

**• Les paramètres étudiés**

D'après les résultats expérimentaux, nous pouvons calculer la constante K et  $\Delta G$  à partir des valeurs de l'absorbance des différents tabacs en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN. En effet, La constante de liaison peut être évaluée par spectrophotométrie d'après l'équation de Benesi-Hildebrand suivante (**Touhami et al,2017**).

Où est absorbance du composé libre absorbance de l'adduit, La constante de liaison est calculée par le rapport pente/interception, du tracé du en fonction de  $1/[DNA]$ .

L'énergie libre de liaison est calculée à partir de l'équation suivante :

$$\Delta G = -RT \ln K$$

R : constante des gaz parfaits

T : température en kelvin

K constant de liaison

**I.2.1.6.4. Etude de l'activité anti oxydante Totale****❖ Etude électrochimique du comportement de l'acide gallique**

L'étude électrochimique du comportement du standard utilisé qui est l'acide gallique est effectuée dans l'intervalle de concentration allant de 0.1mM à 1.1 ml, Le potentiel E : -0.4 jusqu'à 1.6 mV et la vitesse de balayage est constante : 100mV/s.

**❖ Obtention des voltammogrammes cycliques d'échantillons**

De la même façon et sous les mêmes conditions précédentes appliquées sur l'acide gallique, on traite l'extrait, on obtient la voltampérogramme cyclique en ajoutant 10ul d'échantillon et 10 ml chloroforme plus 160 mg du sel du fond.

**❖ La teneur de l'équivalent de l'acide gallique :**

Selon (**Boubekri ,2014**), après l'obtention des voltammogrammes on peut lire le courant de pic anodique correspondant. Ce dernier est alors porté dans l'équation linéaire pour calculer la concentration équivalente de l'acide gallique. La teneur en acide gallique a été exprimée en grammes par litres. Alors, la teneur de l'équivalent de l'acide gallique est calculée comme suit:

Pour calculer la concentration de tout l'extrait, on divise donc la masse de l'extrait

obtenue après extraction par le volume du solvant dans lequel on a dissout cet extrait ( $C_1(\text{g/ml})$ ) comme le montre la relation suivante :

- La concentration massique d'échantillon en g/ml :

$$C_g = \frac{m_{\text{extrait}}(\text{g})}{V(\text{mL})}$$

- La concentration massique d'échantillon dans la cellule en g/mL:

$$C_g' = \frac{C_g \times V_{\text{utilisée}}}{V_{\text{Totale}}}$$

$V_{\text{ajoutée}}$  : le volume ajoutée de chaque extrait en ml

$V_{\text{Totale}}$  : le volume totale dans la cellule en ml

- L'équation obtenue d'après la courbe linéaire de l'acide gallique est :

$$y = b + ax$$

Où :

$Y$  : représente la valeur de la densité anodique du courant.

$X$ : représente la valeur de la concentration du standard en g.L-1.

En remplaçant à chaque fois la valeur de la densité du courant dans l'équation précédente, on trouve la valeur de la concentration équivalente de l'acide gallique en g/L.

- L'activité antioxydant totale des extraits est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$AAT \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{C_g \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}{C_g' \left( \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right)}$$

#### 1.2.1.6.5. Détermination de l'activité antibactérienne

- ✓ Les souches bactériennes utilisées

L'activité antibactérienne des deux extraits hydro-éthanolique et alcaloïdes est testée sur 5 souches à savoir : *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Klebsilla pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ; *Streptococcus pneumoniae*.

✓ **Préparation de la suspension bactérienne**

Les souches sont préalablement réisolées sur milieu bouillon nutritif).

Après 18 à 24 heures d'incubation, trois à cinq colonies de la culture sont dissociées dans 3ml d'eau physiologique ce qui correspond approximativement à 10<sup>8</sup> UFC (unité formant colonies).

✓ **Aromatogramme :**

L'aromatogramme est basé sur la technique de diffusion sur milieu gélosés Muller Hinton. la méthode appliquée est celle des puits décrits par (kuete *et al*,2004).

On prépare la gélose de Mueller-Hinton qui doit être séchée (absence complète de l'eau à sa surface), puis on procède à un ensemencement par la technique d'écouvillonnage qui consiste à tremper d'abord un écouvillon stérile dans la suspension et à ensemencer par la suite la gélose par un 1ml de cette dernière. On laisse sécher de 3 à 5 min, puis on pratique des desks à l'aide d'une pipette pasteur stérile (il faut éloigner les desks de 1cm minimum du bord de la boîte de Pétri). Le nombre des puits par boîte correspond aux différentes dilutions effectuées pour les extraits, on injecte 50 µl d'extrait à tester ainsi que ses différentes dilutions dans les desks, ensuite on incube les boîtes de Pétri pendant 18 à 24 h à 37°C.



**Figure 28 :** Ensemencement avec l'écouvillon(**original ,2022**).



**Figure 29 :** sélection la souche bactérienne avec micropipette (**original ,2022**).

*CHAPITRE II :*

*Résultat et discussion*

**I- Résultats :****1-Détermination de rendement d'extraits étudiées :**

Les extraits obtenus après macération ont été pesés pour déterminer ses rendements.

Les rendements sont calculés par rapport au poids de la matière sèche de plante étudiée par macération sont représentés dans le Tableau. :

**Tableau05** : Rendements d'extrait sec

	Poids sec utilisée (g)	Poids sec obtenus Brut (g)	Pourcentage d'extrait(%)
Rendement de <i>nicotiana tabacium</i>	20	0.8701	4.35
Rendement de <i>tabac traditionnel</i>	20	2.0671	10.33
Rendement de <i>tabac artificiel</i>	20	2.8666	14.33

**2-Résultat des tests phytochimiques :**

Les résultats des tests de criblage phytochimique préliminaires sont présentés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 06:** Mise en évidence de certaines métabolites secondaires dans l'extrait brut de :*Nicotiana tabacium* ,tabac traditionnel ,tabac artificiel .

Métabolites	<i>Nicotiana tabacium</i>	Tabac traditionnel	Tabac artificiel
Les saponosides	-	-	-
Les Alcaloïdes	+	++	+++
Les polyphenols	+	+++	++
Les Flavonoïdes	-	-	++
Les tannins	+	++	+++
Les Terpénoïdes	-	++	++
Les coumarine	+	+	+

+: traces

++ : positif

+++ : très positif

- : absent dans

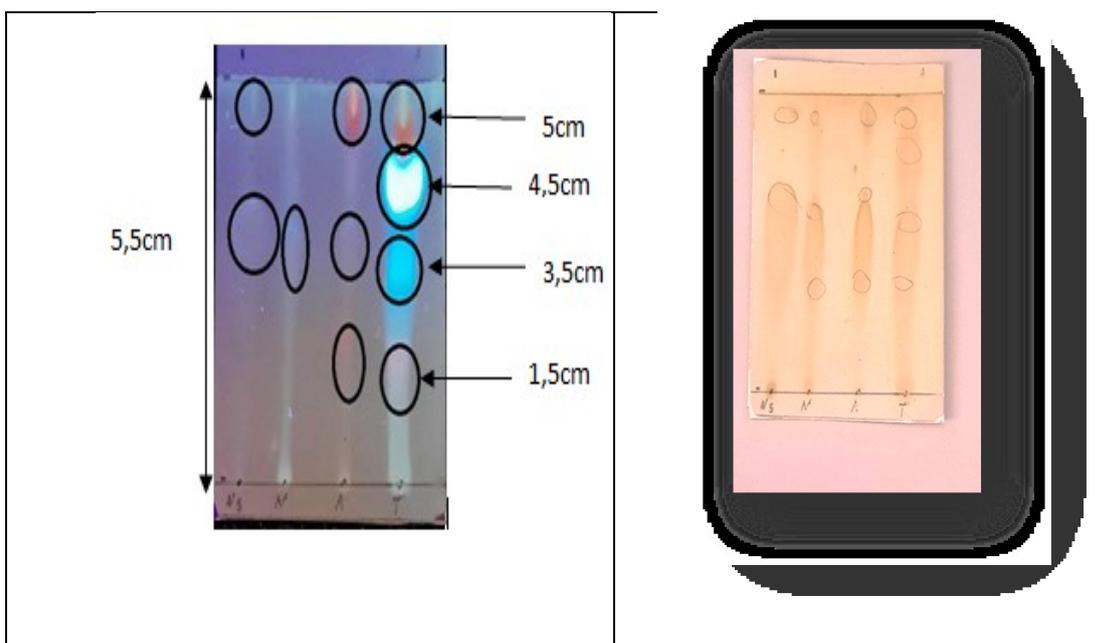
le test de saponoside (test de mousse) ;si La hauteur de la mousse <1cm ; résultat négative

si La hauteur de la mousse ≥1cm ; résultat positive.

### 3- Caractérisation des extraits obtenues :

#### 3-1 Caractérisation par CCM :

Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, Cette technique informe sur le contenu en phytoconstitués en se basant sur les résultats analytiques. Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince pour les trois plantes étudiées sur une plaque de gel de silice en utilisant deux systèmes. Les spots sont visualisés avant et après révélation sous une longueur d'onde de 366nm. Cette dernière a donné des fluorescences plus claires et distinctes. Les meilleurs chromatogrammes révélés aux (Dragendorff) et aux UV sont représentés dans les photos.



**Figure 30 :**CCM des extraits d'alcaloïde et différents plantes révélé par dragendorff.

<b>NS : nicotine standard</b>	<b>N : <i>Nicotiana tabacum</i></b>
<b>A : tabac traditionnel</b>	<b>T : tabac artificiel</b>

le CCM visualisé sous UV présente des taches de couleur bleu, bleu blanc fluorescent, rouge, violet claire, qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires.

Les rapports frontaux (Rf) des différents échantillons des plantes étudiées sont représentés dans le tableau suivant.

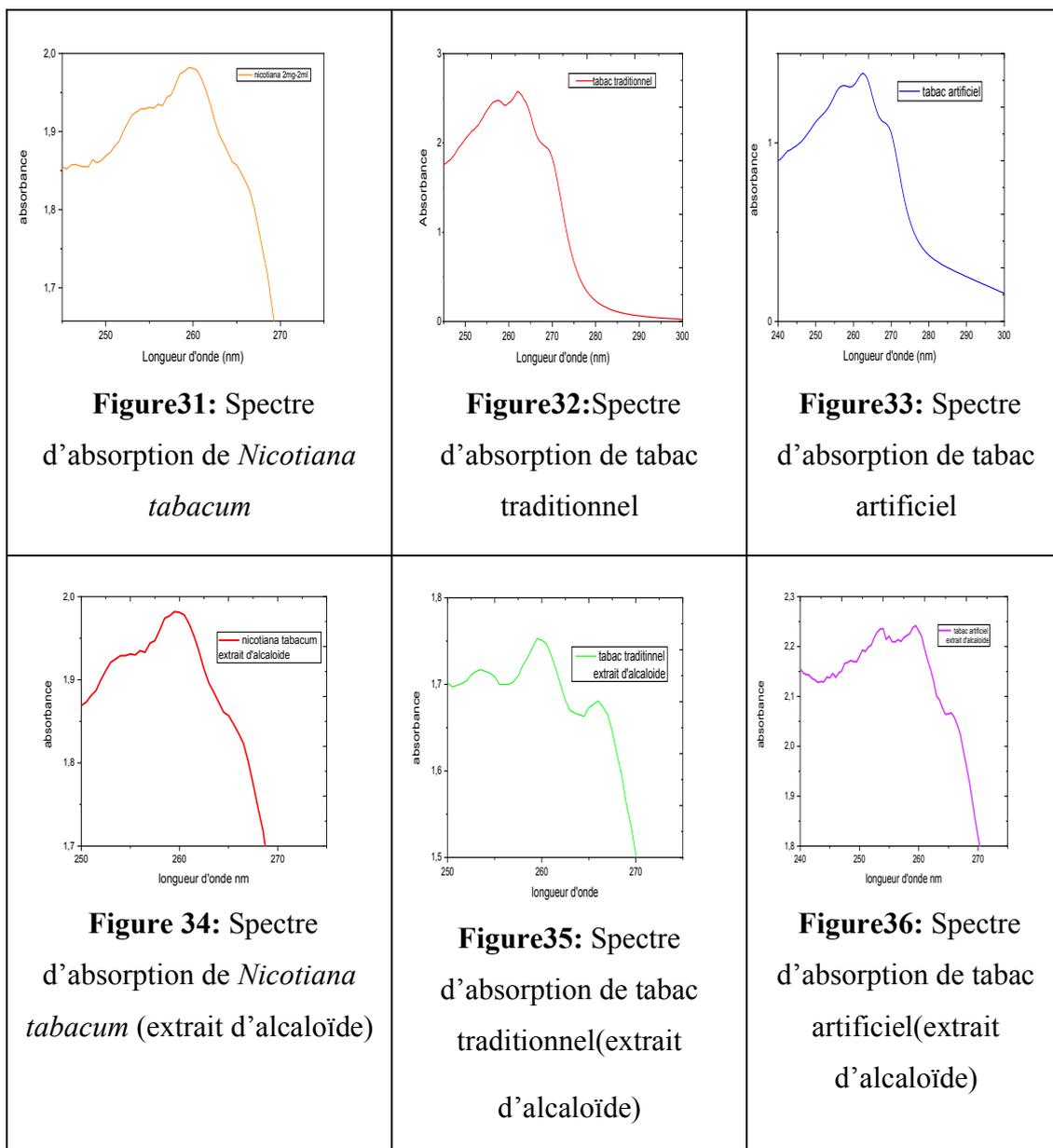
**Tableau 07 :** CCM des extraits (*Nicotiana Tabacum*, tabac traditionnel, tabac artificiel) révélés avec le réactif Dragendorff ; développant Chloroforme.

