

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A.MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Laboratoire de Biomathématique, Biochimie et Scientométrie

« L 3 BS »

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie Moléculaire

Option : Biologie Moléculaire

Thème

*Identification par HPLC des polyphénols et
alcaloïdes de deux espèces de « Fumaria » et
leurs activités antioxydantes et anti-
peroxydase*

Par :

M^{lle} BOUGOFFA KHALIDA

Devant le jury le :

Président :	M^r Saidani B.	Pr., Université de Bejaia.
Examineurs :	M^r Kerkar M.	Pr., Université de Bejaia.
	M^{me} Bedjou F.	M.A.C.C, Université de Bejaia.
	M^r Madani K.	M.A.C.C, Université de Bejaia.
Promoteur :	M^r Chibane M.	Pr., Université de Bejaia.
Co-promotrice :	M^{me} Benabdesselam F.	M.A.C.C, Université de Bejaia.

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier Dieu le tout-puissant, de m'avoir donné la force et la patience de pouvoir mener ce travail à terme.

J'adresse mes plus sincères remerciements à ma Co-promotrice Dr BENABDESSELAM FADILA pour m'avoir guidé durant cette année de pratique. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance, sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Je tiens également à remercier mon promoteur le Professeur Chibane.M de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour son encouragement.

Je remercie les Professeurs SAIDANI.S, KERKAR.M, les Docteurs BEJOU.F et MADANI.K qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mr ZAIDI, Mr HAMMOUM et Mr MAKHLOUF pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je remercie les Directeurs de l'INRAA et SAIDAL, filiation ANTIBIOTICAL de m'avoir accueillis au sein de leurs laboratoires pour effectuer mes analyses.

Un grand merci à Mme DOUZENE, Mr ABDI (laboratoire de physiologie à l'INRAA. ALGER) et Mr BENOUDA (laboratoire d'analyse à SAIDAL, ANTIBIOTICAL. MEDIA) pour leurs aides et leurs conseils, ainsi que pour le temps qu'ils m'ont consacré dans mes travaux.

Mes remerciements s'adressent également à Mr DJAMRL (responsable de l'animalerie), Mr YOUSSEF (le magasinier) et Mlle NOUARA (technicienne du laboratoire Technologie alimentaire) pour leurs aides.

Une pensée particulière pour Mr BOULAHRAF ET Mlle NASSIMA pour leur disponibilité au quotidien, leurs aides et leurs encouragements.

Une pensée pour tous mes amis qui m'ont soutenu au cours de ces années.

Dédicaces

J'adresse, surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma mère, mon père et, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de toutes mes années d'études, c'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.

Mes dédicaces sont adressées à mes deux chères soeurs F.zohra et Meriem, ainsi qu'à mes adorables frères : Kherddine et Mohamed Amine.

Mes dédicaces ne seront pas complètes sans cité mes copines : Souad, Djalila, Nabila, Nacire, Wassila, Sabiha, Soraya, Kahina et Tougarithen.

Mes dédicaces sont adressées de tout mon cœur à ma chère cousine Azza et mon préférable cousin A.Wahabe.

A tous ceux qui me sont chers.

Liste des abréviations

- **ATP** : Adenosine triphosphate.
- **Ca²⁺** : Calcium ionique
- **Fe** : Atome de fer
- **H** : Atome d'hydrogène
- **H₂O (d)** : Eau distillée
- **MeOH** : Methanol
- **ROS** : Reactive oxygen species
- **SNC** : Système Nerveux Central
- **UV** : Ultra-violet
- **XO** : xanthine oxydase
- **XOR** : xanthine oxydoréductase.

Liste des Tableaux

Tableau n° 1 : Comparaison entre quelques espèces de <i>Fumaria</i> ssp.....	06
Tableau n° 2 : Les différents critères morphologiques des papavéracées et des fumariacées	08
Tableau n° 3 : les différentes classes des Flavonoïdes	14
Tableau n° 4 : Les différentes classes des alcaloïdes hétérocycliques	20
Tableau n° 5 : Les différentes sous classe des alcaloïdes isoquinoléiques	23
Tableau n° 6 : La composition en alcaloïdes isoquinoléiques de quelques espèces de <i>Fumaria</i> ssp.....	28
Tableau n° 7 : Le rendement en alcaloïdes totaux de <i>F.capreolata</i> et <i>F.bastardii</i>	65
Tableau n° 8 : alcaloïdes de <i>F.capreolata</i> identifiés par RP-HPLC à gradient	67
Tableau n° 9 : alcaloïdes de <i>F.bastardii</i> identifiés par RP-HPLC à gradient	68
Tableau n° 10 : Classement des alcaloïdes isoquinoléique de <i>F.capreolata</i> et <i>F.bastardii</i>	69
Tableau n° 11 : Les composés phénoliques de <i>F.capreolata</i> identifiés par RP-HPLC isocratique.....	72
Tableau n° 12 : Les composés phénoliques de <i>F.bastardii</i> identifiés par RP-HPLC isocratique.....	73
Tableau n° 13 : Taux de polyphénols observés dans les parties aériennes de <i>F.capreolata</i> et <i>F.bastardii</i>	74
Tableau n° 14 : Les taux en composés phénoliques de quelques espèces de <i>Fumaria</i>	75
Tableau n° 15 : Taux de flavonoïdes observés dans la partie aérienne de <i>F.capreolata</i> et <i>F.bastardii</i>	77
Tableau n° 16 : Pourcentages d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par les extraits de <i>F.capreolata</i> et <i>F.bastardii</i> et par les antioxydants standards.....	88
Tableau n° 17 : Les coefficients de corrélation entre le pouvoir réducteur et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de <i>F.capreolata</i> et <i>F.bastardii</i>	90

Tableau n° 18 : Pourcentages d'inhibition de l'activité enzymatique de la peroxydase en présence des extraits de *F.capreolata* et *F.bastardii* et des antioxydants standards**94**

Liste des figures

Figure 1 : Structure de quelques composés phénoliques	12
Figure 2 : Formule générale des flavonoides	13
Figure 3 : Structure de quelques composés non alcaloïdiques	16
Figure 4 : structure de quelques alcaloïdes isoquinoléïques	29
Figure 5 : Schéma d'un appareil HPLC	31
Figure 6 : Mécanisme de la peroxydation lipidique	35
Figure 7 : Régulation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydants	37
Figure 8 : Effet de synergie entre vitamines et oligo-éléments.....	39
Figure 9 : Principe de détection des radicaux OH[•]	42
Figure 10 : Photographie de la plante <i>F.capreolata</i>	46
Figure 11 : Photographie de la plante <i>F.bastardii</i>	46
Figure 12 : Système d'extraction au Soxhlet	49
Figure 13 : Différentes étapes d'extraction des alcaloïdes totaux des parties aériennes de <i>Fumaria capreolata</i> et <i>Fumaria bastardii</i>	50
Figure 14 : Séparation des alcaloïdes des deux espèces de <i>Fumaria</i> par HPLC	51
Figure 15 : Extraction des substances actives de nos plantes.....	52
Figure 16 : Conditions opératoires de l'analyse des polyphénols par HPLC	53
Figure 17 : Extraction des substances actives des deux espèces de fumeterre	54
Figure 18 : Protocole de dosage des composés phénoliques	55
Figure 19 : Procédure de dosage des flavonoides totaux	56

Figure 20 : Protocole d'étude du pouvoir réducteur.....	57
Figure 21 : Protocole d'étude de l'activité « scavenging » du DPPH	58
Figure 22 : Protocole d'étude de l'inhibition de l'acide linoléique.....	59
Figure 23 : Schéma de préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase.....	62
Figure 24 : Procédure de préparation de la solution Substrat	63
Figure 25 : Mode opératoire de l'étude de l'activité anti-peroxydase	64
Figure 26 : Profil HPLC des alcaloïdes de <i>F.capreolata</i>	66
Figure 27 : Profil HPLC des alcaloïdes de <i>F.bastardii</i>	67
Figure 28 : Structure des alcaloïdes isoquinoléiques identifiés chez <i>F.capreolata</i> et <i>F.bastardii</i>	70
Figure 29 : Chromatogramme (HPLC) des polyphénols de <i>F.capreolata</i>	71
Figure 30 : Chromatogramme (HPLC) des polyphénols de <i>F.bastardii</i>	72
Figure 31 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques.....	74
Figure 32 : Courbe d'étalonnage des flavonoides	76
Figure 33 : Activité scavenging du DPPH des extraits.....	78
Figure 34 : Réaction du DPPH avec l'Eugenol	81
Figure 35 : Pouvoir réducteur des extraits de <i>F.capreolata</i> et <i>F.bastardii</i> , et de trois standards	82
Figure 36 : L'effet d'inhibition de nos extraits (à différentes concentrations) sur l'acide linoléique	82
Figure 37 : Corrélation entre le pouvoir réducteur et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de <i>F.capreolata</i> et <i>F.bastardii</i>	89
Figure 38 : Mesure de l'activité anti-peroxydase.....	93

Sommaire

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Matériel végétal

I. Sélection des plantes et des extraits	02
I.1- Critères de sélection des plantes	02
I.2- Critères de sélection des extraits	04
II. Les fumariacées	05
II.1- Historique et habitat	05
II.2- Classification botanique des Fumariacée	07
II.3- La composition chimique de la fumeterre	09
II.4- Utilisation thérapeutique des fumariacées	10

Chapitre II: Les substances d'origine végétale

Les substances d'origine végétale.....	11
I- Les composés phénoliques	12
I.1- Les flavonoïdes	13
II. Les alcaloïdes	15
II.1- Historique	15
II.2- Répartition des alcaloïdes	17
II.3- Etat naturel, localisation	17
II.4- Méthodes d'identification structurale	18
II.5- Propriétés physico-chimiques	19
II.6- Classification des alcaloïdes	20
II.7- Rôle des alcaloïdes dans le végétal	22
II.8- Les alcaloïdes isoquinoléiques	23
II.9- L'intérêt pharmacologique des alcaloïdes isoquinoléiques	26
II.10- Les alcaloïdes de la fumeterre	28

Chapitre III: Méthode d'analyse des substances actives « HPLC »

I- Principe de la chromatographie	30
II- La Chromatographie Liquide Haute Performance « HPLC »	31
II.1- Appareillage	31
II.2- Polarité et chromatographie	32
II.3- Conclusion	33

Chapitre IV: Le paradoxe de l'oxygène

I- Le paradoxe de l'oxygène	34
II- Les défenses antioxydantes	36
III- Le stress oxydant	38
IV- Réaction des antioxydants face au stress oxydant	38

Chapitre V: Méthodes d'étude de l'activité antioxydante

I.1- Tests d'étude de l'inhibition de l'oxydation lipidique	40
I.2- Tests d'évaluation de l'effet « scavenger » sur les radicaux libres	41
I.2.1- Effet « scavenger » sur les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$)	41
I.2.2- Effet « scavenger » sur les radicaux superoxydes ($OH\cdot$)	42
I.2.3- Effet « scavenger » sur les radicaux stables « $ABTS^+$ » et la méthode de « TEAC »	43
I.2.4- D'autres méthodes de mesure de l'activité antioxydante	44

Partie pratique

Chapitre I : Matériel et méthodes

I. Matériel	45
I.1. Matériel végétal	45
I.2. Matériel et réactifs	47
II. Méthodes	48
II.1. Le séchage	48
II.2. la granulométrie	48
II.3- Extraction et Identification des Alcaloïdes et des composés phénolique des deux espèces de <i>fumaria ssp.</i>	49
a.1) Extraction d'alcaloïdes totaux	50
a.2) Identification par RP-HPLC	51
b.1) Extraction d'antioxydant	52
b.2) Identification des composés phénoliques totaux par RP-HPLC	53
II.4- Dosage des substances actives	54
a)- Dosage des composés phénoliques totaux	55
b)- Dosage des Flavonoïdes totaux	56
II.5- Détermination de l'activité antioxydante	57
a)- Mesure du pouvoir réducteur	57
b)- Activité « scavenging » du radical DPPH	58
c)- Mesure de l'inhibition de l'auto-oxydation de l'acide linoléique	59
d)- Mesure de l'activité anti-péroxydase	60

Chapitre II: Résultats et discussions

I. Taux d'extraction des alcaloïdes	65
II. Identification par RP-HPLC des alcaloïdes et des polyphénols des deux espèces de <i>Fumaria</i>	66
II.1 Identification des alcaloïdes	66
II.2 Identification des composés phénoliques	71
III. Les Dosages	73
III.1 Dosage des composés phénoliques totaux	73
III.2 Dosage des flavonoïdes	76
IV. Etudes de quelques activités antioxydantes	78
IV.1 Effet « scavenging » du radical DPPH	78
IV.2 Le pouvoir réducteur	82
IV.3 Mesure de l'inhibition de l'acide linoléique	83
IV.4 L'activité anti-péroxydase.....	92
 <i>Conclusion et perspectives</i>	 97

Références bibliographiques

Annexes

Synthèse bibliographique

Introduction

Introduction

Les Fumariacées sont une famille de plantes dicotylédones qui comprend **450** espèces réparties sur **15** genres. Ce sont des plantes des régions tempérées à sub-tropicales, bien représentées dans l'hémisphère Nord.