Extrait	Rf	Couleur
Nicotiana tabacum	0,818	Bleu
Tabac traditionnel	0,272	violet claire
	0,818	Bleu
	0,909	Rouge
Tabac artificiel	0,272	violet claire
	0,818	Bleu
	0,636	Bleu blanc fluorescent
	0,909	Rouge

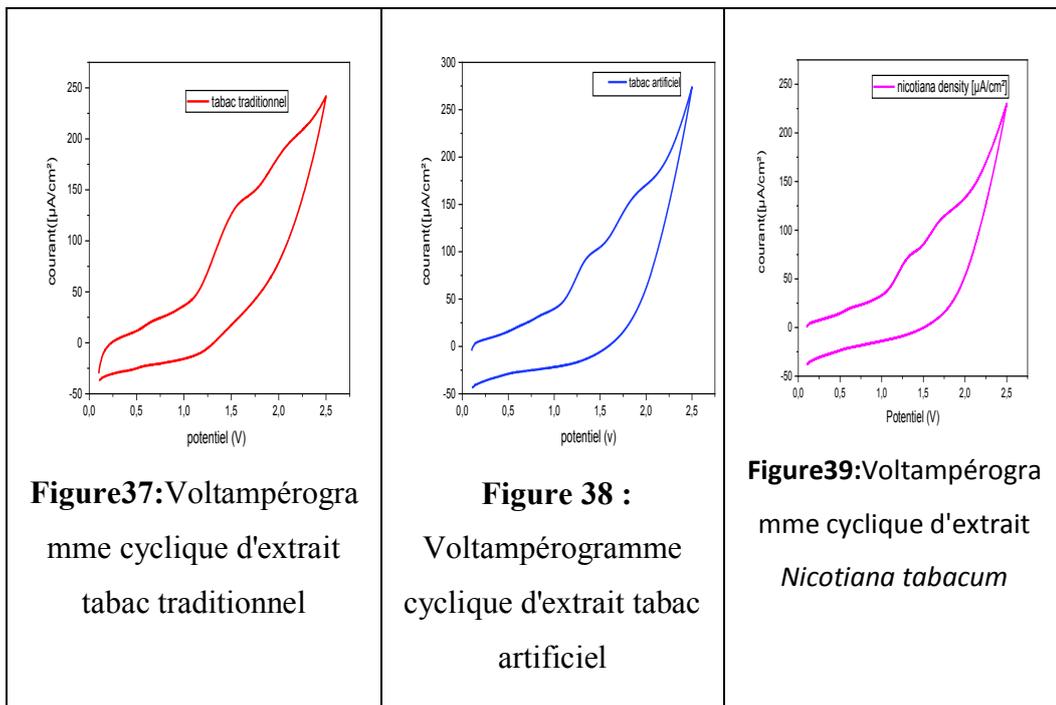
### 3-2 Caractérisation par UV visible :

**Tableau 08:** les valeurs de l'absorbance et  $\lambda$  max de différents extraits étudiées

		$\lambda$ max	Absorbance
Extrait brut	<i>Nicotiana tabacum</i>	259,62	1,982
	Tabac traditionnel	262,15	2,574
	Tabac artificiel	262,84	1,390
Extrait d'alcaloïde	<i>Nicotiana tabacum</i>	259,84	1,982
	Tabac traditionnel	259,78	1,753
	Tabac artificiel	259,53	2,240



3-3 Caractérisation par électrochimie :



❖ Paramètres électrochimiques :

Les paramètres électrochimiques d'extrait des plantes étudiés (tabac traditionnel, tabac artificiel, *Nicotiana tabacum*) sont rassemblés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 09 :Paramètres électrochimiques des fractions.

Extrait de	C (g/ml)	$I_{p,a}$ ( $\mu A/cm^2$ )	$E_{p,a}$ (V)	$I_{p,c}$ ( $\mu A/cm^2$ )	$E_{p,c}$ (V)	( $E_{p,a} - E_{p,c}$ )	$ E_{p,c} - E_{p,a} $
Tabac traditionnel	0.01	135,123	1,550	190,301	2,062	-0,512	0,512
Tabac artificiel	0,01	96,576	1,371	96,576	1,371	-0,503	0,503
<i>Nicotiana tabacum</i>	0,01	72,311	1,314	113,235	1,731	-0,417	0,417

## 3-4 Caractérisation par IR:

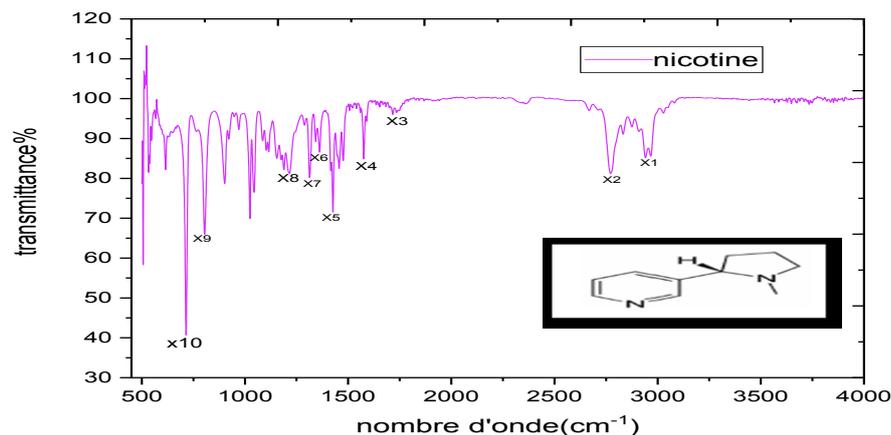


Figure 40 : Spectre IR de la nicotine

Sur ce spectre nous pouvons voir les différentes bandes caractéristiques des fonctions de la nicotine :

- Entre X1 et X2 ( $2964$  et  $2775\text{ cm}^{-1}$ ) nous avons les bandes caractéristiques des C-H.
- Le pic X4 :  $1581\text{ cm}^{-1}$  représente les doubles liaisons C=N aromatiques.
- Le pic X5 =  $1418\text{ cm}^{-1}$  représente les doubles liaisons C=C aromatiques.
- Les pics sortants à  $717\text{ cm}^{-1}$  et à  $904\text{ cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations hors du plan de la liaison C-H du cycle pyrimidique monosubstitué.

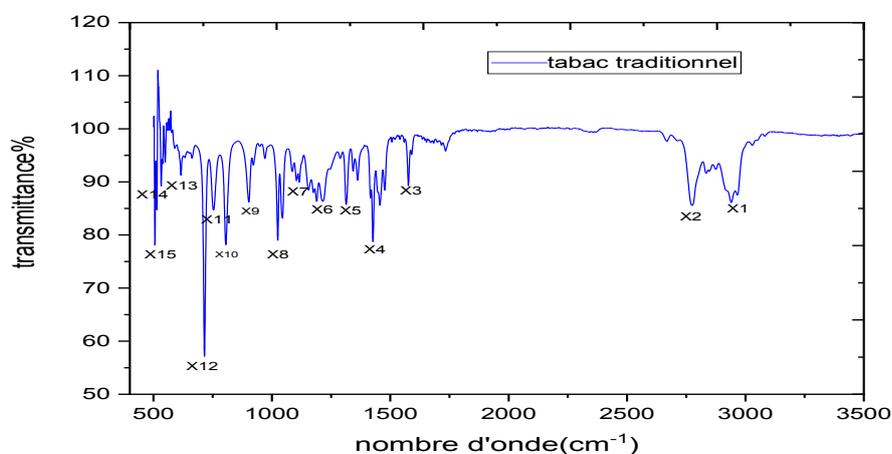
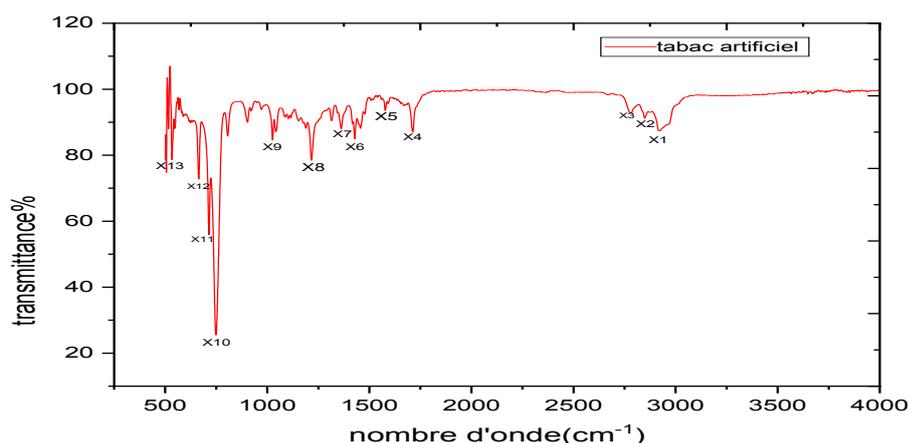


Figure 41: Spectre IR de tabac traditionnel

Sur ce spectre nous pouvons voir les différentes bandes caractéristiques des fonctions :

- Entre X1 et X2 ( $2945$  et  $2774\text{ cm}^{-1}$ ) nous avons les bandes caractéristiques des C-H.
- Les pics X 3 =  $1575\text{ cm}^{-1}$  et X5 =  $1319\text{ cm}^{-1}$  ; représentent les doubles liaisons N=O.
- Les pics X6 =  $1211\text{ cm}^{-1}$  et X8 =  $1024\text{ cm}^{-1}$  représentent la liaison C-N.
- Le pic X7 =  $115\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C-C.
- Les pics sortants à X9 =  $895\text{ cm}^{-1}$  et à X15 =  $513\text{ cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations hors du plan de la liaison C-H du cycle pyrimidique monosubstitué.



**Figure 42** : Spectre IR de tabac artificiel.

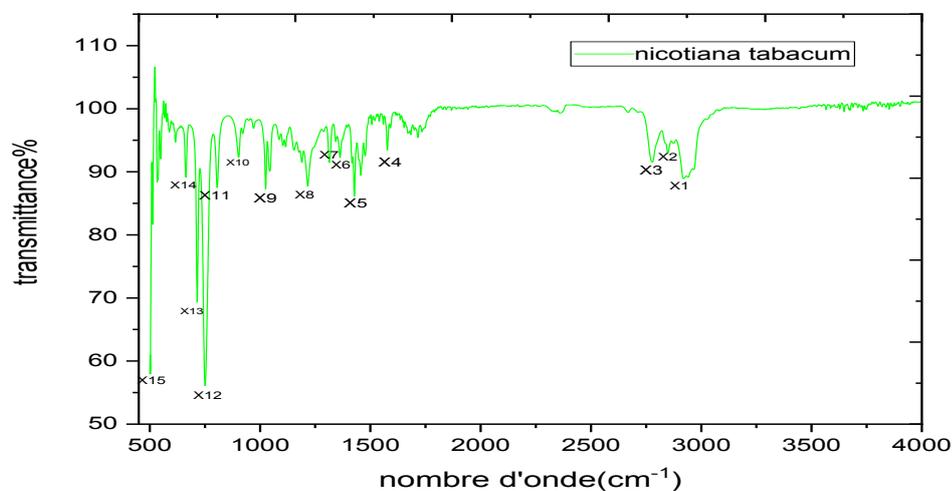
Sur ce spectre nous pouvons voir les différentes bandes caractéristiques des fonctions :

- Entre X1 et X2 ( $2918\text{ cm}^{-1}$  et  $2843\text{ cm}^{-1}$ ) nous avons les bandes caractéristiques des C-H.
- Le pic X3 =  $2778\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison O-H acide carboxylique.
- Le pic X4 =  $1706\text{ cm}^{-1}$  représente la double liaison C=O aldéhyde ou ester.
- Le pic X5 =  $1575\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison N-H amine ou amide.
- Le pic X6 =  $1431\text{ cm}^{-1}$  représente la double liaison C=C.
- Le pic X7 =  $1353\text{ cm}^{-1}$  représente la double liaison N=O.
- Le pic X8 =  $1217\text{ cm}^{-1}$  représente la double liaison P=O.
- Le pic X9 =  $1020\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C-N.
- Le pic X10 =  $750\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C-H aromatique monosubstitué.

. Le pic X11 =  $716\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C-Cl.

. Le pic X12 =  $656\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C-Br.

. Le pic X13 =  $530\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C-Cl



**Figure 43:** Spectre IR de *Nicotiana tabacum*.

Sur ce spectre nous pouvons voir les différentes bandes caractéristiques des fonctions :

. Entre X1 et X3 ( $2921$  et  $2776\text{ cm}^{-1}$ ) nous avons les bandes caractéristiques des C-H.

. Le pic X4 =  $1576\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C=N.

. Le pic X5 =  $1429\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C-H

. Les pics X6 =  $1365\text{ cm}^{-1}$  et X7 =  $1313\text{ cm}^{-1}$  ; représentent les doubles liaisons N=O.