Le genre « *Fumaria* » est très répandu dans notre région, son utilisation dans la médecine traditionnelle couvre plusieurs pathologies. Les plantes de ce genre sont connues pour leurs multiples activités biologiques, voir une activité antimalarial, un effet antitumoral, anti HIV, antimicrobiens et une régularisation du fonctionnement hépato-biliaire. Elles contribuent également à dissiper les troubles liés à une digestion difficile, leur effet calmant est utile en cas de nausées (**Iwasa et al, 2000., Iwasa et al, 2001**).

La diversité de l'effet thérapeutique des fumariacées est en relation directe avec leurs richesses en alcaloïdes de la classe des isoquinoléines (les protopines, les protoberberines, les spirobenzylisoquinoléine, les indenobenzazepines). La présence des composés phénoliques (acides organiques, flavonoides...) contribue également aux différentes activités biologiques.

Le stress oxydatif et les moyens de le combattre constituent un axe de recherche d'actualité. Dans cette optique l'étude et la recherche de substances antioxydantes d'origine végétale est d'un intérêt majeur.

Notre étude porte d'une part sur une identification partielle par **HPLC** de la composition, de *Fumaria capreolata* et de *Fumaria bastardii*, en métabolites secondaires (alcaloïdes et polyphénols), l'estimation par dosage spectral du taux des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoides), et d'autre part sur l'étude de quelques activités antioxydantes (activité anti-radicalaire, un pouvoir réducteur, une inhibition de l'acide linoléique) et une activité anti-péroxydasique de nos extraits.

Chapitre I

Matériél végétal

**« Le meilleur médecin, c'est la nature car elle guérit
les trois quarts de toutes les maladies. »**

Galien

I. Sélection des plantes et des extraits :

Afin d'isoler des substances nouvelles de plantes pouvant trouver une application thérapeutique et de rendre la stratégie d'isolement moins laborieuse, il convient de sélectionner avec soin les plantes et les extraits à investiguer. Certains critères sont à prendre en considération par le phytochimiste pour mener à bien son étude (**Chaaib, 2004**).

I.1- Critères de sélection des plantes :

Du choix du matériel végétal dépend en grande partie la réussite du travail entrepris, plusieurs critères peuvent guider ce choix (**Chaaib, 2004**) :

- Utilisation en médecine traditionnelle ;
- Observation du matériel végétal sur le terrain ;
- Aspects botaniques et chimiotaxonomiques ;
- Littérature ;
- Hasard.

I.1.1- Utilisations en médecine traditionnelle :

L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle est l'un des principaux critères de choix. En effet, depuis la nuit des temps, les plantes ont été utilisées aussi bien comme médicament que comme poison de chasse (**Debuigne, 1991**).

I.1.2- Observations du matériel végétal sur le terrain :

Les observations du matériel végétal et son milieu lors de sa cueillette peuvent donner des informations précieuses. Ainsi, une plante qui pousse dans un milieu tropical riche en microorganismes (champignons, bactéries, etc.) et parasites divers et qui ne présente aucun signe d'attaque par ces microorganismes, serait susceptible de produire des métabolites secondaires qui lui permettent de faire face à ces agressions. Une telle plante peut être une source inestimable de nouveaux produits possédant des activités biologiques intéressantes (antifongique, antibactérienne, antiparasitaire ou antioxydante par exemple) (**Viegi et al, 2003**).

I.1.3- Aspects botaniques et chimiotaxonomiques :

Quand la classification des végétaux en s'appuyant sur les caractères morphologiques fait défaut, l'utilisation des métabolites secondaires pour les classer en taxons peut être utilisée. C'est ce qu'on appelle classification chimique ou chimiotaxonomique. Actuellement, le recours aux séquences de gènes ou d'ADN par les systématiciens (systématique moléculaire) pour la classification, complète les deux approches précédentes. Les plantes appartenant aux mêmes familles ou à des familles voisines et qui poussent dans le même biotope sont susceptibles de synthétiser les mêmes molécules chimiques. De plus, si ces substances sont particulièrement connues pour leur pouvoir thérapeutique, l'appui sur les critères chimiotaxonomiques pour étudier une espèce faisant partie de telles familles aura de fortes chances d'aboutir à l'isolement d'au moins un composé susceptible de nous intéresser, et la probabilité d'obtenir de nouvelles molécules serait grande (**Debray *et al*, 1971**).

I.1.4- La littérature :

Avant d'entreprendre une investigation phytochimique d'une espèce végétale donnée et dans le but d'isoler de nouvelles substances qui peuvent avoir un intérêt en thérapeutique, il est nécessaire de faire une recherche approfondie de littérature. Ainsi, il est plus judicieux de choisir pour un travail une plante peu ou pas étudiée. Cependant, même pour une plante largement étudiée, une approche différente pourrait être employée: procédé analytique différent, cibles biologiques différentes,... etc (**Dohou *et al*, 2003**).

I.1.5- Le hasard :

La grande diversité des métabolites secondaires synthétisés par les plantes constitue un énorme potentiel pour les phytochimistes dans leur recherche de nouveaux produits. En effet, sur environ 300.000 à 500.000 espèces végétales, seules une petite partie a été étudiée. De ce fait, le hasard doublé d'une bonne intuition augmente fortement la chance d'aboutir à de nouveaux composés (**Principe, 1989**).

I.2- Critères de sélection des extraits :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer les extraits bruts. Il s'agit du:

- criblage chimique et biochimique
- criblage biologique

I.2.1- Criblage chimique et biochimique :

L'analyse des extraits bruts par chromatographie sur couche mince (CCM) et les observations sous les lampes UV et après révélation avec des réactifs chimiques spécifiques, permet dans un premier temps d'avoir une idée sur les classes de composés des extraits testés.

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée avec des méthodes de détection par spectrophotométrie UV et par spectrométrie de masse (MS) des extraits bruts permet de déduire des informations importantes sur la composition de ces extraits. En effet, certains composés présentent un spectre UV caractéristique et sont facilement détectables dans l'extrait brut (flavonoïdes par exemple).

I.2.2- Criblage biologique :

Pour guider l'isolement de nouvelles molécules actives, chaque extrait est soumis à une multitude de tests biologiques. Ces tests doivent être simples, rapides et spécifiques pour permettre une sélection efficace des extraits. Notons toutefois qu'un résultat négatif, obtenu pour un extrait testé sur une cible biologique donnée, ne doit pas exclure la présence de substances actives dans cet extrait. En effet, la concentration de ces substances est peut être trop faible pour que l'on puisse détecter leurs activités sur plaque CCM. Par conséquent, d'autres tests sont à envisager avant d'éliminer tel ou tel extrait (Leclerc, 1922). Dans notre travail les tests utilisés sont les suivants:

- Le pouvoir réducteur.
- L'inhibition de la peroxydation lipidique (l'acide linoléique).
- L'activité « scavenger » du DPPH.
- L'activité anti-péroxydase.

II. Les Fumariacées :

II.1- Historique et habitat :

Fumaria vient du mot latin : *fumus*, *fumée*, le nom de fumeterre vient du suc de la plante qui fait pleurer comme la fumée dans les yeux. On peut aussi penser que ses feuilles grisâtres donnent l'impression d'une sorte de fumée sortant de terre. Ce nom est attesté au début du XIII^{ème} siècle sous la forme « *fumus terrae* » (Coste, 1937., Stahl, 1975., Debelmas *et al*, 1978).

Son nom vernaculaire selon la région kabyle est «Tiquiquech-yesghi» (plumes de oiseau) ou « Zalamit » (allumette en référence avec la forme et la couleur de la fleur).

Les différentes espèces forment rapidement leurs feuilles, leurs fleurs ainsi que leurs fruits au printemps. Elles disparaissent ensuite, ne laissant aucune trace à la surface du sol en été. Seules les parties souterraines subsistent d'une année à l'autre. Les Fumeterres poussent dans les terrains vagues et plutôt humides, sur le bord des talus et des chemins, à la lisière des champs abandonnés, dans les jardins incultes et le long des vieux murs (Perrot *et Paris*, 1974).

Ces plantes sont réparties dans l'ensemble des régions tempérées de l'hémisphère nord ; plus particulièrement dans toutes les régions tempérées d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie occidentale en Inde et au Pakistan (Suau *et al*, 2004., Gilani *et al*, 2005). Vingt deux espèces du genre *Fumaria* sont spécifiques à la région Ibero-Mauritanienne qui inclut l'Algérie, le Maroc et l'Espagne (Liden, 1986., Blanco *et al*, 1993).

Les propriétés médicinales de ces plantes sont connues depuis l'Antiquité, en effet La fumeterre apparaît dans les écrits de **Dioscoride et Galien** (1^{er} et 2^{ème} siècle) qui notaient déjà son activité sur la sécrétion biliaire et les fonctions hépatiques. Largement étudiée par les médecins arabes au X^{ème} siècle, la fumeterre est décrite dans la pharmacopée du Moyen-âge et dans le traité du naturaliste Italien Matthiolo (1558), comme dépuratif du foie, de la vésicule biliaire et du sang (Coste, 1937., Trease *et Evans*, 1978., Pinkas *et al*, 1990).

Une comparaison entre la position, la couleur et la taille des feuilles, fleurs et tiges de quelques espèces de la Fumeterre, est résumée sur le tableau suivant.

Tableau n° 1 : Comparaison entre quelques espèces de *Fumaria* ssp (Mchaffie, 2004).

Espèce (Photo)	Fleurs	Feuilles	Pétioles
<p><i>F. officinalis</i></p> 	<p>Petites, pourpres</p>	<p>Etroites en Face des fleurs</p>  <p><i>officinalis wirtgenii</i></p>	<p>Bras court</p> 
<p><i>F. densiflora</i></p> 	<p>Petites, roses- pourpres</p>	<p>Larges, Recouvrant la moitié de la fleur</p> 	<p>Bras long</p> 
<p><i>F. muralis</i></p> 	<p>Larges, roses</p>	<p>Plus ou moins étalées sur la fleur</p> 	<p>Bras moyen</p> 
<p><i>F. bastardii</i></p> 	<p>Larges, rose pale ou crème</p>	<p>Petites pointues</p> 	<p>Bras court</p> 
<p><i>F. purpurea</i></p> 	<p>Larges rose/ blanche</p>	<p>Recouvre plus que la moitié de la fleur</p> 	<p>Bras long</p> 
<p><i>F. capreolata</i></p> 	<p>Larges, blanche, Rose au bout après fertilisa- tion</p>	<p>Recouvre plus que la moitié de la fleur</p> 	<p>Bras long</p> 

II.2- Classification botanique des Fumariacée :

Deux types de classification sont à distinguer :

II.2.1- Classification classique (Preininger, 1986, Salinas *et al*, 2003) :

- Règne : Plantae
- Sous règne : Métaphytes
- Embranchement : Cormophytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Magnoliopsida
- Ordre : Papavérales
- Famille : *Fumariaceae*

Les Fumariacées peuvent être divisées en deux sous familles distinctes (**Liden *et al*, 1997., Salinas *et Suarez-santiago*, 2002**).

A- Les Hypecoidées :

Hypocoum et *Pteridophyllum* forment la première sous-famille, possédant des fleurs à 4 étamines seulement.

B- Les Fumarioidées :

Les autres genres sont classés parmi les Fumarioidées, leurs fleurs possèdent 6 étamines. Dans cette sous famille on peut trouver les genres suivants (**Lopez *et al*, 1991 ; Morales *et al*, 1991**).

- **Le genre *Dicentra*** : Plantes dressées ; fleurs blanches, en grappe.
- **Le genre *Adlumia*** : plante grimpante ; fleurs purpurines.
- **le genre *Corydalis*** : les fleurs ont de 10 à 12 mm de longueur, le fruit est une capsule siliquiforme; comprend 300 espèces.
- **Le genre *Fumaria*** : les fleurs ont de 4 à 6 mm de longueur, le fruit est globuleux, à une seule graine ; ce genre comprend 50 espèces, parmi lesquelles on peut citer : (**Sousek *et al*, 1995., Suau *et al*., 2002**).

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| * <i>Fumaria agraria</i> | * <i>Fumaria muralis</i> |
| * <i>Fumaria barnolae</i> | * <i>Fumaria officinalis</i> |
| * <i>Fumaria bastardii</i> | * <i>Fumaria parviflora</i> |
| * <i>Fumaria bicolor</i> | * <i>Fumaria petteri</i> |
| * <i>Fumaria capreolata</i> | * <i>Fumaria purpurea</i> |
| * <i>Fumaria densiflora</i> | * <i>Fumaria reuteri</i> |
| * <i>Fumaria flabellata</i> | * <i>Fumaria rupestris</i> |
| * <i>Fumaria judaica</i> | * <i>Fumaria schleicheri</i> |
| * <i>Fumaria kralikii</i> | * <i>Fumaria vaillantii</i> |

II.2.2- Classification phylogénétique :

Rappelons que certains Botanistes incluent les plantes des Fumariacées dans celles des Papavéracées (Lopez *et al*, 1991., Salinas *et al*, 2003., Liden *et al*, 1997).

Ordre : Ranunculales

Famille : *Fumariaceae/Papavéraceae*

Genre : *Fumaria*

L'ordre des Papavérales comprend donc les 2 familles : les Papavéracées et les Fumariacées qui se distinguent par la forme de leurs fleurs et de leurs fruits (**tableau 2**).

Tableau n° 2: Les différents critères morphologiques des Papavéracées et des Fumariacées (Perrot, 1974).