. Le pic X8 =  $1024\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C-N.

. Le pic X9 =  $1016\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison C-C.

. Les pics sortants X10 =  $900\text{ cm}^{-1}$  et X15 =  $494\text{ cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations hors du plan de la liaison C-H du cycle pyrimidique monosubstitué.

### 3-5 Caractérisation par HPLC :

#### ✓ Chromatogrammes HPLC des extraits

Les résultats de la séparation des différents extraits bruts par la chromatographie liquide à haute performance HPLC sont illustrés dans les spectres suivants :

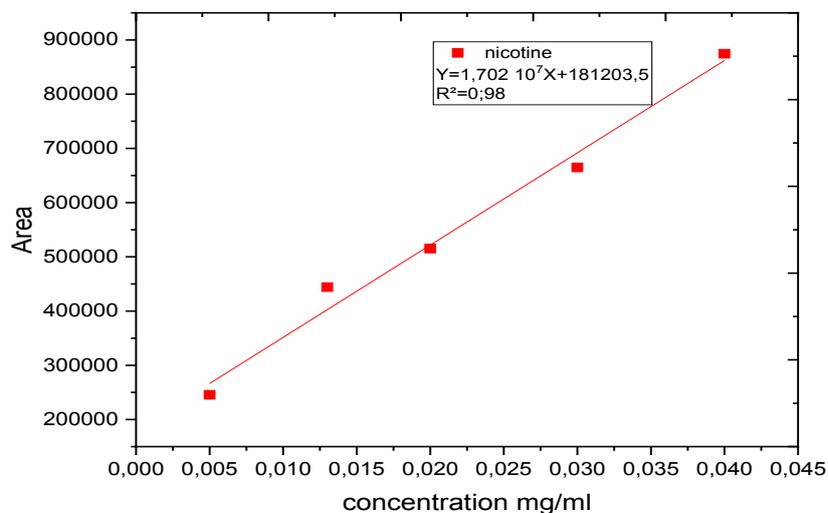


Figure 44 : Courbe d'étalonnage de la nicotine par l'HPLC.

➤ Nicotine

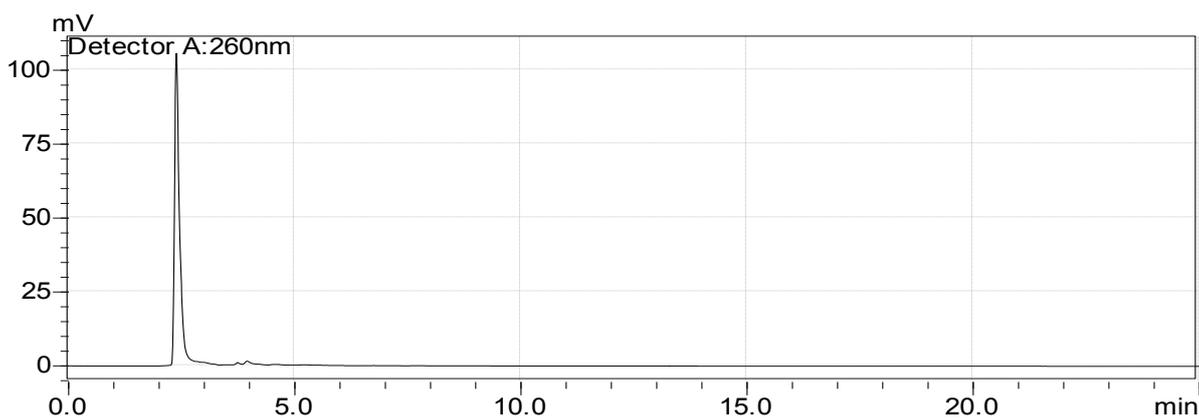
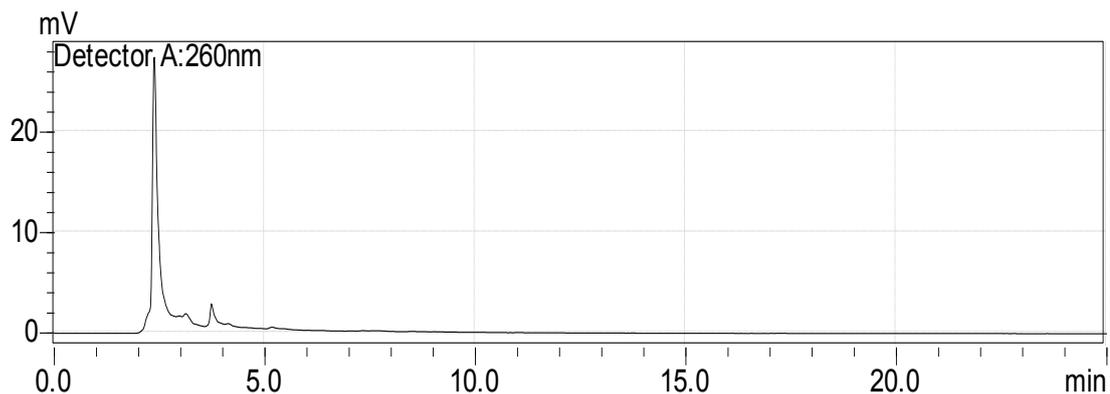
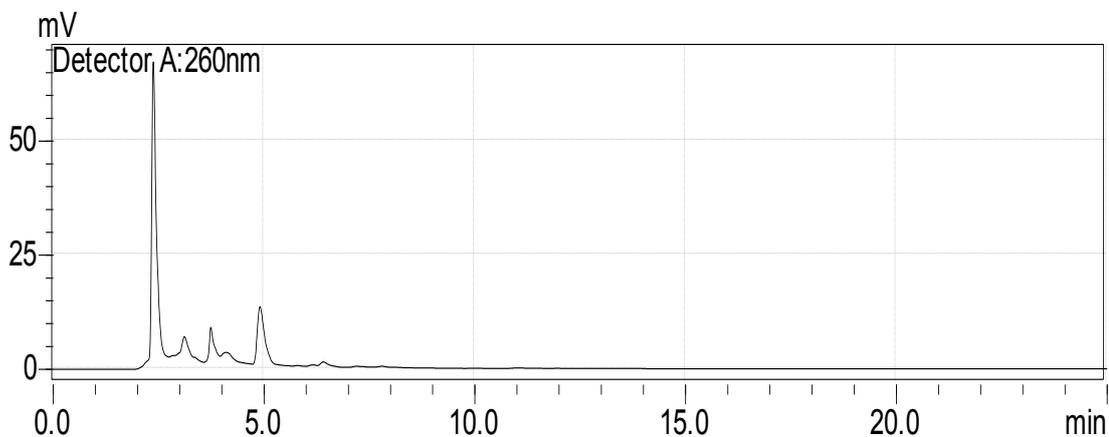


Figure 45: profil chromatographique HPLC d'extrait de la nicotine.

➤ *Nicotiana tabacum*

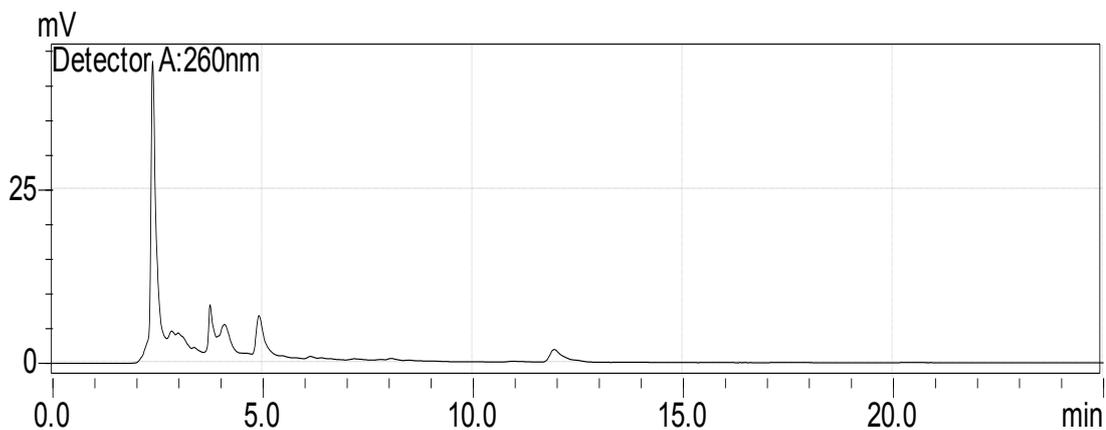
**Figure 46:** profil chromatographique HPLC de la nicotine d'extrait du *Nicotiana tabacum*.

## ➤ Tabac traditionnel



**Figure 47:** profil chromatographique HPLC d'extrait de tabac traditionnel.

## ➤ Tabac artificiel



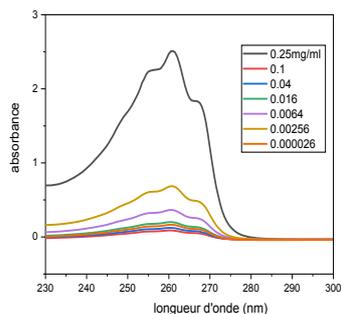
**Figure 48:** Profil chromatographique HPLC de la nicotine d'extrait de Tabac artificiel.

**Tableau 10** : La concentration de la nicotine dans les différents extraits étudiés par HPLC.

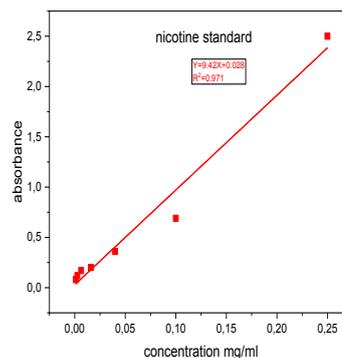
	L'équation	TR	Area	Concentration (mg /g)
<i>Nicotiana Tabacum</i>	$Y=1,702$ $10^7X+181203,5$	2,368	336636	25,8836
Tabac traditionnel	$Y=1,702$ $10^7X+181203,5$	2,369	569458	61,1937
Tabac artificiel	$Y=1,702$ $10^7X+181203,5$	2,369	416752	90,31748

**4- Détermination de la concentration des alcaloïdes :****4-1 Concentration de la nicotine dans l'extrait préparé par rapport à courbe standard de nicotine :****Tableau 11** : résultats des concentrations de nicotine standard (mg /ml) avec les Absorbances

Concentration de nicotine standard (mg /ml)	Absorbance
0,25	2,5
0,1	0,69
0,04	0,36
0,016	0,201
0,0064	0,17
0,00256	0,12
0,00026	0,081



**Figure 49:** Spectre d'absorption UV-Vis de la nicotine standard



**Figure 50 :** courbe d'étalonnage de la nicotine standard

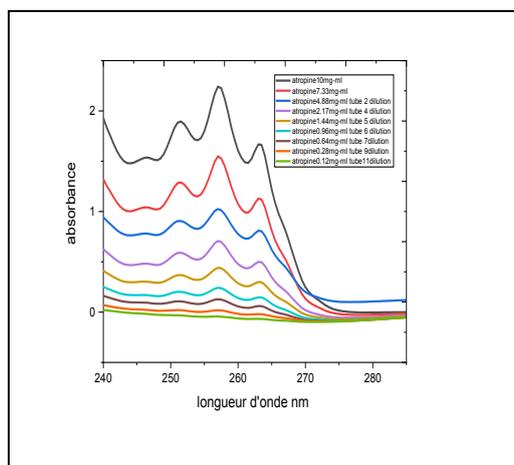
**Tableau12 :** détermination de concentration de la nicotine dans l'extrait préparé par apport au standard la nicotine

Extrait de	Absorbance	Nicotine $Y=9,42x+0,028$	Concentration de nicotine $X / X^{\circ}(\text{mg} / \text{g})$ eq de nicotine
Tabac traditionnel	1,982	0,20	0,01
Tabac artificiel	1,752	0,18 3	0 ,00915
<i>Nicotiana tabacum</i>	2,241	0,234	0,0117

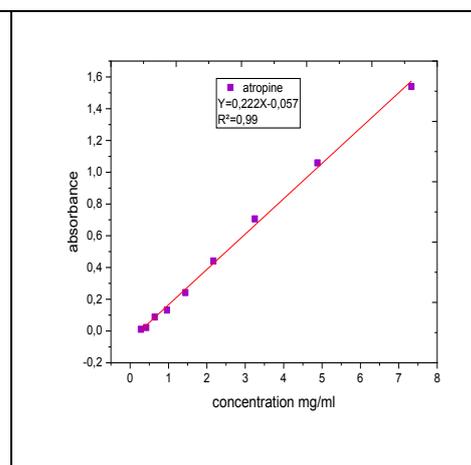
4.2 Concentration de l'atropine dans les extraits préparés par apport au standard l'atropine :

**Tableau 13** : Données spectroscopiques en fonction des concentrations de l'atropine standard (mg /ml)

Concentration de l'atropine standard(mg /ml)	absorbance
7,33	1,54
4,88	1,059
3,25	0,706
2,17	0,441
1,44	0,242
0,96	0,132
0,64	0,088
0,42	0,022
0,28	0,011



**Figure 51** : Spectre d'absorption UV-Vis d'atropine standard



**Figure 52** : Courbe d'étalonnage de l'atropine standard

**Tableau 14** : détermination de concentration de la nicotine dans l'extrait préparés par apport au courbe standard de l'atropine