Famille	Fleur	Fruit
Papavéracées	Actinomorphe	Le fruit est une capsule d'où les graines s'échappent par des pores
Fumariacées	Zygomorphe	Capsule plutôt ronde

Les Papavéracées se caractérisent par des fleurs hermaphrodites à 4 pétales et un calice à 2 sépales tombant lorsque la fleur s'épanouit, et par de nombreuses étamines. Les

feuilles sont alternes et très découpées et toute la plante secrète un latex dont la couleur varie selon l'espèce (Trease et Evans, 1978., Vamosi, 2006).

II.3- La composition chimique de la Fumeterre :

En plus des sels minéraux (sel potassique), la fumeterre renferme des hétérosides, des composés phénoliques voir des flavonides et d'autres des acides organiques .Elle est surtout riche en alcaloïdes isoquinoléiques.

❖ **Composés phénoliques** : les acides organiques les plus retrouvés chez les plantes de cette espèce sont :

- Acide caféique
- Acide citrique
- Acide coumarique
- Acide ferulique
- Acide malique
- Acide 3-hydroxybenzoïque
- Acide protocatechique

❖ **Les flavonoides** : La Rutine.

❖ **Les acides aminés.**

❖ **Des polysaccharides hétérogènes.**

❖ **Des alcaloïdes isoquinoléiques** : Différentes classes d'alcaloïdes isoquinoléiques ont été retrouvés chez les fumeterres à savoir ;

- Les Protoberberines.
- Les Protopines.
- Les Spirobenzylisoquinoléines.
- Les Indenobezazepines.

La composition de quelques espèces de *Fumaria* en alcaloïdes isoquinoléiques sera mentionnée dans le chapitre des substances végétales.

II.4- Utilisation thérapeutique des fumariacées :

La fumeterre contient essentiellement des **alcaloïdes**, et tout particulièrement de la **fumarine ou protopine** (à l'origine de ses propriétés antihistaminique, anti-asthmatique, antisérotonine et anti-inflammatoire), des **sels de potassium** (qui augmentent la diurèse), des **flavonoïdes** (à l'origine de son action spasmolytique et régulatrice du flux biliaire) et des tanins.

Son extraordinaire richesse en principes actifs lui vaut des propriétés multiples : dépurative, diurétique, spasmolytique. La Fumeterre intéresse surtout pour son action bénéfique sur le flux biliaire. Grâce à sa richesse en fumarine elle aide à régulariser le fonctionnement hépato-biliaire, contribuant ainsi à dissiper les troubles liés à une digestion difficile. L'effet calmant exercé par la protopine est utile en cas de nausées.

Les Fumariacées ont montré également des effets antitumoraux, anti HIV, antimalarial et antimicrobiens. (**Iwasa *et al.*, 1999**).

Chapitre II:
Les substances d'origine végétale

« Tout est poison, rien n'est poison, seule la dose compte. »
Paracelse

Les substances d'origine végétale :

Les plantes ont été largement utilisées pendant plusieurs années comme drogues végétales pure ou sous forme d'extraits afin de traiter diverses pathologies. Elles ont montré leur richesse en agents anti-cancéreux, substances analgésiques (Morphine, Codéine), anti-malarial (Quinine), anticholinergique (Atropine), hépato-protectrices (Catéchine)...etc (**Iwasa et al, 2001**).

Polysaccharides, protéines, lipides et acides nucléiques représentent une source fondamentale pour le maintien de la vitalité de l'organisme. Ils sont connus sous le nom de « métabolites primaires ». Ces substances sont utilisées *in vivo* par les cellules pour assurer plusieurs fonctions y est compris la biogenèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes, les pigments,...etc. Les métabolites secondaires sont synthétisés au niveau des plantes et des organismes vivants par catalyse enzymatique des métabolites primaires. (**Croteau et al, 2000**).

La majorité de ces substances secondaires sont dotées de multiples rôles dont la protection de la plante. D'autres études ont montré leurs intérêts pharmacologiques pour la santé humaine. Parmi les métabolites secondaires on peut citer les huiles essentielles, les alcaloïdes, les tannins, les flavonoïdes, les anthocyanes,etc (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Nous nous intéresserons dans notre travail plus particulièrement aux composés phénoliques et aux alcaloïdes isoquinoléiques.

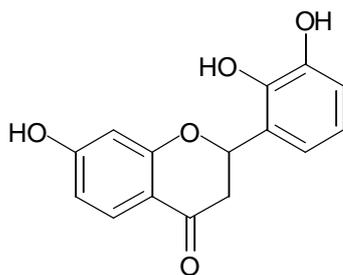
I- Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux qui se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs groupes hydroxyles, (modifiés ou non), attachés à une structure aromatique. Ces composés sont souvent liés à des glucides, surtout lorsqu'ils sont en solution dans le suc vasculaire. Cette combinaison se fait par des liaisons d'acétate de type ether-oxyde, dans le cas des acides phénols les combinaisons sont assurées par des liaisons esters. Cette combinaison donne naissance à des O-hétérosides (**Ribereau, 1968**).

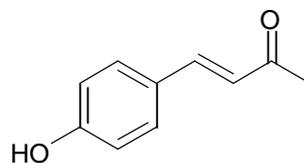
Les structures de base des composés les plus répandus, ainsi que leurs précurseurs sont variées. Il en dérive de nombreux composés, souvent très différents par leurs configurations et leurs propriétés.

On peut les classer comme suit (**Richter, 1993 ., Guignard, 1996**) :

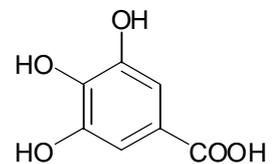
- **Le groupe C₆-C₁ :** A-benzoïques : Phénols simples (**fig 1.a**).
- **Le groupe C₆-C₃ :** les phénylpropanoïdes, nous distinguerons : l'acide cinnamique, les coumarines (**fig 1.b**), les lignanes.
- **Le groupe C₆-C₃-C₆ :** Flavonoïdes (**fig 1.c**), anthocyanidines, et chalcones.
- **Le groupe C₆-C₁₀-C₁₄ :** anthraquinones, benzoquinones et naphtoquinones.



(c) La quercétine



(b) Acide P-coumarique



(a) Acide gallique

Figure 1 : Structure de quelques composés phénoliques (**Croteau et al, 2000**).

Les organismes vivants disposent de plusieurs voies pour synthétiser le cycle aromatique des composés phénoliques (**Richter, 1993**).

La voie de biosynthèse de ces composés aromatiques, caractéristique des plantes supérieures qui produisent l'acide cinnamique par transformation des oses en acide aminée aromatique suivie par la désamination de ces dernier, est appelée voie des Shikimates (**Guignard, 1996**) (tenant son nom de la plante japonaise, Shikimi-no-ki, l'amis étoilé, *Illicium anisatum*, d'où il a été isolé la 1^{er} fois) (**Richter, 1993**).

Une seconde voie de biosynthèse, la voie du polyacétate (par condensation avec le Shikimate), conduit à l'élaboration de composés mixtes tels que les flavonoides et les quinones (**Guignard, 1996**). Ces composés phénoliques présentent des actions germicides, bactériostatiques et anti-enzymatiques (anti-XOR,...) (**Chang et al, 1994**). Cette voie de biosynthèse est la voie prédominante chez les bactéries, champignons et plantes inférieures (**Guignard, 1997**).

I.1- Les flavonoides :

Comme le laisse supposer sa dénomination (du latin *favus* = jaune), ce groupe très important et très étendu comprend des composés de couleur jaune ; cependant, il comporte aussi des composés incolores ou de diverses couleurs (**Richter, 1993**). Les flavonoides proviennent de l'addition de trois groupements en C₂ au p- hydroxycinnamate (caféate) avec formation de deux noyaux benzéniques désignés par **A** et **B** que réunit une chaîne de trois atomes de carbone, répartis selon la séquence C₆-C₃-C₆ (**figure 2**) (**Guignard, 1997.**, **Selloum et al, 2001**).

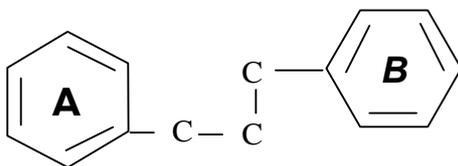


Figure 2 : Formule générale des flavonoides (**Selloum et al, 2001**).

On distingue un grand nombre de flavonoides, selon le degré d'oxydation de la chaîne à trois carbones ainsi qu'à leur degré d'insaturation. Les différentes classes sont résumés dans le tableau suivant (Richter, 1993., Kiery, 1998).

Tableau n° 3 : les différentes classes des Flavonoides (Richter, 1993., Kiery, 1998).

Classe des flavonoides	Exemple
<i>Flavonols</i>	<i>Quercetine, Kampferol</i>
<i>Flavones</i>	<i>Baicalin, Luteoline</i>
<i>Flavonones</i>	<i>Liquiritine, Hesperidine</i>
<i>Flavononol</i>	<i>Taxifolin</i>
<i>Isoflavones</i>	<i>Peurarin, Genisteine</i>

Les flavonoides sont présents dans les cellules épidermiques, ils protègent les plantes des radiations ultraviolettes (Guignard, 1996), ils présentent également plusieurs activités biologiques et pharmacologiques, antibactériennes, antivirales, antioxydantes, antimitogéniques et plusieurs effets inhibiteurs sur des enzymes telles que la phosphodiesterase, l'ATPase Ca^{2+} , la lipoxgénase et la XO (Lu et Foo, 2001). Un effet inhibiteur des flavonoides sur la peroxydase a également été observé (Hemeda et Klein, 1990).

II. Les alcaloïdes :

II.1- Historique :

Les alcaloïdes sont une des classes des métabolites secondaires les plus importants des plantes. Le terme alcaloïdes ou « alkaly-like » (al kaly = la soude ; like = qui a l'apparence) a été proposé pour la première fois par le pharmacien **Meissner** en **1818**. C'est en **1896** que **Meyer** présenta la première définition explicite des alcaloïdes. Pour lui, les alcaloïdes (base de plante) sont caractéristiques de la plante. Fréquemment distingués pour leur remarquable activité physiologique, ils renferment dans leur composition atomique, un atome de « C », un atome de « H », un atome de « N » et dans la plus part des cas un atome « O » (**Hesse, 2002**).

En **1913**, un écrit d'épreuve (comme résultat d'une progression scientifique) rejette cette définition. Une substance d'alcaloïdes d'origine animale ou végétale peut être définie comme un composant basique contenant dans sa structure moléculaire complexe un atome de « N » et qui peut manifester une activité pharmacologique significative (**Roberts et Wink, 1998**).

Ce n'est que récemment, que les alcaloïdes ont été présentés comme des molécules organiques cycliques avec un atome de « N » dans leurs structures, cette définition a été proposée par **Pelleter (Santavy, 1970)**.

Il est nécessaire de noter quelques exceptions :

- ❖ Certains produits naturels contenant un atome d'azote dans leur structure ne sont pas considérés comme des alcaloïdes, on peut citer :
 - **Cholchicine** : est un dérivé N-acetyl avec un azote neutre «**figure 3-A** ».
 - **Acide aristolochique** : n'est pas un composant basique et dépourvu dans sa structure d'un noyau hétérocyclique «**figure 3-B** ».
- ❖ Une classe dite « **Protoalcaloïdes** » constitué de simple amine (l'azote amino-acide n'est pas porté par le noyau aromatique), ce sont ce qu'on appelle « Les Amines Biologiques » (**Ex : Ephedrine «figure 3-C** », Mescaline «**figure 3-D** »).

- ❖ **Les Pseudoalcaloïdes** : contiennent dans leur structure un atome « N » mais ce sont des précurseurs qui ne dérivent pas d'acide aminé. On peut citer : Terminaline « **figure 3-E** » (alcaloïdes stéroïdien), Caféine « **figure 3-F** »,...ect (Bruneton, 1999., Cordell *et al*, 2001).