Extrait de	Absorbance	Atropine $Y=0,222X-0,057$	Concentration de nicotine $X/X^{\circ}(\text{mg/g})$ eq de atropine
Tabac traditionnel	1,982	9,184	0,459
Tabac artificiel	1,752	8,148	0,407
<i>Nicotiana tabacum</i>	2,241	2 10,35	0.517

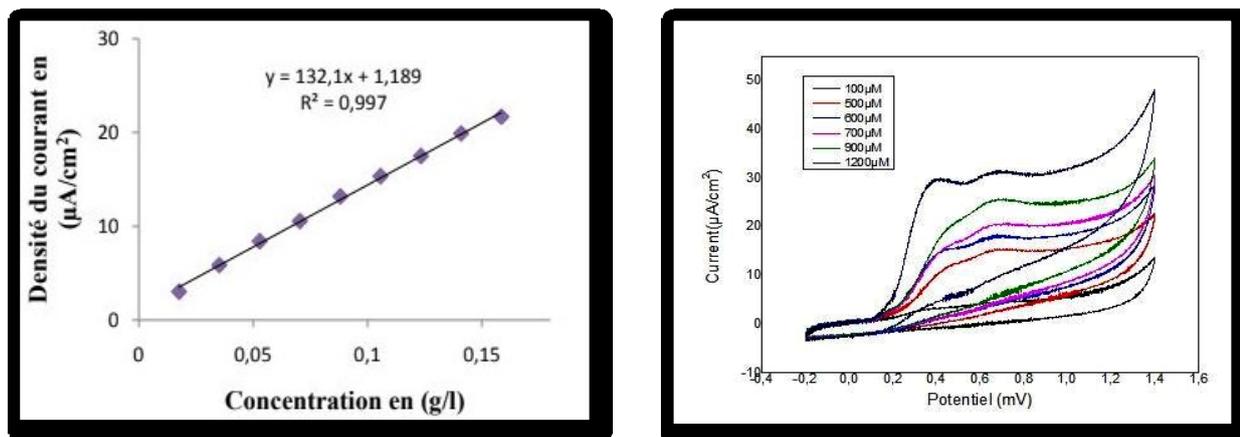
## 5- Etude de l'activité biologique de différents extraits:

### 5-1 Etude de l'activité antioxydant totale AAT

Puisque l'acide gallique est connu pour ses propriétés antioxydants très intéressantes, il est donc utilisé comme standard dans notre étude, nous notons que l'étude est effectuée dans le domaine d'électro activité d'acide gallique pour évaluer l'activité antioxydant de notre échantillon..

#### ❖ Réponse du courant et la courbe d'étalonnage d'acide gallique :

D'après la courbe d'étalonnage, la valeur du coefficient de corrélation  $R^2 = 0,997$  qui est une valeur très exacte, ce qui traduit l'exactitude de cette technique à travers les résultats obtenues.



**Figure 53:** Les courbes d'étalonnage d'acide gallique par la voltammétrie cyclique

la valeur de l'activité antioxydant totale est calculée dans le tableau suivant :

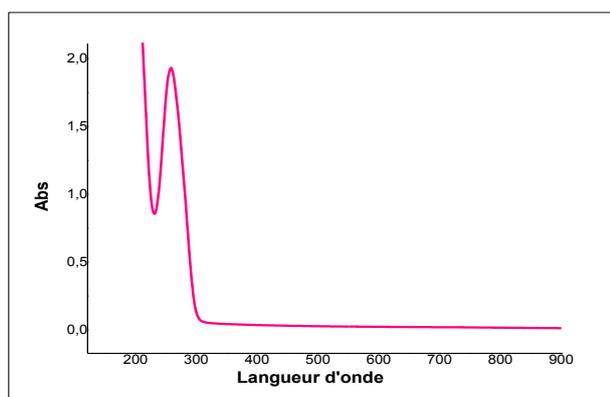
**Tableau 15:** Activité antioxydant totale de différents extraits.

Extrait	Equation	C (g/ml)	I ( $\mu\text{A.cm}^{-2}$ )	E (mV)	C nouvel (mg/ml)	AAT (mg/g)
<b>Tabac traditionnel</b>	$y = 132,1x + 1,189$	0,001	190,301	2,062	1,431582135	1431,58213
<b>Tabac artificiel</b>	$y = 132,1x + 1,189$	0,001	96,576	1,371	0,722081756	722,081756
<i>Nicotiana tabacum</i>	$y = 132,1x + 1,189$	0,001	113,235	1,731	0,848190765	848,190765

### 5-2 Etude de l'activité anticancéreuse :

#### Quantification et analyse de la pureté des échantillons d'ADN

La concentration d'ADN double brin a été déterminée par spectrophotométrie à 260 nm à l'aide de la méthode coefficient d'extinction molaire  $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (exprimé en molarité du nucléotide) selon la loi Beer-Lambert. Le dosage de nos échantillons d'ADN à 260 nm donne des concentrations  $8 \times 10^{-5}$  et  $8 \times 10^{-4}$  mol/l (figure III.14). La pureté d'ADN (exempt de protéines liées) a été évaluée, le rapport A260/A280 était de 1,80-1,90, montrant que l'ADN était suffisamment dépourvu de protéines



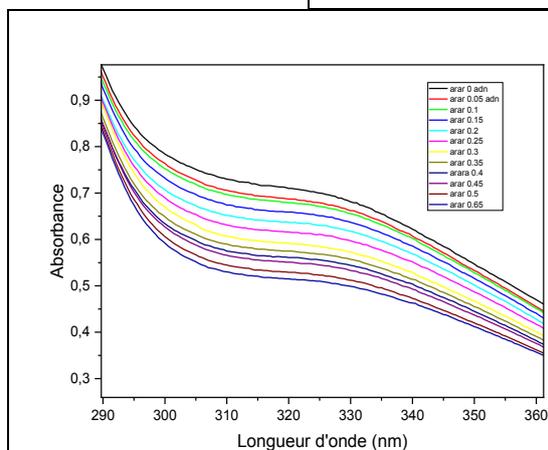
**Figure 54:** Spectre d'absorption de l'ADN.

**Tableau 16:** Représentation des résultats des ratios  $DO_{260}/DO_{280}$  des échantillons d'ADN extrait à partir de leucocytes.

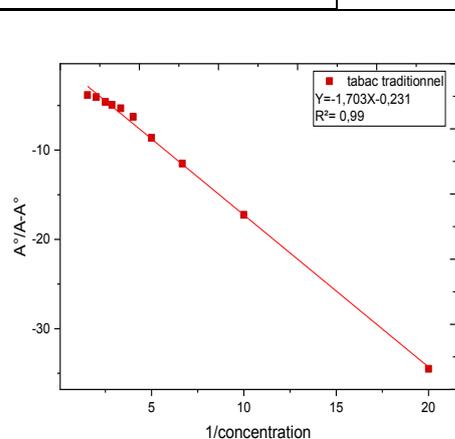
Langueur d'onde	DO AND	
260	1.404	0.281
280	0.793	0.142
Ratio = $DO_{260}/DO_{280}$	1.77	1.97

**Tableau17 :** résultats des valeurs de l'inverse des concertations de l'ADN avec les rapports  $A_0/A-A_0$

1/Concentration ADN	$A^0/A-A^0$
20	-69
10	-34,5
6,66	-7,25
5	-11,5
4	-8,625
3,33	-6,272727
2,5	-5,307692
2	-4,928571
1,53	-4,6



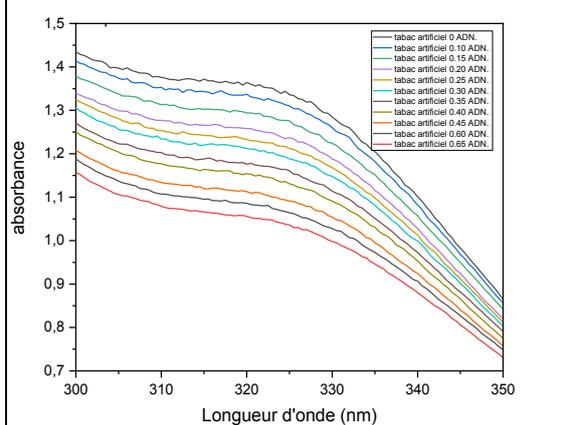
**Figure 55:** Spectre d'absorption UV-Vis de tabac traditionnel en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate pH7.2



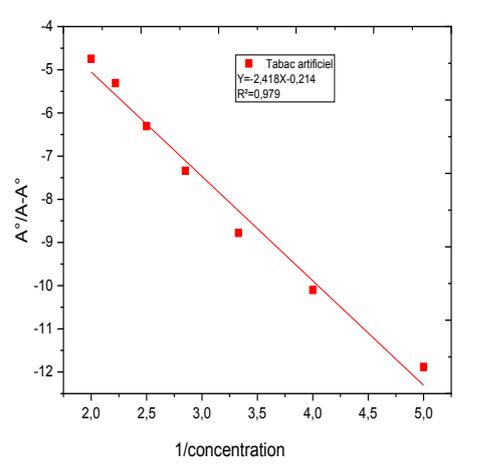
**Figure 56 :** Droite de régression de l'absorbance  $A_0/(A - A_0)$  en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN

**Tableau 18:** Résultats des valeurs de l'inverse de les concertations de l'ADN avec les rapports A0/A-A0

	1/[ADN]	A0/A-A0
	5	-11,88496
	4	-10,09774
	3,33	-8,77778
	2,85	-7,338798
	2,5	-6,305164
	2,22	-5,3083
	2	-4,745583



**Figure57:** Spectre d'absorption UV-Vis de tabac artificiel en absence et en présence de différentes concentrations d'ADN dans un tampon phosphate pH7.2

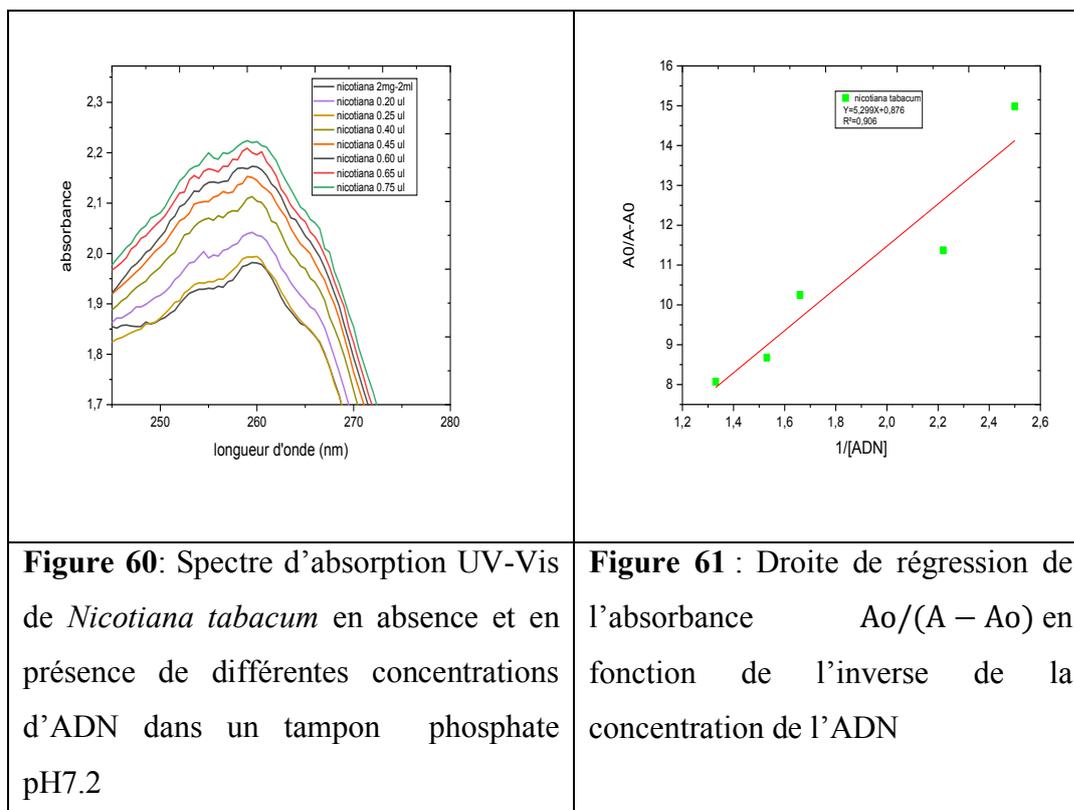


**Figure 58:** Droite de régression de rapport A0/(A - A0) en fonction de l'inverse de la concentration de l'ADN

**Figure59 :** Activité anti cancéreuse de tabac artificiel.

**Tableau 19** : Résultats des valeurs de l'inverse de différents concentrations de l'ADN avec les rapports  $A_0/A-A_0$

1/[ADN]	$A_0/A-A_0$
2,5	14,984848
2,22	11,367816
1,66	10,248705
1,53	8,6754386
1,33	8,0734694



• **Calcul de la constante et l'énergie libre de liaison K et  $\Delta G$**

**Tableau 20:** Valeurs de la constante et l'énergie libre de liaison K et  $\Delta G$  obtenues de différents extraits étudiés à partir des données spectroscopique UV-Vis.