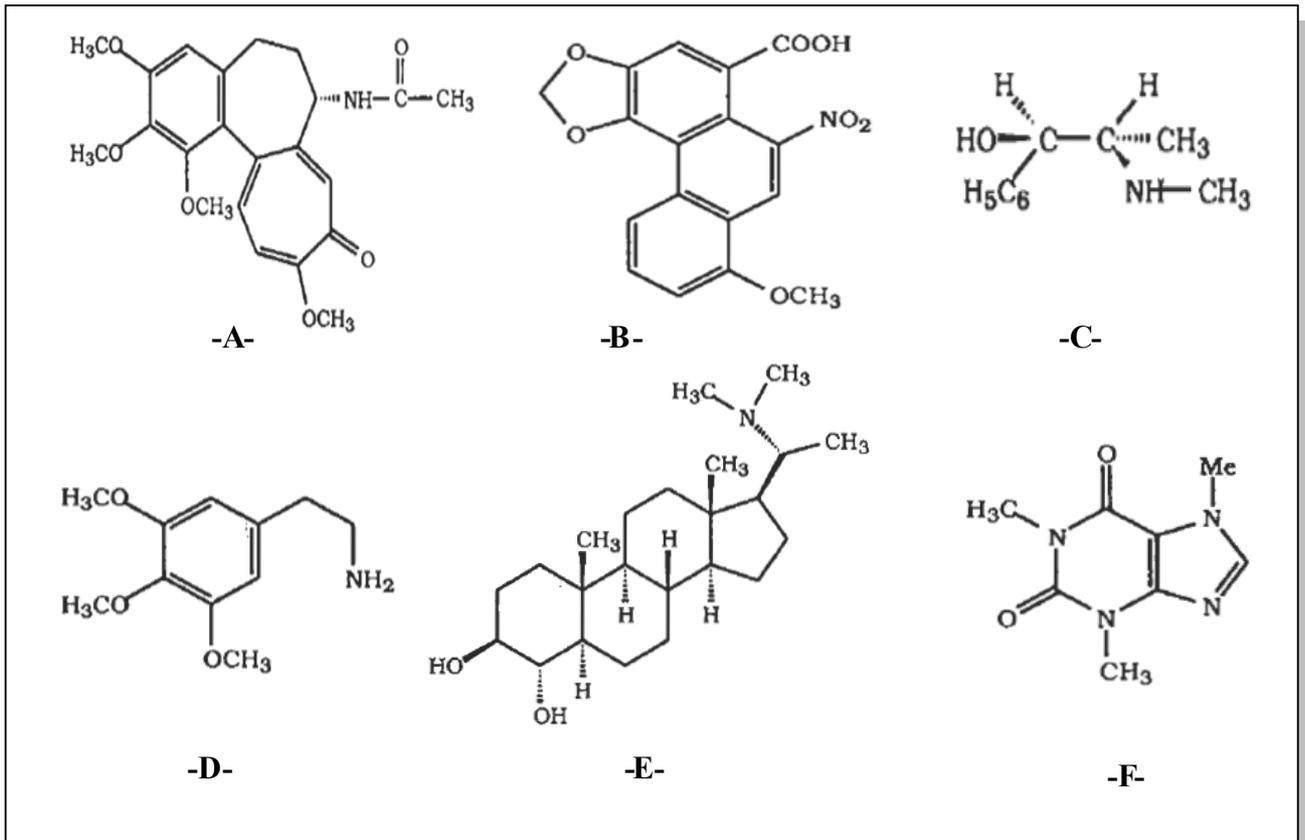


Figure 3 : Structure de quelques composés non alcaloïdiques (Cordell *et al*, 2001)

Sera donc considéré comme alcaloïdes :

Un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus au moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. Le regroupement d'un tel ensemble est confirmé par des réactions de précipitation (Cordell *et al*, 2001).

II.2- Répartition des alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont exceptionnels chez les bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*) et rares chez les champignons (l'ergot de seigle). Ce sont essentiellement des composés présents dans les Angiospermes (surtout chez certaines familles : Annonacées, Ménispermacées, Papavéracées, Fumariacées...); très répandus chez les dicotylédones (**Guignard, 2000**).

Pendant longtemps les alcaloïdes ont été considérés comme des produits strictement du métabolisme végétal. En fait des structures alcaloïdiques ont été décrites chez les animaux (les venins de quelques batraciens et de quelques poissons).

Cette répartition des alcaloïdes est assez parcimonieuse et conduit à certains cas à des remarques d'ordre chimiotaxonomiques intéressantes (**Bruneton, 1999**).

II.3- Etat naturel, localisation :

Dans la cellule végétale, les alcaloïdes sont dissous dans le suc vacuolaire. Ils se trouvent très rarement sous formes libres mais souvent associées à des constituants cytologiques tels que des acides organiques ou des tanins. A l'état de sels on les trouve sous forme de citrates, malates, tartrates, benzoates...etc.

Une plante renferme souvent un ensemble d'alcaloïdes ou l'un des composants est majoritaire. Leur teneur varie de quelques **ppm** (partie par mille : 10^{-6}) à plus de 10% (**Guignard, 2000**).

Les alcaloïdes peuvent être localisés dans toutes les parties de la plante mais se retrouvent le plus souvent dans certains organes, comme les organes végétatifs, les téguments de la graine, les tissus périphériques, l'épiderme et couches sous épidermiques des feuilles... Ils peuvent être spécifiques de la plante ou de l'organe végétatif. Ils s'accumulent généralement dans des emplacements différents de leur lieu de synthèse (**Bruneton, 1999, Guignard, 2000**).

II.4- Méthodes d'identification structurale :

Les alcaloïdes possèdent, comme toute molécule organique des spectres, d'absorption dans l'infrarouge (**IR**), de résonance magnétique nucléaire (**RMN**) et de masse en relation avec leurs structures et qui servent à des fins d'identification (**Pereira et al, 1999**).

Il n'existe pas de procédé propre à cette catégorie de substances naturelle. L'étude de leur structure fait appel à un ensemble des méthodes physiques classiques. Elles permettent, sur de faibles quantités de produit, et en quelques semaines, voir quelques jours ou heures, d'établir la structure spatiale exacte de la molécule (**Verpoorte, 1986**).

Dans un premier temps, on détermine la masse moléculaire et la formule élémentaire brute de forme « $C_xH_yO_zN_p$ » par spectrométrie de masse à haute résolution (**Suau et al, 2005**). Le spectre d'absorption dans l'UV fournit des indications sur certains éléments structuraux comportant des électrons engagés dans des liaisons multiples et des cycles « aromatiques » (**Sander et al, 2005**).

Le spectre de résonance magnétique nucléaire (**RMN**) détecte sélectivement certains noyaux atomiques (1H , 2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O). La **RMN** est ainsi devenue une méthode irremplaçable de détermination de l'enchaînement carboné d'un alcaloïde, c'est-à-dire de son squelette moléculaire, souvent même avec sa configuration spatiale (**Marek et al, 1999.**, **Seger et al, 2004**).

L'interprétation cohérente de l'ensemble des données fournies par les méthodes précédentes permet en général de trouver la structure moléculaire d'un alcaloïde. Dans certains cas, les conclusions ne sont pas suffisamment convaincantes, et c'est alors la cristallographie de rayons **X** qui fournira la formule complète avec l'arrangement spatial exact des atomes, sous réserve de disposer de cristaux corrects du produit. La structure de la quasi-totalité des alcaloïdes isolés à ce jour est ainsi connue (**Franklin et Brooks, 2004**).

II.5- Propriétés physico-chimiques :

Les alcaloïdes ont un poids moléculaire variant de 100 à 900. Ils ont généralement un aspect solide cristallisé, cela s'applique pour les molécules qui contiennent de l'oxygène dans leur structure. Ceux qui en sont dépourvus se présentent sous formes de liquides volatils à la température ordinaire (nicotine, coniine, mescaline) (**Bruneton, 1999**).

Les alcaloïdes ont une basicité plus ou moins marquée; ils peuvent par conséquent former des sels en présence d'acides. Leur solubilité est intermédiaire de celles des bases et des sels.

- En milieu **alcalin** : les alcaloïdes sont à l'état de bases (forme non ionisée); ils sont solubles dans les solvants organiques apolaires et les alcools, insolubles dans l'eau;
- En milieu **acide** : les alcaloïdes sont à l'état de sels (forme ionisée); ils sont solubles dans l'eau et les alcools, insolubles dans les solvants organiques apolaires (**Leboeuf et al, 1982**).

Les alcaloïdes en milieu aqueux et acide se caractérisent par des réactions de précipitation avec :

- **Complexes iodés ("réactifs généraux des alcaloïdes")** : réactifs de Bouchardat (solution iodo-iodurée), Valser-Mayer (tétraiodomercurate de potassium), Dragendorff (tétraiodobismuthate de potassium).
- **Complexes métalliques** : réactifs phosphotungstique, silicotungstique, ...
- **Réactions colorées** caractéristiques de certains groupes d'alcaloïdes, comme celle de Vitali-Morin (atropine) (**Barbosa-Filho et al, 2000**).

La couleur dépend du spectre d'absorption de la lumière, lié à la structure moléculaire : beaucoup d'alcaloïdes présentent un spectre d'absorption caractéristique dans le proche ultraviolet (UV), et dans certains cas cette absorption déborde sur le spectre visible, d'où une coloration jaune à orangé (**berbérine**), voire rouge (**sanguinarine**) (**Ghosh et al, 2005**).

L'existence d'atomes de carbone asymétriques dans leur structure confère à la plupart des alcaloïdes un pouvoir rotatoire, parfois élevé et caractéristique, par déviation du plan de la lumière polarisée.

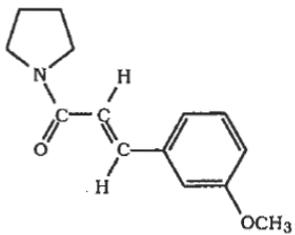
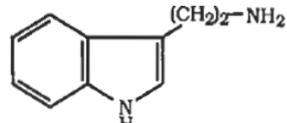
II.6- Classification des alcaloïdes :

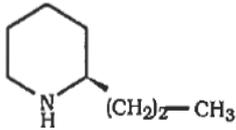
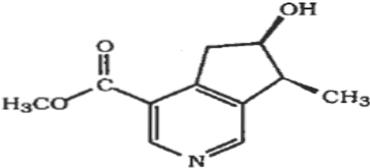
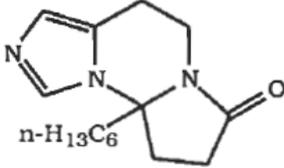
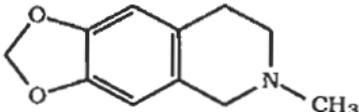
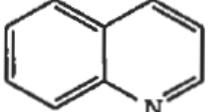
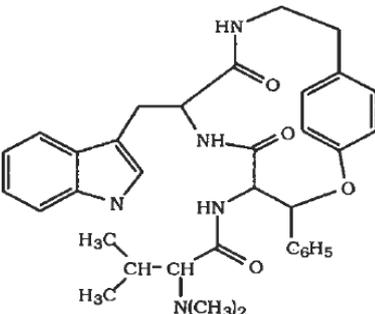
Les alcaloïdes ne constituent pas une catégorie définie de composés chimiques en raison de la variété de leurs structures moléculaires. Certains scientifiques classent les alcaloïdes selon leurs propriétés pharmacologiques ou encore selon leur distribution botanique. D'autres classifications fondées sur la structure du cycle fondamental de la molécule sont également possibles. Une autre façon de classer ces composés (celle qui sera adoptée ici), est de prendre en considération en plus de la structure, l'origine biosynthétique du composé (Shakil, 1998).

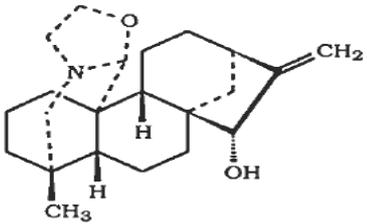
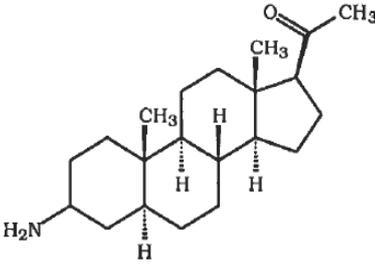
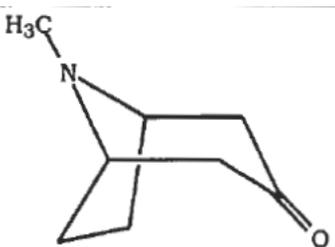
❖ Les alcaloïdes hétérocycliques :

Ils contiennent dans leur structure au minimum un hétérocycle. Les différentes classes sont résumées dans le tableau suivant (Shakil, 1998):

Tableau n° 4 : Les différentes classes des alcaloïdes hétérocycliques (Shakil, 1998).

Classe	Exemple
<i>Alcaloïdes pyrrolidiniques</i>	1-(méthyle cinnamoyl) Pyrrolidine 
<i>Alcaloïdes indoliques</i>	Treptamine 

<p><i>Alcaloïdes piperidiniques</i></p>	<p>Coniine</p> 
<p><i>Alcaloïdes pyridiniques</i></p>	<p>Cantleyine</p> 
<p><i>Alcaloïdes histaminiques</i></p>	<p>Glochidine</p> 
<p><i>Alcaloïdes isoquinoléiques</i></p>	<p>Hydrohydrastinine</p> 
<p><i>Alcaloïdes quinoléiques</i></p>	<p>Quinoline</p> 
<p><i>Alcaloïdes peptidiques</i></p>	<p>Integerrine</p> 

<i>Alcaloïdes terpéniques</i>	<p style="text-align: center;">Veatchine</p> 
<i>Alcaloïdes stéroïdiens</i>	<p style="text-align: center;">Funtumine</p> 
<i>Alcaloïdes tropanique</i>	<p style="text-align: center;">Tropinone</p> 

II.7- Rôle des alcaloïdes dans le végétal :

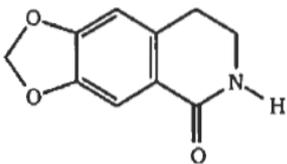
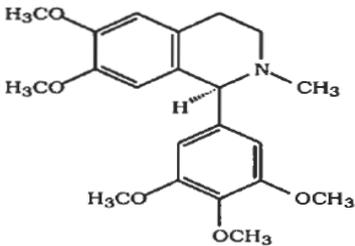
La présence de ces composés chez certains végétaux demeure un mystère. Certains ont voulu voir dans les alcaloïdes des formes de stockage de l'azote. D'autres expliquent leur existence comme protecteurs contre les prédateurs, mais la toxicité des alcaloïdes n'est pas la même pour tous les êtres vivants (certains champignons parasites sont insensibles aux alcaloïdes). Ils ont été longtemps considérés comme substances de croissance, ou simplement, des déchets des métabolites. Cette dernière hypothèse n'est pas conforme avec leur localisation ailleurs que dans les feuilles morte et avec leur diversité structurale, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle de défense, rôle qui peut être dû à d'autres substances chez les végétaux non alcaloidifères (Yunusove, 1966).

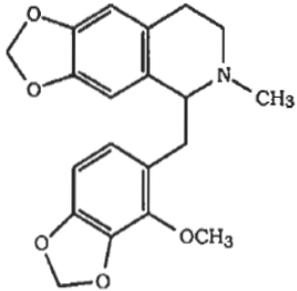
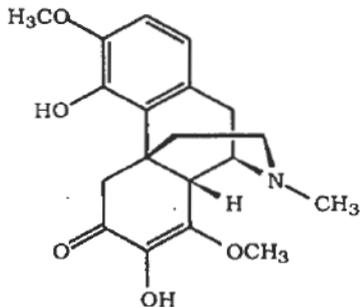
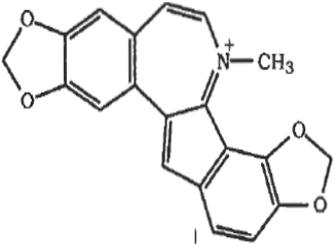
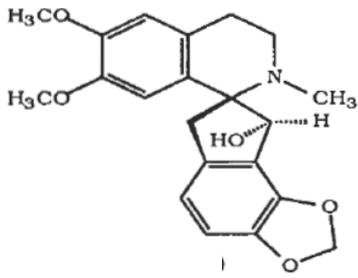
II.8- Les alcaloïdes isoquinoléiques :

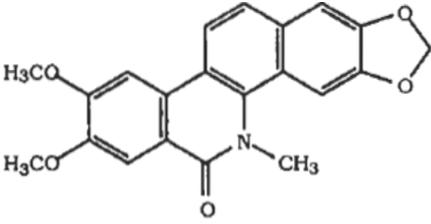
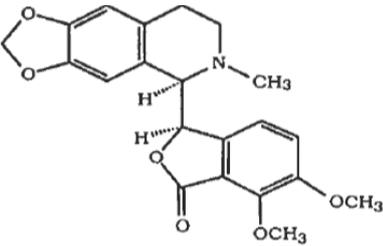
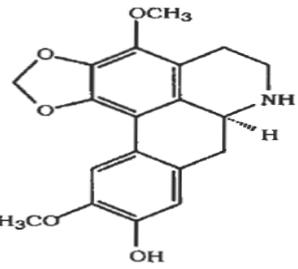
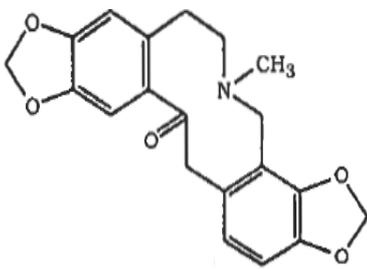
Les alcaloïdes isoquinoléiques représentent une classe très importante de métabolites secondaires. La morphine fut le premier alcaloïde de ce type à être isolé. Cette classe regroupe de multiples composants à activités pharmacologiques très importantes, rencontrés dans les familles des plantes suivantes : Magnoliacées, Papavéracées (Fumariacées), Annonacées, Lauracées, Alangiacées, Berberidacées, Ancistrocladacées et les Menispermacées.

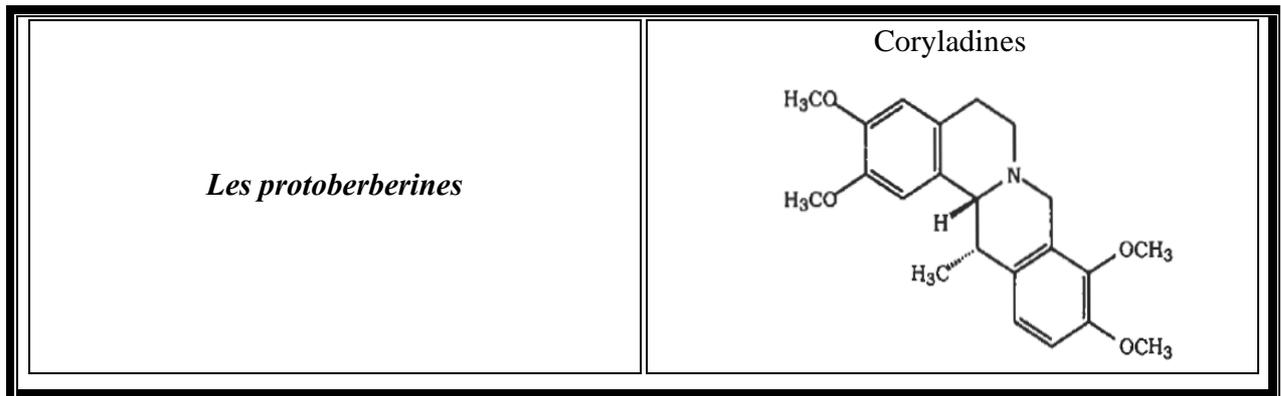
Les alcaloïdes isoquinoléiques peuvent être divisés en groupes selon leurs structures et leurs voies de biosynthèse. Les différentes sous classes sont regroupées dans le tableau ci-dessous (Shakil, 1998)

Tableau n° 5 : Les différents sous classe des alcaloïdes isoquinoléiques (Shakil, 1998).

Sous classe	Exemple
<i>Les isoquinoléines simple</i>	<p>Noroxyhydrastinine</p> 
<i>Les phénylisoquinoléines</i>	<p>Cristostyline</p> 

<p><i>Les benzyloisoquinoléines</i></p>	<p>Fumarizine</p> 
<p><i>Les morphines</i></p>	<p>carococculine</p> 
<p><i>Les indenobenzazepine</i></p>	<p>Lahorine</p> 
<p><i>Les spirobenzyloisoquinoléines</i></p>	<p>Fumaricine</p> 

<p><i>Les benzophénantridines</i></p>	<p>Oxynitidine</p> 
<p><i>Les phtalideisoquinoléine</i></p>	<p>Hydrastine</p> 
<p><i>Les aprofines</i></p>	<p>Cassyfiline</p> 
<p><i>Les berberines</i></p>	<p>Protopine</p> 



II.9- L'intérêt pharmacologique des alcaloïdes isoquinoléique :

La pharmacologie est la science qui étudie l'interaction entre une molécule (la substance à tester) et un système biologique.

Les alcaloïdes jouent toujours un rôle important, comme principes actifs des médicaments, malgré l'essor des produits de synthèse. Ils sont utilisés soit tels quels, soit sous forme de dérivés plus actifs, mieux tolérés par l'organisme, ou manifestant des effets différents. Ils ont souvent servi de modèle pour imaginer de nouvelles molécules de synthèse.

La « morphine » reste le produit de référence des analgésiques (médicaments anti-douleur). Son dérivé, la codéine (méthylmorphine), est un analgésique mais surtout un calmant de la toux (**Iwasa *et al*, 1996**).

Les alcaloïdes sont connus beaucoup plus pour leurs effets sur le système nerveux, le plus souvent sur le SNC (atropine, caféine, strychnine, théophylline ...).

Plusieurs alcaloïdes de la classe des benzyloquinoléines exercent un nombre très important d'activités. La « Dioxyline » (sous la forme de sel de phosphate) est utilisée comme un vasodilatateur, alors que son analogue le méthylendioxy (le 3-méthyl-6,7-méthylendioxy-1-piperonyloquinoléine) exerce un effet relaxateur sur les muscles lisses. La Corydaine est dotée de propriétés antirhumatismales, alors que la « Tubocurarine » bloque l'action des extrémités des nerfs musculaires. Ce groupe d'alcaloïdes est d'un emploi courant en chirurgie à des doses thérapeutiques, comme adjuvants de l'anesthésie pour obtenir la résolution musculaire indispensable aux interventions (ils paralysent le muscle abdominal sans toucher aux mouvements naturels de l'intestin) (**Iwasa et al, 1997**).

La « Glaziovine », un alcaloïde proaprophinique, est un remède antidepressif. La « Boldine », comme alcaloïde aporphénique, présente des effets diurétiques, antiparasitaires et diminue la sécrétion hépatique et celle des glandes salivaires (**Iwasa et al, 1998**).

La « berbérine » est très utilisée par les populations chinoises comme traitement gastrointestinal en cas de diarrhée chez les enfants...Un effet stimulateur sur l'utérus de la « protopine » et de la « cryptopine » a été observé (**Iwasa et al, 2000**).

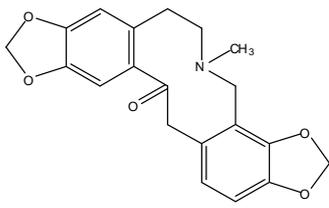
La forte activité biologique des alcaloïdes en fait parfois des toxiques puissants qui ont été impliqués dans des accidents et des affaires criminelles. C'est pour cela que leur dosage dans le sang est le plus souvent nécessaire pour surveiller l'efficacité du traitement (**Iwasa et al, 2001**).

II.10- Les alcaloïdes de la Fumeterre :

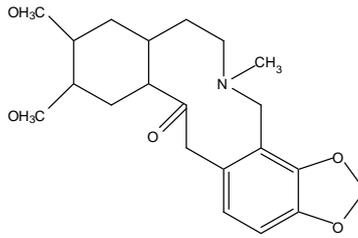
Les Fumariacées sont des plantes alcaloidifères, connues pour leur richesse en alcaloïdes isoquinoléiques et leurs multiples activités biologiques. Le tableau ci-dessous résume la composition en alcaloïdes isoquinoléiques de certaines espèces de *Fumaria* ssp. Sur la **figure (4)** sont reportées les structures des composés les plus importants.

Tableau n° 6 : La composition en alcaloïdes isoquinoléiques de quelques espèces de *Fumaria* ssp (Sousek *et al*, 1999., Kenneth, 2000).

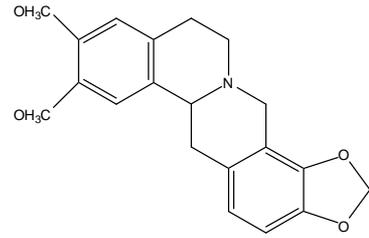
Espèces	Alcaloïdes
<i>F. agaria</i>	Adlumiceine, Coptisine, Cryptopine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophysine, Parfumine, N-methylstylopine.
<i>F. capreolata</i>	Adlumiceine, Copticine, Cryptopine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, Parfumine, N-methylstylopine
<i>F. muralis</i>	Copticine, Cryptopine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, O-methylfumarophycine, Parfumine, Sinactine, Stylopine, N-melethylstylopine.
<i>F. officinalis</i>	Adlumiceine, Adlumidiceine, Corytuberine, Parfumine, N-methylstylopine.
<i>F. parviflora</i>	Adlumiceine, Copticine, Fumaritine, Sinactine, N-methylstylopine.
<i>F. spicata</i>	Adlomeceine, Copticine, Fumariline, Fumarophycine, Protopine, N-methylstylopine.
<i>F. vaillantii</i>	Fumaricine, Fumarophycine, O-methylfumarophycine.
<i>F. bastardii</i>	Fumariline, Fumaritine, O-methylfumarophycine, Bucuculline, protopine, oxohydrastine, Corydaldine, Juziphine, Stylopine, tetrahydropalmitine, β -hydrastine.



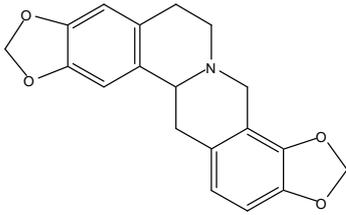
Protopine



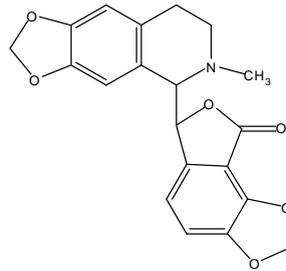
Bicuculline



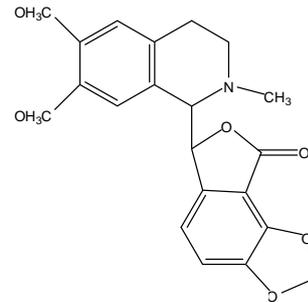
Adlumine



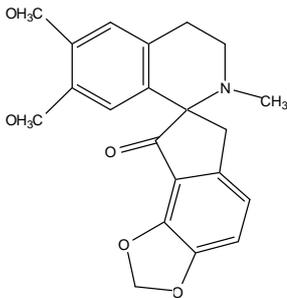
Stylophine



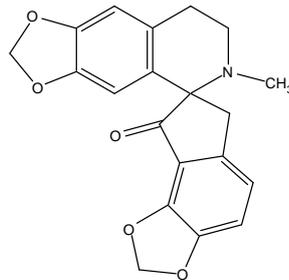
Cryptopine



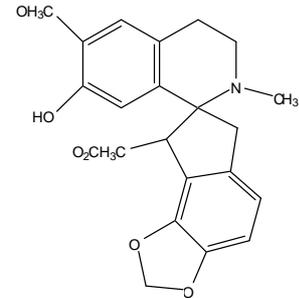
Sinactine



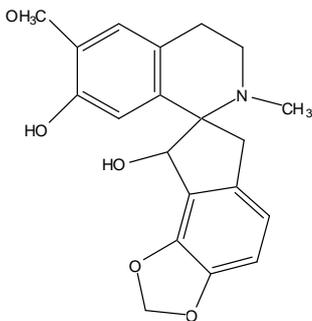
Parfumine



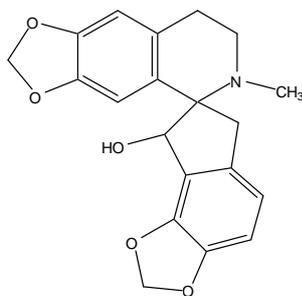
Fumariline



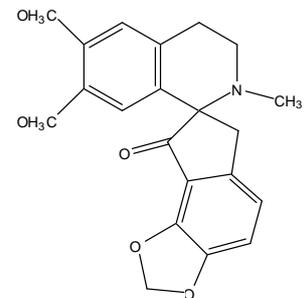
Fumarophycine



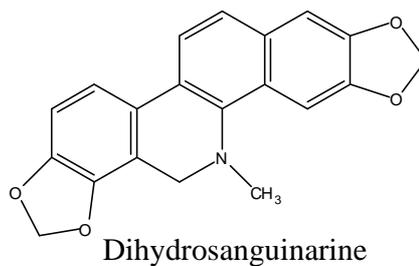
Fumaritine



Dihydrofumariline



Parfumidine



Dihydrosanguinarine

Figure 4 : structure de quelques alcaloïdes isoquinoléiques (Suau *et al*, 2002).