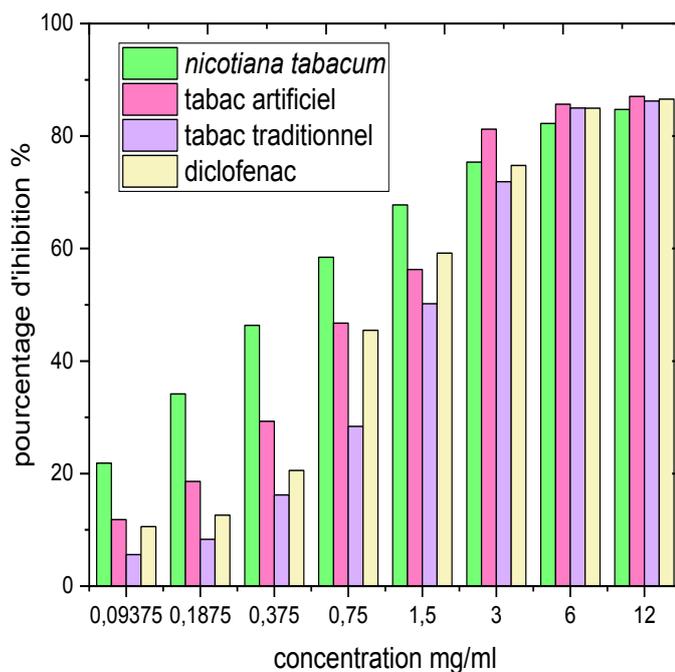
	Equation	K(M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (KJ/mol)
Tabac traditionnel	Y=-1,703X-0,231	24514,448	-25,05894
Tabac artificiel	Y=-2,418X-0,214	406120,76	-32,01946
<i>Nicotiana tabacum</i>	Y=5,299X+0,876	165314,21	-29,791

**5-3 Etude de l'activité anti inflammatoire (test analgésique) :**

**5-3-1-Evaluation de l'activité analgésique des extraits d'alcaloïde totaux**

**Tableau 21:** Etude de l'activité inhibitrice des différents extraits d'alcaloïdes étudiés

Concentration	Pourcentage d'inhibition			
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabac traditionnel	Tabac artificiel	Diclofénac
0,09375	21,87	11,826	5,586	10,589
0,1875	34,155	18,619	8,318	12,627
0,375	46,349	29,288	16,198	20,561
0,75	58,442	46,743	28,389	45,483
1,5	67,768	56,273	50,196	59,178
3	75,374	81,222	71,88	74,776
6	82,247	85,649	84,973	84,959
12	84,742	87,039	86,23	86,569

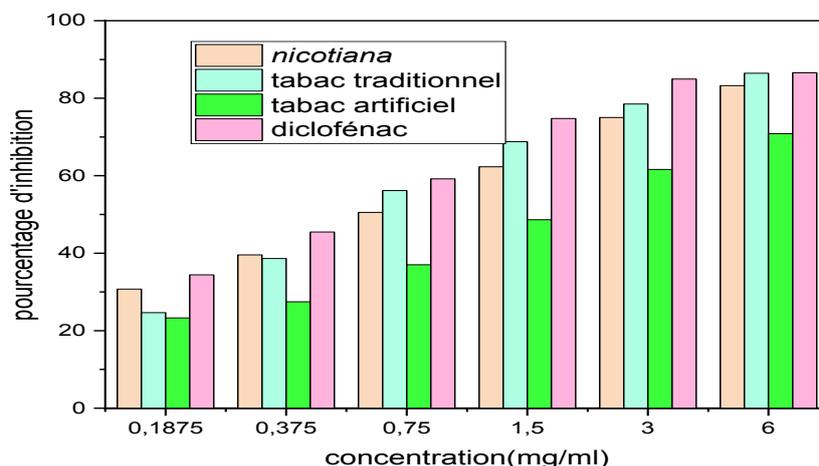


**Figure 62:** Pourcentage d’inhibition de différents extraits d’alcaloïde comparé avec celle de standard Diclofénac

**5-3-2-Evaluation de l’activité analgésique des extraits hydro-éthanolique**

**Tableau 22:** Etude de l’activité inhibitrice des différents extraits hydro éthanolique étudiées

Concentration	Pourcentage d’inhibition			
	Nicotiana tabacum	Tabac traditionnel	Tabac artificiel	Diclofénac
0,1875	30,737	24,665	23,298	34,411
0,375	39,57	38,619	27,467	45,483
0,75	50,536	56,179	37,018	59,178
1,5	62,304	68,78	48,632	74,776
3	75,024	78,498	61,619	84,959
6	83,25	86,458	70,878	86,569



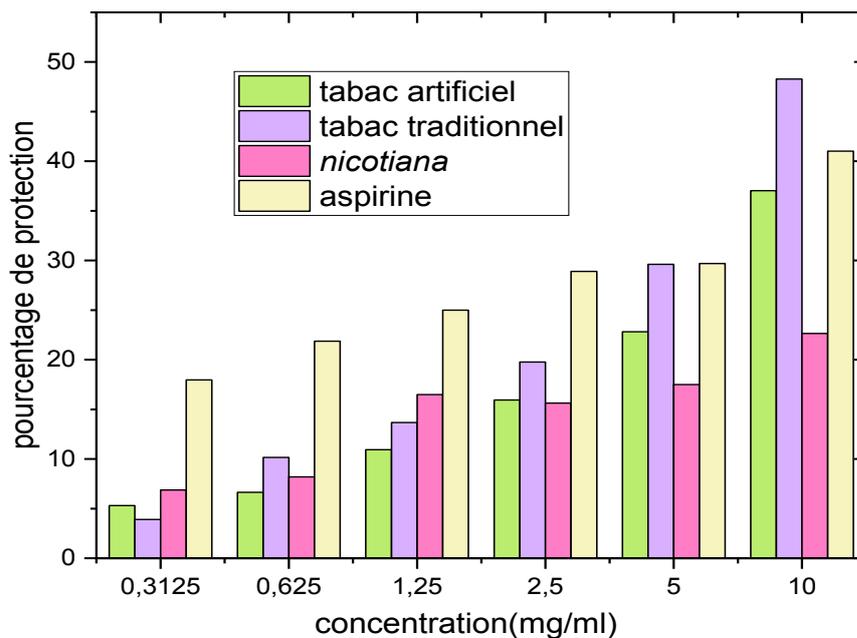
**Figure 63:** Pourcentage d’inhibition de différents extraits hydro éthanolique comparé avec celle de Diclofénac.

**6-Etude de l’activité hémolytique :**

**6-1-Evaluation de l’activité hémolytique des extraits hydro-éthanoliques :**

**Tableau 23 :** Etude de pourcentage de protection des globules rouges d’extraits hydro-éthanoliques.

Concentration	Pourcentage de protection			
	Tabac artificiel	Tabac traditionnel	<i>Nicotiana tabacum</i>	Aspirine
0,3125	5,307	3,906	6,875	17,968
0,625	6,64	10,156	8,203	21,875
1,25	10,93	13,671	16,484	25
2,5	15,937	19,765	15,625	28,906
5	22,812	29,609	17,5	29,687
10	37,031	48,281	22,651	41,015



**Figure 64 :** Pourcentage de protection des globules rouges de différents extraits comparé avec le standard l'Aspirine.

#### 7-Résultat de l'activité anti bactérienne :

L'examen des zones d'inhibition a montré que le décocté ne présente pas d'activité antibactérienne sur *Escherichia Colie*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsilla pneumonie*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonie*. Pour une concentration 100mg/ml de l'extrait, avec un diamètre d'inhibition 0mm ; Les résultats ont montré que les extraits étudiés ne possèdent pas d'activité antibactérienne, ces souches bactériennes testées présentent une résistance vis-à-vis les extraits .



**Figure 65 :** Observation de la zone d'inhibition provoquée par l'antibiotique, DMSO et l'extrait de *Nicotiana tabacum* sur quelques souches bactériennes(photo originale).



**Figure 66:** Observation de zone d'inhibition provoquée par l'antibiotique, DMSO et l'extrait de tabac traditionnel sur quelques souches bactériennes(photo originale).



**Figure 67:** Observation de zone d'inhibition provoquée par l'antibiotique, DMSO et l'extrait de *tabac artificiel* sur quelques souches bactériennes(photo originale).

Tableau 24 : Etude de l'activité inhibitrice de différents extraits étudiés :

Les souches bactériennes	Les extraits			Anti Biotique Gentamicin Ø Mm	Control (-) DMSO
	<i>Nicotianat abacum</i>	Tabac traditionnel	Tabac artificiel		
<i>Escherichia Colie</i>	ND	ND	ND	20	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ND	ND	ND	20	0
<i>Klebsillapneumonie</i>	ND	ND	ND	20	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	20	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ND	ND	ND	20	0

Tous les extraits n'ont pas réagi avec les souches microbiennes testées. On remarque aussi l'absence de pouvoir inhibitrice d'extrait contre la croissance bactérienne comparativement au témoin positif qui a réagi fortement.

## II-Discussion :

Le **tabac artificiel** contient près de 2500 composés chimiques et sa fumée délivre 4000 substances dont 40 sont connues pour être cancérogènes. La fumée comportée également des composés psychoactifs dont la nicotine, agent responsable de la dépendance, ainsi que d'autres composants, ayant une activité inhibitrice de la monoamine oxydase, pouvant interagir avec la nicotine pour augmenter cette addiction. En effet, la plante *Nicotiana tabacum* est utilisée dans le sud algérien comme alternative aux cigarettes commerciales en la mélangeant à parts égales avec la plante *Juniperus* c'est ce qui définit sur le nom : le **tabac traditionnel**.

Les résultats obtenus montrent effectivement une différence significative dans la quantité de la nicotine ainsi que les activités biologiques étudiées. Sachant que le rendement de l'extrait de tabac artificiel a donné un taux de 14,33%, tandis que le rendement de *Nicotiana tabacum* est 4,35%, le rendement de tabac traditionnel est 10,33%.

D'une manière générale le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, la richesse de chaque espèce en qu'il varie selon des facteurs environnementaux, des conditions et la durée de stockage, la période de récolte et la méthode d'extraction appliquée.

- Les résultats de l'analyse phytochimiques effectuées sur les extraits hydro éthanolique (*nicotiana tabacum*, tabac traditionnel, tabac artificiel) ont montrés la présence de certains composés actifs, alcaloïdes, polyphénols, tanins, et coumarine, alors que les saponines sont absentes.

Cependant, les tanins sont responsables des propriétés hémostatiques ; Les alcaloïdes et les coumarines ont une histoire dans les effets pharmacologiques pour leurs effets analgésiques et antispasmodiques et anti ulcère gastrique. Ainsi, les alcaloïdes jouent un rôle détonifiant et un antihypertenseur (Nesba et al,2018).

Les composés phénoliques sont bien connus comme des agents antioxydants et dirigé contre les radicaux libres associés aux dommages oxydatifs. La présence de ces composés, tels que des flavonoïdes, et des polyphénols dans les extraits étudiés susceptibles de donner crédibilité à son utilisation locale pour la gestion d'affection induit par le stress oxydatif.

La caractérisation chromatographique par CCM effectué sur les extraits, montre que tous les extraits donnent quelques taches dans chaque extrait dont une tache avec un RF constant dans les différents extraits correspond à la nicotine qui est utilisé comme référence (fourni de Sigma Aldrich 99% nicotine) dans cette technique avec les différents révélateurs

Dragendorff et UV. En effet, La révélation par UV pu mette en évidence des couleurs correspond aux triterpènes (coloration violet clair), des stérols (coloration bleu) et des tanins (coloration rouge).

La CCM des extraits de ( tabac artificiel, et tabac traditionnel) donnent des taches presque identiques a permis d'identifier les triterpènes , stérols et selon les valeurs de RF et la couleurs de spots, en plus une tache supplémentaire dans l'extrait du tabac artificiels avec Rf (0,636) probablement dû aux autres additifs ajoutés dans le tabac .Tandis que l'extrait de *Nicotiana* montre deux taches, une correspond à la nicotine et une deuxième tache bleu qui indique la présence des stérols .

Les recherches dans l'industrie du tabac sur la nicotine ont guidé la conception des produits au fil des années. Les documents internes prouvent, dès les années 1950, que l'industrie du tabac a mené de nombreuses études sur le rôle et les effets de la nicotine et s'est penché sur la meilleure façon de concevoir des cigarettes capables d'administrer de la nicotine aux fumeurs et d'optimiser ses effets afin de créer et de maintenir une dépendance à cette substance. Les fabricants de tabac utilisent des additifs comme l'ammoniac, le sucre et l'acide lévulinique pour permettre aux fumeurs d'extraire la nicotine du tabac plus facilement, d'accélérer l'absorption de la nicotine au niveau des poumons et de favoriser l'administration de la nicotine au cerveau.

Si la nicotine est le principal composant endogène du tabac, son association avec les caractéristiques de conception des cigarettes et autres produits du tabac modernes accroît le risque d'addiction, dépassant même ceux liés à la cocaïne, à l'héroïne, à l'alcool ou au cannabis

-La concentration de nicotine est plus grande dans Tabac artificiel est estimée à 90,31748 mg /g, Tandis qu'une concentration de 61,1937mg /g dans le tabac traditionnel et 25,8836 mg /g dans la *Nicotiana tabacum* selon les résultats HPLC. En effet la forte concentration en nicotine dans le tabac artificiel confirme la consommation de tabac commercial à des fins récréatives, qui consiste à inhaler la fumée de produits commerciaux à forte concentration en nicotine et en additifs toxiques, est toxicomanogène et nuisible, sachant que le tabac brule à 850°C. La combustion est responsable notamment de la libération de monoxyde de carbone, de goudrons, de particules fines et de nicotine. Le monoxyde de carbone (CO).