Chapitre III

Méthode d'analyse des substances actives

" HPLC "

I- Principe de la chromatographie :

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange même très complexe.

Il existe trois principaux types de chromatographie:

- La chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)
- La chromatographie en couche mince (CCM).

Les deux premières méthodes peuvent être assez largement décrites par des théories communes. Dans les deux cas, un fluide appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne. Cette colonne peut contenir des "granulés" poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). Dans les deux cas, la colonne est appelée « phase stationnaire ». A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans « la phase mobile » qui l'entraîne à travers la colonne.

Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange, appelés « les solutés », sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés.

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé « chromatogramme ». En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé « ligne de base » en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

Dans des conditions chromatographiques données, le « temps de rétention » (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté (Henshen *et al*, 1985., Gavrilovic *et al*, 1996., Pasch *et Trthniygp*, 1999., Jean-Pierre S, 2003).

II- La Chromatographie Liquide Haute Performance « HPLC » :

II.1- Appareillage :

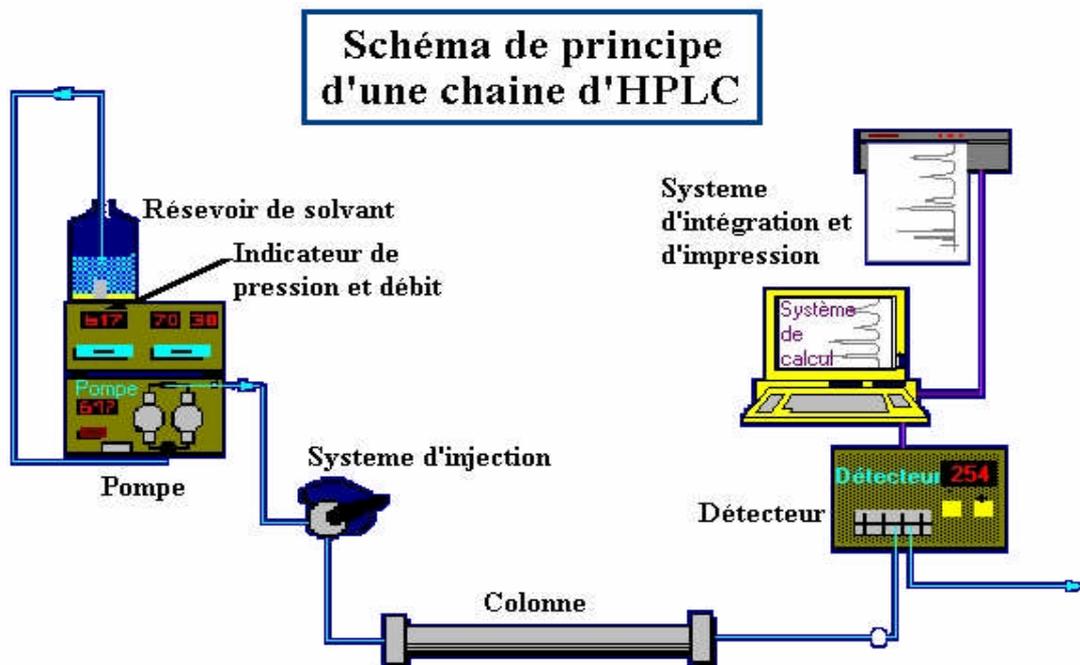


Figure 5 : Schéma d'un appareil d'HPLC

II.2- Polarité et chromatographie :

II.2.1- Polarité d'une molécule :

La polarité d'une molécule est une notion intrinsèque. Certaines molécules étant dissymétriques, les électrons ne sont pas uniformément réparties autour d'elles. De ce fait il existe un moment dipolaire permanent qui crée un champ électrique local. Ces molécules sont dites polaires (Gaboriaud, 1996).

II.2.2- Interactions entre molécules :

Dans la nature, les molécules ne sont pas isolées. Entre elles il existe différents types d'interactions :

- les interactions diélectriques ou ioniques
- les liaisons hydrogène
- les forces de Van Der Waals

II.2.3- Notion de polarisabilité :

Sur certaines molécules isolées qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un champ dipolaire induit, en déformant les orbitales électroniques ou en modifiant la position relative des atomes. Ces molécules sont dites polarisables (Fosset *et al*, 2000).

II.2.4- Application à la chromatographie :

Il existe des échelles de polarité, mais de manière on utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules. On dit que tel composé est plus polaire ou moins polaire qu'un autre. De même on dit que la phase mobile et la phase stationnaire sont polaires, peu polaires ou apolaires.

Pour qu'il y ait séparation chromatographique de composés, il faut que leurs molécules interagissent de manières différentes avec au moins une des phases (stationnaire et mobile). Ces phases doivent avoir des polarités différentes. On peut appliquer la règle "qui se ressemble s'assemble" à l'ensemble soluté - phase stationnaire (Henshen *et al*, 1985).

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

II.2.5- Polarité de phase :

A l'origine, les colonnes étaient remplies de silice (phase stationnaire polaire). Elle doit sa polarité aux groupements silanols «Si-OH» qui sont polaires. Pour que la séparation soit efficace, la phase mobile doit alors être peu polaire. L'ensemble "phase stationnaire polaire et phase mobile peu polaire" forme la chromatographie à polarité de phase normale. Par la suite, les particules de silice (support) ont été enrobées de paraffine en « C18 » pour faire une phase apolaire. Dans ce cas, pour que la séparation soit efficace, la phase mobile est polaire (généralement à base d'eau). L'ensemble "phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire" forme la chromatographie à polarité de phase inversée (Bhargava *et al*, 2003).

II.2.6- Composition de la phase mobile :

Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluante qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés.

Il faut ajuster la force éluante en fonction des solutés à séparer. Pour cela, on peut utiliser un solvant pur ou un mélange de solvants. On dit travailler en mode « isocratique » c'est-à-dire avec **100%** d'un même éluant tout au long de l'analyse. Dans certains cas il est utile de faire varier la force éluante au cours de l'analyse. Si la concentration du mélange de différents solvants varie au cours de la séparation, on réalise alors « un gradient d'élution », car la meilleure force éluante pour le début de l'analyse n'est pas forcément adaptée pour une bonne séparation des solutés sortant en fin de chromatogramme (**Pasch et Trthniygp, 1999**).

II.3- Conclusion :

L'HPLC se prête à :

- L'analyse d'échantillon.
- La préparation d'échantillon.
- Mode mixte (semi-préparative).

Les avantages présentés par l'HPLC comparé à la chromatographie à basse pression sont :

- ❖ Temps d'analyse divisé par 10 à 50,
- ❖ Reproductibilité élevée,
- ❖ Quantification simplifiée
- ❖ Dégradation négligeable des produits biologiques,
- ❖ Résolution élevée en accord avec le nombre de plateaux théorique de la colonne,
- ❖ Faible besoin en échantillon par analyse (**10 à 100 µl**).

Néanmoins il subsiste quelques inconvénients comme :

- ❖ Durée de vie limitée des colonnes,
- ❖ Obligation d'utiliser des solvants de qualité **HPLC**,
- ❖ Coûts du système, du consommable (colonne, solvants,...) et de son exploitation.

Chapitre IV

Le paradoxe de l'oxygène

« Grâce à l'oxygène je respire, et sa rouille me détruit »
Michel Serres, Hominiscence.

I. Le paradoxe de l'oxygène :

L'oxygène, apparu voici trois milliards d'années dans l'atmosphère terrestre, est une molécule indispensable à la vie comme source d'énergie. L'oxydo-réduction est le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome (réducteur) vers un autre (oxydant). Un tel processus est nécessaire pour la vie en aérobie et pour notre organisme, puisque l'oxygène est l'accepteur ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP à haut potentiel énergétique.

Le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfait car 2 à 3 % de l'oxygène subissent un transfert d'un nombre d'électrons impair, nous assistons à la formation d'espèces toxiques ayant des électrons non appariés (célibataires), appelées radicaux libres. (Boveris *et* Chance, 1973).

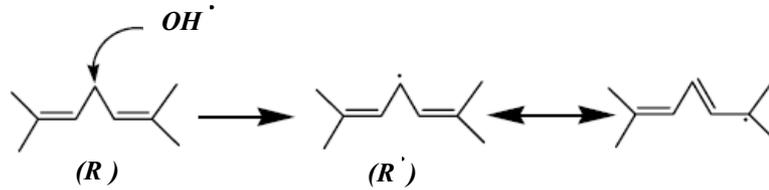
Dans une première étape, le radical libre anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est formé, ce qui conduit par la suite à la production d'autres ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène), comme le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote ($NO\cdot$), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Hitchon *et* El-Gabalawy H.S, 2004), ... De part leur nature instable, les ERO sont toxiques et interagissent avec toute une série de substrats biologiques importants. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des cassures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et des processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule. En raison de leur capacité à endommager les cellules, les tissus et les organes, les ERO sont impliqués dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (Hansen *et al*, 2006).

I.1 La peroxydation lipidique :

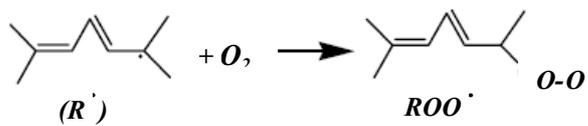
Ils sont une cible privilégiée des radicaux libres qui provoquent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires. Le phénomène d'auto-oxydation ou peroxydation lipidique consiste en l'attaque par un radical libre, d'origine exogène ou endogène, de dérivés lipidiques. Le radical formé ($R\cdot$) subit un réarrangement interne, dû à une tautomérie liée au déplacement de la double liaison la plus proche de

l'électron célibataire, et existe donc sous 2 formes en équilibre (**figure 6**) (**Fulbert et Cals, 1992**)

Initiation



Addition de l'oxygène



En présence d'oxygène, il se forme un radical peroxyde (ROO^\bullet) qui déstabilise une deuxième molécule d'AGPI et conduit à un hydroperoxyde lipidique (ROOH) et à un nouveau radical R^\bullet . Cette auto-oxydation se propage et s'amplifie d'un acide gras à l'autre.

Propagation et Amplification

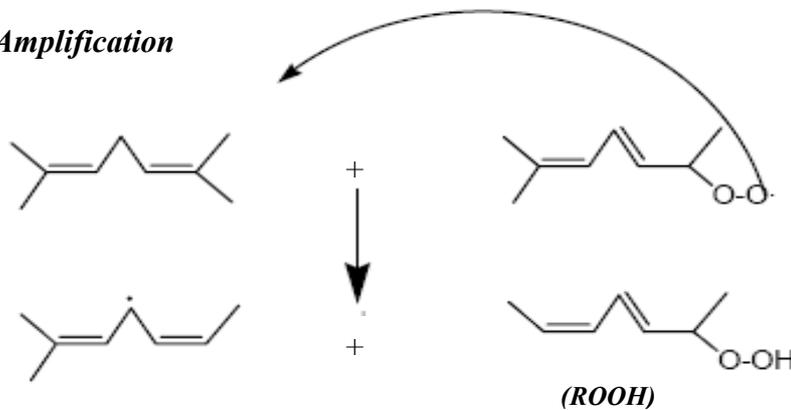


Figure 6 : Mécanisme de la peroxydation lipidique (**Fulbert et Marie-Josèphe ; 1992**)

L'étape d'initiation est, dans ce cas, le fait de l'intervention d'un $OH\bullet$ mais peut également être due à une particule ou un photon de haute énergie, ou à un atome ferreux complexé par certaines molécules organiques selon le mécanisme suivant :



(LH = phospholipide membranaire)

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète. La réaction en chaîne prolonge les effets intramembranaires des radicaux libres, même si l'agression radicalaire s'estompe. La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques : les hydroperoxydes et leurs dérivés. Les hydroperoxydes lipidiques sont relativement stables; en présence de fer, ils sont transformés en radicaux alkoxyles. Parmi leurs dérivés, le **MDA** (malondialdéhyde) a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène (Marnett, 1999).