En revanche, la présence de la nicotine dans les différents extraits étudié sa été confirmée par les méthodes spectrophotométrie UV visible, et FT-IR.

Concernant les résultats de la caractérisation par méthode FT-IR, nous constatons qu'il existe une grande similitude entre les spectres de la nicotine du tabac traditionnel et du *tabacum* avec le spectre de la nicotine en termes de nombre d'ondes générées et de type de composés contenus, en comparant les spectres de test infrarouge des trois composés étudiés par rapport à la nicotine, alors qu'on constate une différence notable dans la composition du tabac industriel qui contient un certain nombre de métabolites secondaires, et cela se traduit par des pics supplémentaires dans leur spectre

L'activité anti oxydant (AAT) du tabac traditionnel est estimé par la valeur 1431,582mg /g, de *Nicotiana tabacum* est 848,190, tandis que l'AAT du tabac artificiel est plus petite 722,081. Ces résultats sont dû aux additifs toxiques du tabac artificiel tel que : les goudrons, l'ammoniac, CO, DDT (insecticide), cadmium ; qui sont responsable de provoquer un stress oxydatif qui induit le cancer. Nos résultats sont en accord avec les recherches de Verschueren et al,2012 expliquent dans leur travail que la fumer est associé à une augmentation des capacités à générer des radicaux libres et à une diminution également des capacités antioxydants. Le stress oxydatif, causé par la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels que l'anion super oxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et/ou le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ces espèces sont produites par des voies biochimiques incluant plusieurs enzymes : la xanthine oxydase (XO), l'oxyde nitrique synthétase (INOS). Mais en contrepartie, il existe un système antioxydant qui inclue les peroxydes dismutasse (SOD) ou le glutathion (GSH), ils permettent l'élimination des espèces réactives de l'oxygène et permettent de protéger les cellules du stress oxydatif. Tous ses mécanismes se régulent afin qu'il n'y ait pas d'effet pro ou anti oxydant trop important et évitent les dommages tissulaires, cellulaires et au niveau de l'ADN. Cependant, la fumée de cigarette peut interférer avec ces mécanismes et causer de nombreux dommages. D'autre étude sur la cigarette artificielle de (Guo X. et al, 1999), montre les effets de la fumée de cigarette sur les colites induites par substances chimiques permettent de montrer l'impact du tabagisme sur le stress oxydatif augmente l'activité de la MPO (myélopéroxydase), INOS (oxyde nitrique synthétase).

Les résultats de l'activité anticancéreuse obtenues montrent une significative avec les résultats de l'activité antioxydant, selon les valeurs de l'énergie libre ( $\Delta G$ ) de différents extraits étudiés sont respectivement : **Tabac traditionnel (-25,058)**, **Nicotiana tabacum (-29,971)**, **Tabac artificiel(-32,019)** ; **comme** nous savons que l'ordre de grandeur de ( $\Delta G$ ) moins-30 indicateur d'une réaction spontané par des liaison électrostatique de type physique. en effet, le tabac traditionnelle et la nicotiana montrent une activité anti tumoral traduit par

les valeur de l'énergie libre dans l'action d'interaction extrait d'ADN, tandis que le tabac artificiel a une activité tumoral traduite par la valeur de l'énergie libre de Gibbs supérieur à -30 cela indique que la réaction entre l'extrait et l'ADN se fait pas une liaison, chimique qui permet de développer une altération de la structure d'ADN et donc la prolifération successive de ce dernier génèrent un effet pro-oncogènes . Sachant que les additifs du tabac commercial comme le benzène et le benzopyrène sont cancérigènes par leurs propriétés d'agents intercalant de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (**HAS, 2015**).

D'un autre part, les résultats de l'activité anti inflammatoire des extraits bruts et extraits des alcaloïdes totaux ont montré que les extraits de la *Nicotiana* et du tabac traditionnel ont une activité anti inflammatoire puissant comparé avec le standard le Diclofénac. En effet cela est due probablement aux alcaloïdes contenus dans ces deux extraits, précisément la nicotine, cependant la nicotine la nicotine possède aussi des propriétés immunosuppressives de même que l'hydroquinone et le monoxyde de carbone. Il semblerait que les effets immunosupresseurs de la nicotine seraient due à son action sur le récepteur nicotinique à l'acétylcholine et notamment la sous-unité alpha 7. La nicotine est un agoniste cholinergique qui se lie et active les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, exerçant des activités anti-inflammatoires in vitro et in vivo (**Goncalves et al, 2011**). L'activation de ces récepteurs a montré que la production de cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 étaient réduites, supprimant les réactions Th1 et Th17 mais pas Th2. Il a été au semis en évidence que la nicotine réduisait le taux d'IL-6 inflammatoire (**Arson et al, 2010**). En revanche, l'extrait de tabac commercial ne montre d'ailleurs pas une activité puissante cela est dû probablement au produits toxiques dans la composition de tabac, ces résultats sont comparables avec les travaux de (**Begon et al, 2015**) qui confirme l'effet pro-oxydant et inflammatoire du tabac commercial qui augmentant la peroxydation des lipides (oxydation des lipides insaturés entraînant des dommages tissulaires) et générant des radicaux libres, entretient les lésions inflammatoires muqueuses dans la cas des colite .

Cependant, Les cellules inflammatoires produisent de nombreux médiateurs en réponse à la fumée de cigarette. Le tabac possède une action à la fois pro-inflammatoire et anti-inflammatoire via son action au niveau des médiateurs de l'inflammation. Le tabagisme induit une réaction inflammatoire qui se traduit par une augmentation des taux circulants de facteurs tels que les leucocytes, le fibrinogène et la C-reactiveprotéine (CRP). Ces éléments inflammatoires sont connus pour être associés aux accidents cardio-vasculaires et aux morts subites. Le tabac affaiblit les réponses immunitaires de type cellulaire en réduisant l'activité

---

des cellules NK (Natural Killer). En effet La fumée de cigarette administrée à des souris pourrait favoriser le développement des cancers du poumon du fait de cet effet inhibiteur de la fumée sur les cellules NK (**Louis E. et al, 2012**).

Concernant les résultats l'activité anti hémolyse le pourcentage de protection de tabac traditionnel est varié entre 3,906% et 48,281 %et celui de la *Nicotiana tabacum* c'est entre 6,875% et 40,651% ces résultats sont comparable avec le standard l'aspirine qui varie entre 17,96 % et 41,015%,Alor que pourcentage de protection du tabac artificiel est entre 5,3% et 37,03% nous constatons que ce dernier a enregistré une faible concentration cela dû aux additifs toxiques qu'il contient .Les données obtenues militent en faveur des résultats d'une étude antérieure menée en Suède ayant montré que la cigarette était associée à un risque accru de sclérose en plaques (SP), mais que ce risque était diminué chez les amateurs de tabac à chiquer. Ces observations permettent de croire que les substances contenues dans la fumée du tabac, outre la nicotine, peuvent influencer sur le risque de sclérose en plaques (SP).

Des études à venir porter ont sur d'autres substances dont la composition chimique ressemble à celle de la nicotine, activant les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, qui pourraient ouvrir la voie à de nouveaux traitements contre la de sclérose en plaques (SP) (**Laughlinet al, 2016**).

En fin, l'activité antibactérienne les résultats montrent que les extraits préparés n'a aucun effet inhibiteur sur la croissance des souches bactériennes testées (*Escherichia Colie* , *Pseudomonas aeruginosa*, *Klepsilla pneumonie*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de (**Ghanem et al, 2008**)et (**Nesba et al,2018**) qui montre que l'absence du pouvoir antibactérien des extraits (hydro éthanolique et alcaloïde) pourrait s'expliquer par l'absence des principes actifs doués d'une activité antibactérienne. La membrane externe de l'enveloppe cellulaire des bactéries à GRAM négatif semble constituer une barrière efficace à haut niveau de résistance (**Nesba et al,2018**).

## *Conclusion générale*

## **Conclusion et perspectives**

Le tabac est un psychotrope, c'est-à-dire une substance qui agit sur le psychisme d'un individu en modifiant son fonctionnement mental. Il appartient à la classe des stimulants du système nerveux central (SNC). Son principe actif, la nicotine est utilisée dans la préparation des produits qui peuvent être utilisés comme anti-inflammatoire, anti-hémolyse et comme stimulant.

Le présent travail a pour objectif d'étudier l'évaluation de la quantité de la nicotine et de l'activité cancérigène des différentes sources du tabac traditionnel et commercial. Dans cette étude nous avons fait une comparative entre trois formes de tabac à savoir tabac commercial, tabac traditionnel et la *Nicotiana*.

En effet, la concentration en nicotine dans les trois extraits a été calculée. Les résultats montrent que le tabac traditionnel contient 0.01mg/g de la nicotine et 61,1937mg/g dans l'extrait de la *Nicotiana tabacum* et 90.31748 mg/g dans le tabac artificiel. En revanche ces résultats ont été confirmés par la méthode HPLC.

Au cours de cette étude, nous avons également étudié l'effet de chacun des extraits précédents et leur utilité en tant qu'activités biologiques. Nous avons remarqué que la *Nicotiana* et le tabac traditionnel ont des effets anti-inflammatoires et anti-hémolytiques, tandis que l'extrait de tabac commercial n'a pas prouvé ces activités. Cependant, l'activité anticancéreuse dans la *Nicotiana tabacum* et du tabac traditionnel montre une bonne activité antitumorale, mais les résultats sont inversés pour le tabac commercial. L'activité antibactérienne n'a montré aucun effet antibactérien vis-à-vis les trois types.

A partir des résultats obtenus, nous concluons que le tabac traditionnel, il n'a aucun mal à la santé humaine parce qu'il ne contient pas de substances cancérigènes, contrairement au tabac commercial car il contient des additifs (goudron, monoxyde de carbone métaux lourds) qui prouvent leur toxicité et leur gravité sur la santé humaine dont son effet tumoral.

Nous recommandons de donner aux fumeurs une alternative théoriquement moins dangereuse au tabac pour leur santé, du fait de l'absence de combustion du tabac, il faut peser le risque d'attirance envers les jeunes et les non-fumeurs, ainsi que le risque de normalisation de fumer. Nous recommandons également l'utilisation de cette plante de tabac dans les recettes médicinales car elle est surtout connue pour ses vertus médicinales : elle a été utilisée pour

## *Conclusion générale*

---

soulager la fatigue, soulager les piqûres d'insectes, et combattre les maux de dents et la douleur en général. Anti-stresse et analgésique, mais aussi coupe-faim

En perspectives, nous devons faire la séparation de la nicotine de ces trois extraits afin de confirmer nos résultats par RMN et Spectroscopie des masses

Il serait très intéressant de faire le dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans la nicotine et le tabac traditionnel pour confirmer leur effet antioxydant.

Ainsi, une étude *in vivo* sur des rats albinos peut confirmer ces activités biologiques.

Enfin, l'étude de l'interaction entre la nicotine et des molécules biologiques comme l'ADN, la BSA, l'alpha-amylase et avec des toxines comme le venin de scorpion ou de serpent par Docking moléculaire, peut nous donner plus d'information sur son effet biologique

# *Références*

### Références bibliographique :

1. **A . Sevic et coll.CZ, Chem.Com**, 13 (1948) 349.
2. **Aicha ADAYKA** , (2020).Etude de l'activité antimutagène des dérivés synthétiques chapitre 3.Thèse de doctorat. P 73.
3. **Anadriamobololona T.** (2010). Etudes biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas du forêt d'Ankafobe. Mémoire d'études approfondies de biochimie.55p.
4. **Aref, M,& Heded ,M..** (2015). Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf). En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Biochimie Appliquée . Université Echahid Hamma Lakhdar , El OUED. P20.
5. **Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H.** Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun.* mai 2010;34(3):J258-65.
6. **Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H.** Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun.* mai 2010;34(3):J258-65.
7. **Azzi, A, Davies, K.J.A,Kelly,F.**(2004).Free radical biology –terminology and critical thinking. *FEBS Letters.* 558:36.
8. **B. Le Gorrec** "Thermodynamique et cinétique électrochimique expérimentale" Edt. Masson. Paris (2005).
9. **Badiaga, M.** (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali.
10. **Baril,D.**(2007).les oncogènes brisent la molécule d'ADN : Une découverte de Gerardo Ferbeyre permet de mieux comprendre un mécanisme naturel de protection contre le cancer. *FORUM* : 41(17).
11. **Begon J, Juillerat P, Cornuz J, Clair C.** Tabagisme et système digestif : une relation complexe. Partie 1 : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et consommation de tabac. *Rev Med Suisse.* 2015;11(478):1282-7.
12. **Bennett RN, Wallsgrove RM.** (1994). Secondary metabolites in plant defense mechanisms.*Tansley.*
13. **Bennett RN, Wallsgrove RM.** (1994). Secondary metabolites in plant defense mechanisms.*Tansley Review No. 72 .new Phytol.*127, 622-623
14. **Benowitz NL, Hukkanen J et Jacob** - Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Hand Exp Pharmacol.* 2009 ; 192 : 29–60.