II. Les défenses antioxydantes :

La production physiologique d'**ERO** est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes [superoxyde dismutases (**SODs**) (Fridovich, 1997), catalase (**CAT**), glutathion peroxydases (**GPx's**) ...] (Mates *et al*, 1999), de molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine...) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation d'**ERO** (Christelle, 2006).

Certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium sont indispensables pour l'activité des enzymes antioxydants (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Se-GPx) (Groussard, 2006).

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en flavonoïdes (quercétine, rutine ...) qui se retrouvent en grande quantité dans le thé vert, les légumes, ...ect.

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases et ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques.

L'ensemble de ces systèmes de régulation est représenté sur la **figure (7)**.

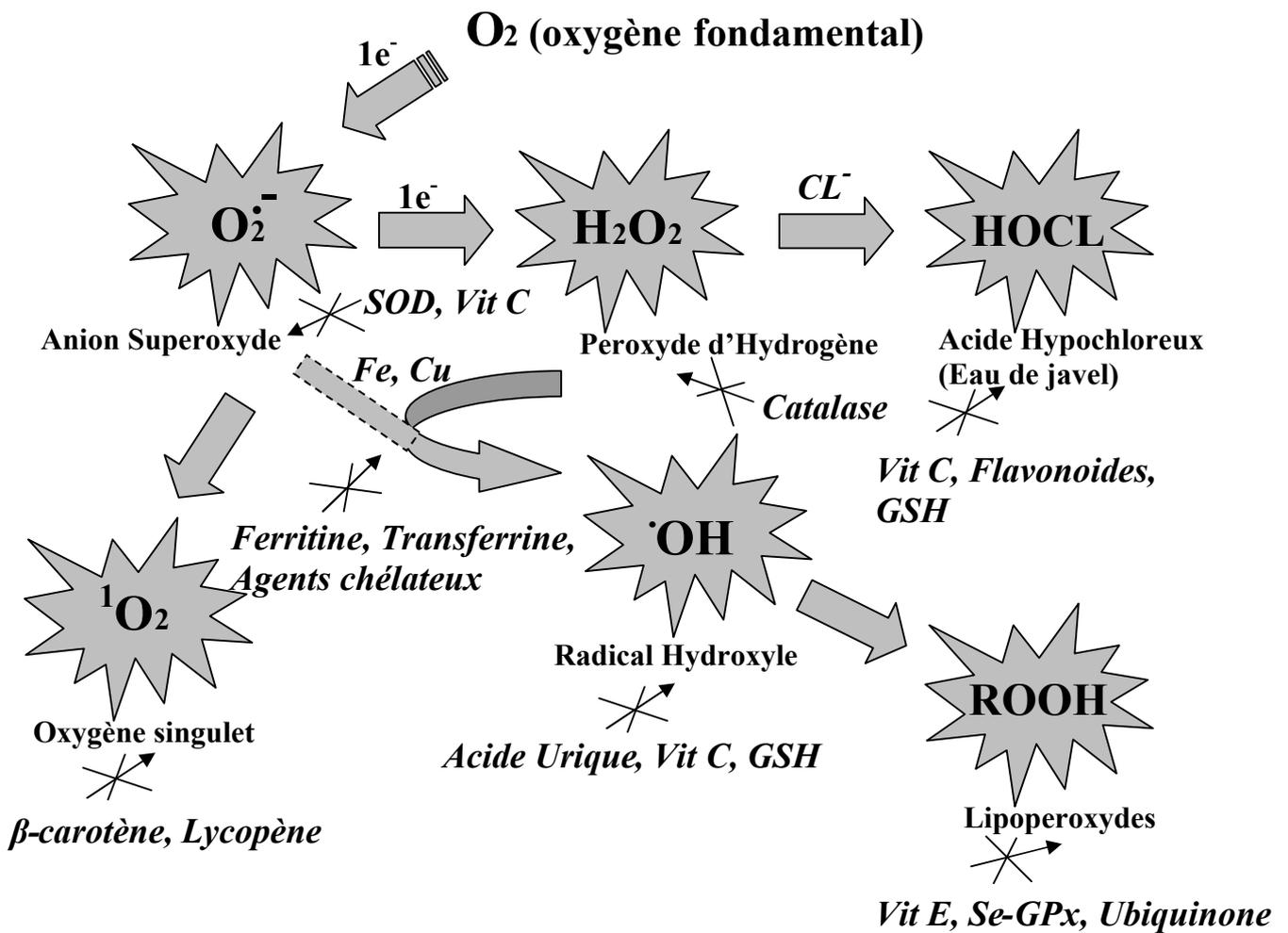


Figure 7 : Régulation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydants (Joël *et al*, 2002).

III. Le stress oxydant :

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'ERO et les systèmes de défenses antioxydantes. Nous devons ajouter que les ERO sont des produits essentiels au fonctionnement cellulaire. Ainsi les ERO seraient impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et agiraient comme second messager (Fanburg et Thannicka, 2000., Droge, 2002), dans la phagocytose des bactéries par les cellules polymorphonucléaires (Barouki et Morel, 2004). Un stress oxydant se définira lorsqu'il y aura un déséquilibre profond entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers (Dekhuijzen, 2004). Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement) (Delattre et Coll, 1995), d'une activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...). Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant (Christelle, 2006)

IV. Réaction des antioxydants face au stress oxydant :

Par réaction avec les radicaux libres, certains antioxydants deviennent à leurs tours des entités radicalaires théoriquement inoffensives. C'est le cas de la vitamine E (α -tocophérol) lorsqu'elle réagit avec les radicaux d'origine lipidique pour empêcher le processus de peroxydation lipidique de se développer. Si le flux de radicaux libres formé est trop important, le radical tocophéryl peut toutefois devenir pro-oxydant et contribuer ainsi à augmenter la peroxydation lipidique et jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose (Thomas et Stocker, 2000).

C'est le paradoxe des antioxydants tout comme existe celui de l'oxygène. De nombreux travaux in vitro ont montré que l'effet pro-oxydant de la vitamine E n'existe plus si de la vitamine C est présente dans le milieu. Il s'agit du fameux effet de synergie (figure 8) qui existe entre la plupart des vitamines antioxydantes et des oligo-éléments (Hornig et al, 1998).

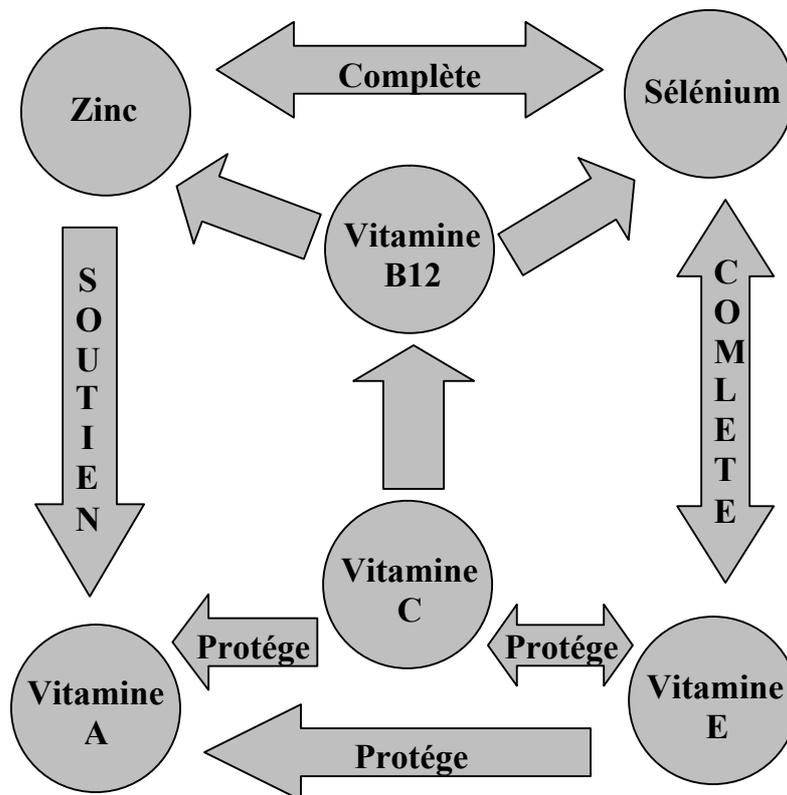


Figure 8: Effet de synergie entre vitamines et oligo-éléments (Joël *et al*, 2002)

L'apport exogène en antioxydants doit en effet se faire à des doses physiologiques (correspondant aux apports journaliers recommandés) et sous forme d'un cocktail de substances (exemple : vitamines A, C, E, sélénium, zinc). Cette idée est renforcée par le fait que des études ont clairement montré qu'une prise journalière de vitamine A et de β -carotène à fortes doses conduisait à une mortalité accrue chez des sujets à risque comme le sont les fumeurs (Joël *et al*, 2002).

Chapitre V

Méthodes d'étude

de

l'activité antioxydante

I. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant

Maîtriser le phénomène d'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité. Les tests d'activité antioxydante ont été proposés pour caractériser les substances antioxydantes et expliquer leurs fonctionnement (**Andrews et al, 2000**). Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit pur ou de mélanges ont été examinées et regroupées selon leurs principes. Elles sont fondées sur la détermination de produits résultant de l'oxydation (cas de la peroxydation lipidique) ou, au contraire, mesurent l'efficacité d'une substance à piéger des radicaux libres «l'effet scavenger» (**Marc et al, 2004**). D'autres méthodes reposent sur l'étude de l'effet de ces substances antioxydantes sur l'activité enzymatique (Xanthine Oxydase, Cholinestérase, Peroxydase, ...) (**Selloum et al, 2001., Orhan et al, 2004**).

I.1- Tests d'étude de l'inhibition de l'oxydation lipidique :

Les lipides ont de nombreux rôles : molécules énergétique, molécules signal et font partie intégrante des membranes cellulaires. Parmi les lipides membranaires, les phospholipides sont les plus abondants. Leur partie hydrophobe est liée à la présence d'acides gras (saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés). Les acides gras polyinsaturés sont les plus susceptibles aux attaques radicalaires et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation des lipides fournit une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi ces produits : l'isoprostane, le malondialdhyde (**MDA**) et le 4-hydroxynonéanal (**4-HNE**) qui ont été très étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique. Les **MDA** forment des liaisons avec les bases d'ADN et semblent être le produit le plus mutagène (**Marnett, 1999., Bergman et al, 2003**).

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des **ROS** est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher leur oxydation (**Piljac et al, 2005**).

Dans ce cas, le test de l'activité antioxydante le plus simple implique l'addition à l'antioxydant d'un substrat tel que l'acide linoléique ou le méthyle linoléate (**German et al, 2006**).

Selon plusieurs auteurs, une procédure pour déterminer la capacité d'un antioxydant à inhiber la peroxydation des lipides ou de réduire le taux de formation de leur produit, a été décrite, dans laquelle une solution de β -carotène et d'acide linoléique est préparée. C'est une méthode colorimétrique basée sur la mesure de la couleur jaunâtre qui disparaît suite à la destruction oxydative du β -carotène par les produit de dégradation de l'acide linoléique (**Mata et al, 2006., Tepe et al, 2006**).

D'autres études utilisent des LDL (du plasma humain) (**Frei et Higdon, 2003**), ou des liposomes (préparés par sonication de la solution phosphatidylcholine dans l'eau) comme substrat dans le test de l'activité antioxydante (**Rathee et al, 2007**).

I.2- Tests d'évaluation de l'effet « scavenger » sur les radicaux libres :

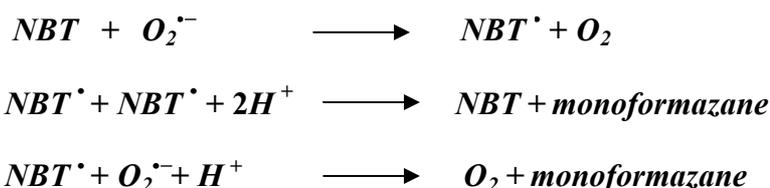
Les réactions des radicaux libres sont souvent très complexes. Il n'est pas aisé de savoir quel est le radical présent et à quel moment de la réaction il intervient. La méthode classique consiste à ajouter un composé capteur dans un système ou une réaction faisant intervenir des radicaux libres et donc une mesure directe de leur neutralisation.

I.2.1- Effet « scavenger » sur les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) :

L'anion ($O_2^{\cdot-}$) peut être généré par différentes méthodes, parmi elles :

- ❖ Une méthode enzymatique par exemple, le système xanthine/xanthine-oxydase (**Kessler et al, 2002**).
- ❖ Une méthode chimique. L'auto-oxydation des molécules, comme l'adrénaline et le glutathion, est une des méthodes chimiques de la production d'anion superoxyde. Ce dernier peut être également généré par addition du superoxyde de potassium dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) en présence d'oxygène (**Ruddock et al, 1981**).

Les méthodes décrites dans la littérature pour détecter l'anion ($O_2^{\cdot-}$) comprennent la réduction du ferricytochrome C (la réduction du fer hémique de la cytochrome C est suivi par spectrophotométrie a une longueur d'onde de 550nm), la conversion du bleu de nitrotétrazolium (**NBT**) en formazane (Cette réduction du NBT peut être suivie à 560 nm) (**Sundararajan et al, 2006**), l'oxydation de l'adrénaline (La formation d'adrénochrome peut être suivie à 480 nm) et la chimiluminescence.