15. **Benowitz NL, Jacob P et Savanapridi C** - Determinants of nicotine intake while chewing nicotine polacrilex gum. *Clin Pharmacol Ther.* 1987 ; 41 : 467-473.
16. **Berlin I.** Pathophysiological rational of smoking cessation drug treatments: present and futur developments. *Lett Pneumol.* 11(2):84- 9.
17. **BERNAOUI, Y,& LOUETRI, K.** (2018). Caractérisation phytochimique du Genre *Origanum* et leur bioactivités.
18. **Bidie, A.P, N'guessan, B. B, Yapo, A. F, N'guessan, J. D. & Djaman, A. J.** (2011). Article Original Activités Antioxydantes De Dix Plantes Médicinales De La Pharmacopée Ivoirienne. *Sciences & Nature* Vol. 8 N°1: 1 – 11.
19. **Boubakri, N,** (2014). Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout . Mémoire de MASTER ACADEMIQUE en Biochimie Appliquée. Université KASDI MERBAH, Ouargla, Algérie P15.
20. **Boudjouref ,M,** (2011). Etude De L'Activité Antioxydante Et Antimicrobienne D'Extraits D'artemisia Campestris L. Thèse De Magister En Biochimie. Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 99 P
21. **Boudy P,** 1950 *Economie forestiere Nord-Africaine.* Monographie et traitement des essences .Ed .Larose . Paris. p.p .29.
22. **Bourgou, Beji, Medini, & Ksouri,** 2016; Erdemoglu, Ozkan, & Tosun, 2007). Activités biologique-
23. **Bruneton J.** (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.* 3ème Edition
24. **Bruneton J,** 1993- *Pharmognosie et phytochimie, plantes médicinales,* Tec et Doc La voisier,
25. **Butt, M. S, Pasha, I, Sultan, M. T, Randhawa, M. A, Saeed, F, & Ahmed, W.** (2013). Black pepper and health claims: a comprehensive treatise. *Critical reviews in food science and nutrition,* 53(9), 875-886.
26. **C Azevedo, B, Roxo, M, C Borges, M, Peixoto, H, Crevelin, E. J, W Bertoni, B, S Pereira, A. M.** (2019). Antioxidant activity of an aqueous leaf extract from *Uncaria tomentosa* and its major alkaloids mitraphylline and isomitraphylline in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules,* 24(18), 3299.
27. **Ceretta, L.B. , Réus, G.Z. , Abelaira, H.M. , Ribeiro, K.F, Zappellini ; G, Felisbino, F.F. , et Quevedo ,J.** (2012). Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Experimental diabetes research ,* 1-8.
28. **Chloé Gandoin ;** (2013). *La dépendance au tabac Toxicologie.* document. p 6,7.
29. **Clere N.** Pour une année sans tabac. *Actual Pharm.* févr 2011; 50(503):33 ,5

30. **COLOMB. F**, HPLC: Principe et Appareillage, Rouen (2016).
31. **Constance Hammond**,(2022).Tabac.U29 INSERM .Article
32. **Cooke MS, Evans MD , Dizdaroglu M, Lunec J.**(2003).Oxidative DNA damage : mechanisms, mutation, and disease.FASEB J.17(10): 1195-1214.
33. **D. Huang, B. Ou, R. L. Prior**, 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric & Food Chem, 53, 1841-1856.
34. **Davies MJ**, (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. Biochem Biophys Res Commun. 305(3): 761-770 ;another way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition Clinique et Métabolique. 20, 165- 177
35. **Dean ,R.T, Fu, S, Stocker, R, Davies , M.J.**(1997).Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. Biochem J. 324(Pt 1): 118.
36. **Diallo B**, Etude du tabagisme en milieu scolaire fondamental chez les eleves de 12 a 21 ans dans les centres d'animations pédagogiques du Distict de Bamako. Thèse Pharmacie N 56, Bamako, 2005.
37. **Dr. M. Ahmed Azi** , 2001.Le Tabagisme. Service de pneumologie CHU de Sétif. P 01. *Ethnopharmacology*. 100, 80-84.
38. **Fangchinoline**,*Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 25(1), 44-53.
39. **Favier . Alain** , (2003).le stress oxydant , Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique ; mécanisme biochimique P 109-113.
40. **-Freney J, Renaud F, Leclerc R, Riegel P**, 2007. Précis de bactériologie clinique.1Ed. Alexandre lacassagne et ESKA, 2ème édition, 795-910, 1037-1093, 1121-1148 -33 Nauciel C, Vildé J.-L, 2005. Bactériologie médicale. Ed. Masson, 2ème édition, 772-142.
41. **Ganem S, et El-Magly U**,2008 -Antimicrobial activity and tentative identification of active compounds from the medicinal Ephedra alata male plant.ITU Med SC.
42. **Gaston B**, 1990-La grande flore en couleurs (la flore de France) Edit. Belin. Tome I,II,III,IV,index. Paris. France.
43. **Ghniimi, W. (2015)**. Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées:RicinuscommunisRicinus et Jatropha curcas. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acetylcholinestérase. Thèse de Doctorat, Université de la Lorraine (France) et Université de Carthage (Tunisie).p 50, 51.
44. **Gobbi, R. & Khebbaz, W**, (2014). Traçabilité De L'identification Des Métabolites Secondaires Végétaux. Memoire De Licence, Universite Kasdi Merbah

- D'ouargla, Algérie.
45. **Grando, S. A.** (2014). Connections of nicotine to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14(6), 419-429.
  46. **Guessoumi Hamadi.** Les alcaloïdes : Extraction, Caractérisation et Dosage,(2015) , Polycopé de cours.10P
  47. **Guignard, J. L.** (2000). *Biochimie végétale*. 2ème édition .Edition Dunod, Paris, pp 198-207.
  48. **Guo X, Wang WP, Ko JK, Cho CH.** Involvement of neutrophils and free radicals in the potentiating effects of passive cigarette smoking on inflammatory bowel disease in rats. *Gastroenterology*. oct 1999;117(4):884-92.
  49. **Halliwell, B, Aruoma ,O.I.**(1993). DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement using chromatographic methods. In *Molecular Biology of Free Radicals Seavenger System*.(JG Scandalios, ed ). Cold Spring Harbor Laboratory press. New York.47, 67.
  50. **Hamid EL-Haoud, | Moncef Boufellous , Assia Berrani, HindTazougart, Rachid Bengueddour,** PHYTOCHEMICAL SCREENING OF A MEDICINAL PLANT: *Mentha Spicata* L, Université Ibn Tofaïl , Département de Biologie , Laboratoire de Biochimie, Biotechnologies, Santé et Environnement, Kénitra, Maroc, 2018.
  51. **Haoulia Amina,** (2015), Tests phytochimiques, dosage et recherche d'effet hémolytique des polyphénols totaux extraits de la partie aérienne d'*Ammoïdes verticillata*, Mémoire En vue de l'obtention du diplôme Master en biologie, université abou bekr balkaid, p21.
  52. **Harbone J.B,** 1993- *Introduction to Ecological Biochemistry*, 4th Ed; Academic Press,
  53. **Harborne JB,** 1998. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of Plants analysis*. Third Edition. pp : 203-214.
  54. **Hartmann, T,** (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. p68,2831–2846.
  55. **HAS.** Dépistage du tabagisme et prévention des maladies liées au tabac- Janvier 2015
  56. **HAS.** Dépistage du tabagisme et prévention des maladies liées au tabac- Janvier 2015 [Internet]. [cité 13 déc 2016].
  57. **Herman, A,& Herman, A. P.** (2013). Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin pharmacology and physiology*, 26(1), 8-14.
  58. **Hesse M.** (2002). *Alkaloids: Nature's Curse of Blessing?* . Ed: WILEY-VCH. 1-12p.
  59. **Hukkanen J.** Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacol Rev.* 1 mars 2005;57(1):79- 115.

60. **Kadri, S. R., & Chaouche, S. (2018).** La remontée des eaux dans la région du Souf: Une menace sur un écosystème oasien. *Les Cahiers d'EMAM. Études sur le Monde Arabe et la Méditerranée*, (30).
61. **Kehrer, J.P., and Lund, L.G. (1994).** Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17,65-75.
62. **Klaus R, 1991-**Les plantes d'Afrique du Nord.
63. **Koehler-Ramonatxo C. (2006)** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et Métabolique*. 20, 165- 177
64. **Kolak, U, Öztürk, M, Özgökçe, F, & Ulubelen, A. (2006).** Norditerpene alkaloids from *Delphinium linearilobum* and antioxidant activity. *Phytochemistry*, 67(19), 2170-2175.
65. **Krief, S (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Muséum national d'histoire naturelle - MNHNPARIS.
66. **Kuete V, Beng P, Etoa FX, Modjo SL, Bogne P, Assob JC et Lontsi DB. (2004).** Activités antimicrobiennes de l'extrait total et des fractions de jus de fruits de *Citrus Medicalin* (Rutaceae). *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 13,91-94.
67. **Lai, L.-S, Chou, S.-T, & Chao, W.-W. (2001).** Studies on the antioxidative activities of *Hsiansao* (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 963-968.
68. **LAUGHLIN, S, et coll.** « Infiltration of CCR2+Ly6Chigh proinflammatory monocytes and neutrophils into the central nervous system are modulated by nicotinic acetylcholine receptors in a model of multiple sclerosis », *Journal of Immunology*, 2016; doi:10.4049/jimmunol.1501613 [diffusion en ligne avant impression]
69. **Layten Davis D, Nielsen MT; (1999).** Tobacco production, chemistry and technology Preface, Oxford: Coresta.
70. **Le Minor L, Véron M, 1989.** Bactériologie médicale. Ed. Médecine sciences Flammarion, 2ème édition, 389-450, 555-587.
71. **Louis E, Van Kemseke C, Latour P, Belaiche J, Reenaers C.** Genétique et environnement dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Rev Médicale Liège [Internet]*. 2012 [cité 7 juill 2016];67(5-6).

72. **Mansor, S,** (2015). Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales :Artemisiaabsinthium L , Artemisia herba alba Asso et Hypericum scarboides- Etude in vivo .Université, Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf. P19.
73. **Maolin Wang** 1,2,3, Yuanyuan Yu 1,2,3, Chao Liang 1,2,3, Aiping Lu 1,2,3,\* and Ge Zhang 1,2,3,\* (2017).ReviewRecent Advances in Developing Small MoleculesTargeting Nucleic Acid International Journal o f Molecular Sciences Medicinal Chemistry & Drug Discovery
74. **Mesli Lotfi , Sta ; bouli Hassiba , Ben Mansour. B,** Theme Contribution a l'étude du cortège floristique de l'espèce Juniperus oxycedrus (Cupressqcees ) dans la région Tiemcen,Université Abou Bekr Belkaid Faculte des Sciences de la Nature et de la vie Et Science de la terre et de l'Univers,2015 ,p11.
75. **Ministère de la santé de l'hygiène et de la prévention du Sénégal,**Plan d'action nationale de lutte contre le tabagisme. 2002-2007; P13.
76. **Ministère de la santé de l'hygiène et de la prévention du Sénégal.** Plan d'action nationale de lutte contre le tabagisme. 2002-2007 ; P13. Le maladies cardiovasculaires (Mss 2007)
77. **Mohamed BEN AMAR et Nancy LEGARE,** (2006). Le tabac à l'aube du 21<sup>e</sup> siècle. Le Centre
78. **Mohamed BEN AMAR et Nancy LEGARE,** (2006). Le tabac à l'aube du 21<sup>e</sup> siècle. Le Centre québécois de lutte aux dépendences. p 09.
79. **Mohamed CHENNI;** (2010).Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale :Bryonia dioica Jacq. Mémoire de magister. p :50,51,52.
80. **Mohammedi, Z,** (2013). Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat." *Substances naturelles, Activités Biologiques et Synthèses*". Université Abou BekrBelkaid – Tlemcen, p.52.
81. **Morelle,J , et Israerl , L.**(2003). L'oxydation des aliments et la santé. *Edition Ipression Librairie F-X de Guibert*,pp :257.
82. **Muhammad sirajuddin, Saqip Ali, Amin Badshah.**(2013) Drug-DNA interactions and their study by UV visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. Journal of photochemistry and photo biologie b biology 124,1-19.
83. **Muster, D.** (2005). Médicaments de l'inflammation. EMC-Stomatologie, 1(1), 21-29.
84. **Nafees Muhammad and Zijian Guo**(2014). Metal-based anticancer chemotherapeutic agents Chemical Biology 2014, 19:144–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.003>

85. **NESBA Safa et HENKA Fatma**, (2018). Evaluation des activités biologiques de la plante médicinale *Ephedra alata* de la région d'El Oued (In vitro et In vivo). Mémoire de master. p03 ,04.
86. **Nicolas , M, et Daniel,C.**(1998). Activités technologique en microbiologie –Techniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'Aquitaine- Bordeaux , pp :152.
87. Nicotine. In : International Programme on Chemical Safety (IPCS) Inchem.
88. **Nouredine, B, Yacine, B,& Fadila, M.-B.** (2013). Evaluation of erythrocytes toxicity and antioxidant activity of alkaloids of *Fumaria capreolata*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2), P770-P776.
89. **Novelli,G.P.**(1997). Role of free radicals in septic shock. *Jphysiol Pharmacol*,48,517-527.
90. **Orisatoki R**, The public health implications of the use and misuse of tobacco among the Aboriginal in Canada. *Glob J Health Sci* 2012;5(1): 28-34.
91. **Ouverture du Centre Régional d'Oncologie de Laâyoune ;(2021).**
92. **Panaiva, L , (2006)**. Les techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites. Conférence Eurocopter, pp 2-24.
93. **Patel D, Desai S.**2016. Phytochemical screening, in vitro anti-microbial and anti-inflammatory activity of methanolic extract of *aster lanceolatus* willd leaves. *International Journal of Medicine Research*, 1(1): 26-30.
94. **Paterson, D. L,** (2006). Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American journal of medicine*. Vol. 34, N°. 5, pp. 25-33.
95. **Pekking, A, Picand, B, Hacene, K, Lokie F.& Guerin ,P,** (1987) . Oligimères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. Artères et Veines. Publications médicales AGCF. Vol. (6) .pp512-513.
96. **Peter , K, Vollhardt , C, Schore, N,** "Traité de chimie organique ", 4<sup>ème</sup> Ed. De Boeck , Bruxelles, 2004,p.444-49.
97. **Pincemail, J, Lecomte , J, Collart, E, Castiaux , J.P. and Defraigne , J.O.**(2003). stress oxidant , antioxydants et exercice physique . MEDECINE INTERNE. Vaisseaux, Cœur, poumons. 8.1-3.
98. Polycopé de-**Dr. M. Ahmed Azi** , 2001.Le Tabagisme. Service de pneumologie CHU de Sétif. P1
99. **Professeur Jean-Louis Cuq.** Cours chromatographie liquide, Université Montpellier (2001), p4

100. Québécois de lutte aux dépendances , p 09.
101. Quezel P. et Santa S,(1962-1963) – Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. C.N.R.S. Paris. Tome I (1962), tome II (1963), Vol. 1170 p.
102. R. Nicholson, I. Schain, *Anall. Chem*, 36 (1964) 706.
103. Rathisre, P. R, Mohan, R et Murugesan, K. 2013. In-vitro Anti-Inflammatory Activity of Methanolic Root Extract of Erythrina Indica Lam. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, 3(4): 48-51.
104. Raven, H, Evert, R.F. & Eichhom ,S.E. (2000). *Biologie Végétale* (6<sup>e</sup> Ed).(B.Jules, Et M Charles, Trad.).Paris.
105. Reshma et al. 2014. In vitro anti-inflammatory, antioxidant and nephroprotective studies on leaves of Aegle marmelos and Ocimum sanctum. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(4): 121-129.
106. **Review No. 72** .new *Phytol*.127, 622-623(Rodney et al, 2000). Rodney C, Kutchan TM et Lewis NG. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R.Jones,(Eds), American Society of Plant Physiologists, pp.
107. Rios MJ, Recio MK. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of*
108. Rodney C, Kutchan TM et Lewis NG. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, (Eds.), American Society of Plant Physiologists, pp.1268-1277.
109. Rousselet, M, Vignaud, J, Hofman, P, & Chatelet, F. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3). Copyright AFECAP, 1-75.
110. [sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-06/referentiel\\_tabac.pdf](http://sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-06/referentiel_tabac.pdf)
111. [Sante.lefigaro.fr/mieux-etre/tabac-alcool-drogues/tabac-differents-types](http://Sante.lefigaro.fr/mieux-etre/tabac-alcool-drogues/tabac-differents-types)
112. Scazzocchio, F, Cometa, M, Tomassini, L, & Palmery, M. (2001). Antibacterial activity of Hydrastis canadensis extract and its major isolated alkaloids. *Planta medica*, 67(06), 561-564.
113. Skoog, D.A, West, D.W. , Holler , F. J, Buess-Herman, C, " *Chimie analytique* " , Ed. De Boeck, Bruxelles, 1997, p. 557-63.
114. **Smokeless tobacco and some tobacco specific N-nitrosamines**. IARC Monographs of the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 89, IARC ; 2007
115. Sylla Ousmane, Le tabagisme chez le personnel socio sanitaire du CHU Gabriel Touré de Bamako. Thèse médecine, Bamako 2009.
116. **Synthèse du PNPCC, (2010-2019)**.

117. **Tchuindem Stephanie Flaviette**, Impact du tabagisme chez les lycéens du district de Bamako. Thèse Médecine, Bamako, 2002.
118. Technique et documentation Lavoisier. P : 784-873.
119. **TELAIDJI Ahmed.N** ,2018.caracterisation chimique et activités biologiques (*in vitro* et *in vivo*) de l'extrait méthanolique de *juniperus phoenicea.l*.Memoire de master.P14.
120. **Touhami Lanez,Hanane Benaicha, Elhafnaoui Lanez &Makhtar Saidi**, (2017): -12 Electrochemical,spectroscopic and molecular docking studies of 4-methyl -5-((phenylimino)methyl)-3H3 and 5-(fluorophenyl)-3H-1,2-dithiole-3-thione interacting with DNA,Journal of sulfur Chemistry,DOI 10.1080/17415993.2017.1391811
121. **Toukara Fatoumata**,Prévalence du tabagisme chez les étudiants en fin de cycle d'études de médecine, de pharmacie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako. Thèse de pharmacie, Bamako 2004-2005.
122. **Tsvetkova, D, Obreshkova, D, Zheleva-Dimitrova, D,& Saso, L**, (2013). Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives. Current medicinal chemistry, 20(36), 4595-4608.
123. **Valko ,M. , Leibfritz , D. , Moncol , J. , Cronon ,M.T**, (2006). Mazur, M,et Telser , J. (2007).Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease . Int j biochem Cell Biol ,39, 44-84.
124. **Verschuere S, De Smet R, Allais L, Cuvelier CA**. The effect of smoking on intestinal inflammation: What can be learned from animal models? J Crohns Colitis. févr 2012;6(1):1-12.
125. **Verschuere S, De Smet R, Allais L, Cuvelier CA**. The effect of smoking on intestinal inflammation: What can be learned from animal models? J Crohns Colitis. févr 2012;6(1):1-12.
126. **Woolley , J.G**, *plant alkaloides in encyclopedia of life sciences*, Nature Publishing Group,2001.
127. **Y .Martinet,A Bohadana ,C.Got** , Le tabagisme -de la prévention au sevrage ,édition Massion ,2001
128. **Zou, K, Li, Z, Zhang, Y, Zhang, H.-y, Li, B, Zhu, W.-l, Li, Y.-m**. (2017). Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system. Acta Pharmacologica Sinica, 38(2), 157-167.
129. **Zughaier, S, Karna, P, Stephens, D,& Aneja, R**. (2010). Potent Anti-Inflammatory Activity of Novel Microtubule-Modulating Brominated Noscapine.
- 130.

**Les sites électroniques:**

-Anonyme( 01,2022)<http://www.la-cigarette.com/composition.html>

-Anonyme(02,2022)[https://www.quebecsanstabac.ca/je-minforme/tabac-toutes-formes/composants chimiques-tabac](https://www.quebecsanstabac.ca/je-minforme/tabac-toutes-formes/composants-chimiques-tabac)

- Anonyme(03, 2022) Rapport d'expertise collective, saisine n°2014-SA-0130 - Evaluation des dangers de la nicotine. ANSES, 2015 (www.anses.fr 1).

-Anonyme( 04 ,2022) <https://www.kalliergeia.com/en/history-of-tobacco-nicotiana-tabacum-l-plant/> (London): 323. (Paris): 278 279

# *Annexes*

**Annexes :**

**Annexe1 :** Liste des matériels utilisés dans notre travail

<b>Produits et réactifs</b>	Dans cette étude nous avons utilisé éthanol et chloroforme Comme solvant <b>Réactif chimique:</b> 0.4ml chloroforme( $\text{CHCl}_3$ ),6ml acide sulfurique( $\text{H}_2\text{SO}_4$ );1% $\text{FeCl}_3$ (préparé au méthanol, quelque gouttes Hcl concentré ;0.5 ml magnésium;0.5ml Mayer;0.5Wagner;0.1ml( $\text{NH}_4\text{OH}$ );10% ammoniac (3NH);éthanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{H}_2\text{C}$ ); l'eau distille ; réactif de dragendroff; nicotine; DMSO ; hydroxyde de sodium (NOH); milieu de culture type Hinton.
<b>Les appareillages et Les verreries</b>	Spectrophotomètre ;rotavapeur rotatif; Agitateur; Autoclave ;la hôte, Broyer vortex; Balance; entonnoir ;Réfrigérateur; bec bunsen; spatule; boîte de pétri ; papier filtre; para film; pince; entonnoir ; Microepipette; Erlenmayer; flacon; Becher; Ballon; tube à essai; verre a montré,



Annexe 2: Extrait Brut



Annexe 3: Extrait Des Alcaloïdes



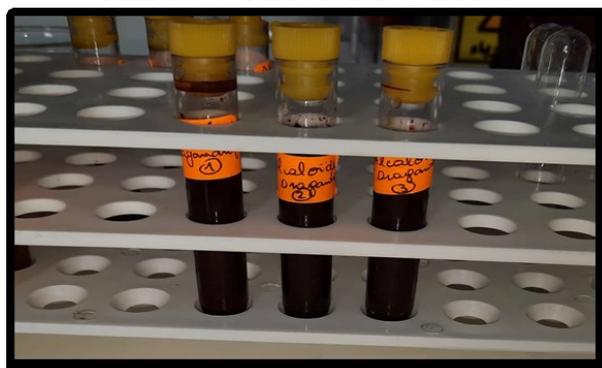
Annexe 4: L'appareil Rotavapeur Rotatif



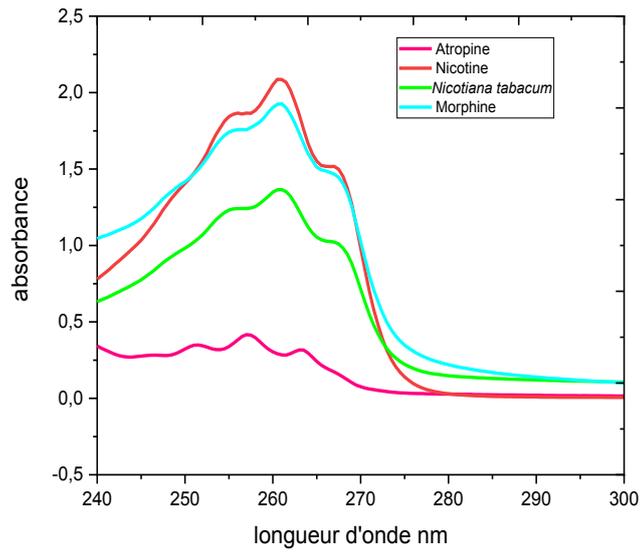
Annexe 5: Filtration Des Extrait



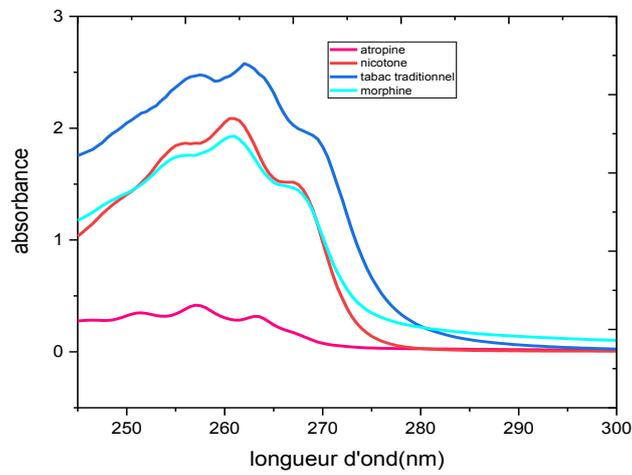
Annexe 6: Test Phytochimique



Annexe 7 : Test Phytochimique Par Le Réactif Dragendorff.

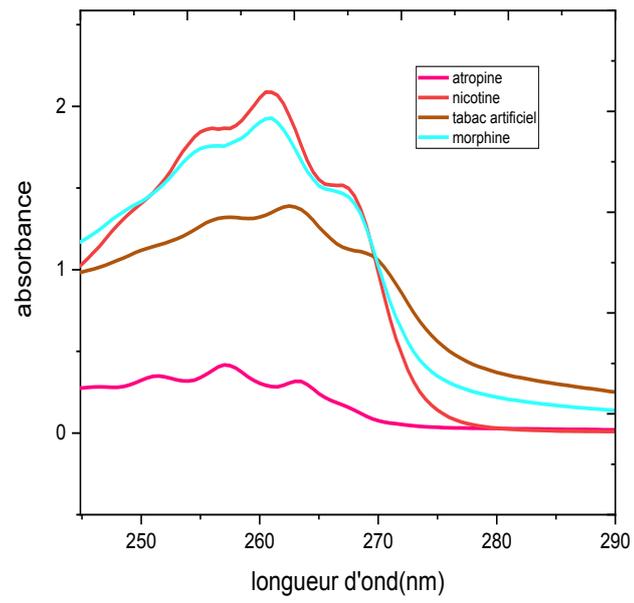


**Annex 8 :** Caracterisation de *Nicotiana tabacum* par apport de la nicotine, l'atropine et la morphine



232

**Annex 9 :** Caracterisation de tabac traditionnel par apport de la nicotine, l'atropine et la morphine



**Annex 9 :** Caracterisation de tabac artificiel par apport de la nicotine, l’atropine et la morphine