I.2.2- Effet « scavenger » sur les radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) :

Nous citerons ici les trois méthodes les plus courantes pour générer le radical OH^{\cdot} :

- ❖ **Radiolyse de l'eau.**
- ❖ **Photolyse** : la photolyse du peroxyde d'hydrogène est la plus pratique, produisant deux radicaux (OH^{\cdot}) par molécule de peroxyde d'hydrogène (**Hou et al, 2003**).
- ❖ **Réactions chimiques** : la source la plus utilisée pour générer le radical OH^{\cdot} est la réaction de Fenton ou décomposition catalytique de l' H_2O_2 par l'action du fer (**Amarowicz et al, 2004**):



La mise en évidence de la formation du radical hydroxyle n'est pas facile vu sa grande réactivité et sa durée de vie très courte. De plus, il se trouve généralement en concentrations très faibles (**Hou et al, 2003**).

En principe, pour le détecter, des méthodes dites indirectes sont utilisées qui détectent les produits de sa réaction (**figure 8**). Par exemple, peuvent être mesurées l'oxydation et/ou la décomposition de certains substrats cibles, tels que le désoxyribose. La conséquence de cette oxydation est la formation de nouveaux produits qui seront détectés et quantifiés (**Sooبراتtee et al, 2005**).

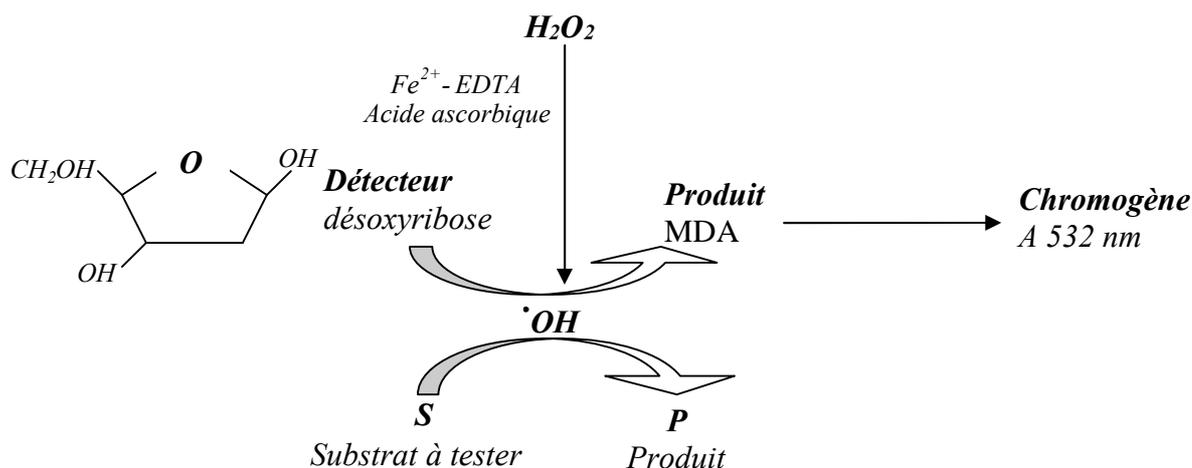


Figure 9 : Principe de détection des radicaux OH^\bullet (Soobrattee *et al*, 2005)

I.2.3- Effet « scavenger » sur les radicaux stables « $ABTS^+$ » et la méthode de « TEAC »:

La méthode spectrophotométrique de prédiction du pouvoir antioxydant vis-à-vis des ERO, mise au point par **Miller et al (1990)**, reste d'actualité. Il s'agit de mesurer le pouvoir antioxydant d'un composé vis-à-vis du 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) ($ABTS^+$), et de le comparer à un antioxydant de référence, le **Trolox** (Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), analogue de la vitamine E mais soluble dans l'eau (**Miller et al, 1997**). Cette méthode a donné le nom à un indice de pouvoir antioxydant, le **TEAC** (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity). Il s'agit de la concentration d'une solution de Trolox ayant la même activité antioxydante qu'une solution de la substance testée. En conséquence, Plus la valeur du **TEAC** est élevée plus le composé possède une activité antioxydante importante. A titre d'exemple, la quercétine est l'une des flavonoides possédant un **TEAC** le plus élevé (4,7)

Le radical cationique « **ABTS^{•+}** », possède un spectre d'absorption maximal à 734 nm (**Zhou et al, 2004., Zhou et Yu, 2004**). Le radical « **ABTS^{•+}** » résulte de l'oxydation de l'ABTS en présence d'une peroxydase (telle que metmyoglobine) et H₂O₂ (**Kranl et al, 2005**) ou d'un agent chimique (tel que MnO₂) à une température ambiante pendant 30min qui se traduit par une coloration bleue verte. L'intensité de la couleur diminue en présence d'une substance antiradicalaire (**Liangli et Zhou, 2004., Ivanova et al, 2005**).

D'autres méthodes basées sur le même principe existent. On pourrait, entre autres, citer la méthode au **DPPH** (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyle) qui est un radical libre stable (**Nichizawa et al, 2005., Chandrasekar et al, 2006., Bortolomeazi et al, 2007**).

I.2.4- D'autres méthodes de mesure de l'activité antioxydante :

D'autres tests permettent d'évaluer l'activité antioxydante par la mesure du pouvoir réducteur des échantillons à étudier. La méthode (**FRAP**) (**Ferric Reducing Ability of Plasma**) (**Wong et al, 2006**), utilisée au départ pour mesurer le pouvoir antioxydant du plasma humain, a été étendue par la suite à d'autres échantillons biologiques voire des plantes médicinales, fruits et autres végétaux (**Katalinic et al, 2006**). Le principe du test repose sur la réduction du fer ferrique tripyridiltriazine (**TPTZ**)-**Fe(III)** en fer ferreux (**TPTZ**)-**Fe(II)** dans un milieu acide. De cette réduction résulte une couleur bleue mesurable à 593 nm (**Kranl et al, 2005., Mohammadzadeh et al, 2006**).

La méthode ferricyanure est basée sur la réduction du Fe³⁺ (**FeCl₃**) en Fe²⁺ (**FeCl₂**) en présence d'un agent chromogène (ferricyanure de potassium) à un pH acide (Acide Trichloracétique « **TCA** ») (**Ozturk et al, 2006**)

Partie pratique

Chapitre I

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes :**I- Matériel :****I.1. Matériel végétal:**

Nos études ont portés sur deux espèces de *Fumaria*. Pour l'étude de l'effet anti-peroxydase de nos extraits, le chou a servi comme source d'extrait enzymatique.

I.1.1- *Fumaria*

Notre étude a été réalisée sur la partie aérienne de deux espèces du même genre :

- ❖ La partie aérienne de la plante *Fumaria capreolata*.
- ❖ La partie aérienne de la plante *Fumaria bastardii*.

Nos échantillons ont été récoltés la matinée dans une région rurale, Amizour dans la wilaya de Bejaia, durant la période de fructification (**Avril, 2006**), moment propice pour la cueillette. Leur identification est effectuée, au laboratoire de biologie végétale, de la **FSNV**, de l'Université A. Mira de Bejaia, et en utilisant la flore des plantes Algériennes (**Quezel et Santa, 1963**).

➤ Echantillonnage :

Les échantillons utilisés sont reportés comme suit :

- ❖ **Fc:** Echantillon de *F. capreolata*.
- ❖ **Fb:** Echantillon de *F. bastardii*.

a) Description botanique de *Fumaria capreolata* (Fumeterre grimpante):

C'est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle, hermaphrodite de 20cm à 1m de longueur (**figure 10**).

- ❖ Elle a une tige rameuse, grimpante grâce aux pétioles contournés en vrilles.
- ❖ Les feuilles sont : de couleur vert clair, alternes, pétiolées, composées.
- ❖ Les fleurs sont blanches à roses et pourpre au bout, regroupées en épi sur un pédoncule long, sépales larges et ovales, aigus ou subaigus.
- ❖ Inflorescence : racème simple, assez lâche ; pédicelle arqué-récurvé ;

- ❖ Floraison Avril-Juin.
- ❖ Le fruit : est une capsule lisse, sphérique, à une graine, avec un creux au sommet.
- ❖ Habitat : bord des chemins, haies, talus, murs, cultures (Valka, 1988., Salinas *et al*, 2003).



Figure 10 : Photographie de la plante *Fumaria capreolata*

b) Description botanique de *Fumaria bastardii*:

C'est une Plante annuelle ou bisannuelle de 10 à 70cm de longueur (**figure 11**)

- ❖ Les feuilles sont alternes de couleur verte, à segments étroits et aplatis.
- ❖ Les fleurs sont zygomorphes, nombreuses, de couleur rose pourprée à sommet noir rougeâtre ; ayant des sépales irrégulièrement dentés.
- ❖ Le fruit est formé d'une capsule à une graine, pointu au sommet, habituellement rugueux à maturité.
- ❖ Floraison de Mars à juin.
- ❖ Habitat : elle est extrêmement rare, on la retrouve généralement dans les champs, et au bord des murs (Deysson, 1970 ; Liden, 1986).



Figure 11 : photographie de la plante *Fumaria bastardii*

I.1.2- Le chou :

Nous avons utilisé du chou vert frais, récolté au début du mois d'**Avril (2007)** dans la région d'Akbou dans la wilaya de Bejaia. La récolte s'est faite la matinée et l'extrait enzymatique a été préparé le jour même.

- **Noms communs** : chou, chou blanc, chou vert
- **Nom scientifique** : *Brassica oleracea*
- **Famille** : Crucifère.

Le nom latin de l'espèce « *Brassica* » serait dérivé d'un mot celte, « *bresic* », qui voulait justement dire « chou », alors que « *oleracea* » veut dire potager. Un « *Brassica oleracea* » est un chou du potager.

I.2. Matériel et réactifs :

Le matériel et réactifs utilisés pour les différentes extractions et pour le dosage des substances actives sont reportés en annexe (**annexe 1**).

II. Méthodes :

II.1- Séchage :

Nos échantillons de *Fumaria* sont débarrassés de la poussière, du sable et autres particules (à l'eau courante), puis séchés à l'étuve à **40°C** pendant dix jours, pour obtenir une meilleure extraction. Le séchage à l'étuve permet un meilleur broyage (**Debuigne, 1991**).

II.2- La granulométrie :

Elle est en rapport direct avec toutes les opérations unitaires de broyage et de séparation (**Naczk et Shahidi, 2004**).

a) Broyage:

Les échantillons séchés sont réduits en poudre grâce à un broyeur électrique « **KIKA Labortechnik** ».

b) Tamisage :

Le tamisage a été réalisé avec un tamiseur à huit tamis de marque « **RETSCH** », dont les diamètres sont : 4mm, 2mm, 1mm, 500 µm, 250 µm, 125 µm, 63µm et 45µm. Les poudres obtenues sont conservées dans des récipients en verre et stockées à l'abri de la lumière. Seule la poudre dont le diamètre est inférieur à 45 µm a servi pour la préparation des échantillons.

La procédure d'extraction des composés actifs des plantes est influencée par la granulométrie (la taille des particules de l'échantillon). La meilleure extraction est obtenue avec le plus petit calibre (45 µm), ceci est dû à l'augmentation de la surface de contact avec le solvant (**Naczk et Shahidi, 2004**).

II.3- Extraction et Identification des Alcaloïdes et des composés phénolique des deux espèces de *Fumaria* ssp :

Nous avons utilisé pour toutes les extractions la méthode d'extraction par « Soxhlet » (**figure 12**) pour extraire une quantité plus importante de poudre sèche de nos espèces de *Fumaria*. L'extracteur de « Soxhlet » permet le traitement de solides (matériel végétal) en plus grande quantité que la macération, avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmontée d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté (**Houghton et Raman, 1998**).

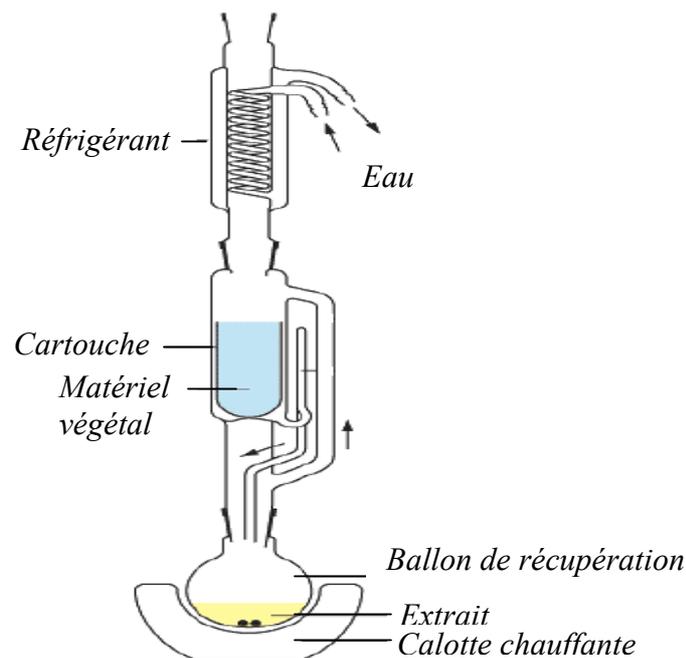


Figure 12: Système d'extraction au Soxhlet (**Houghton et Raman, 1998**).

a.1) Extraction d'alcaloïdes totaux :

La méthode d'extraction utilisée est solide-liquide, selon le protocole préconisé par (Sousek *et al*, 1999). Le protocole d'extraction est schématisé sur la **figure (13)**.

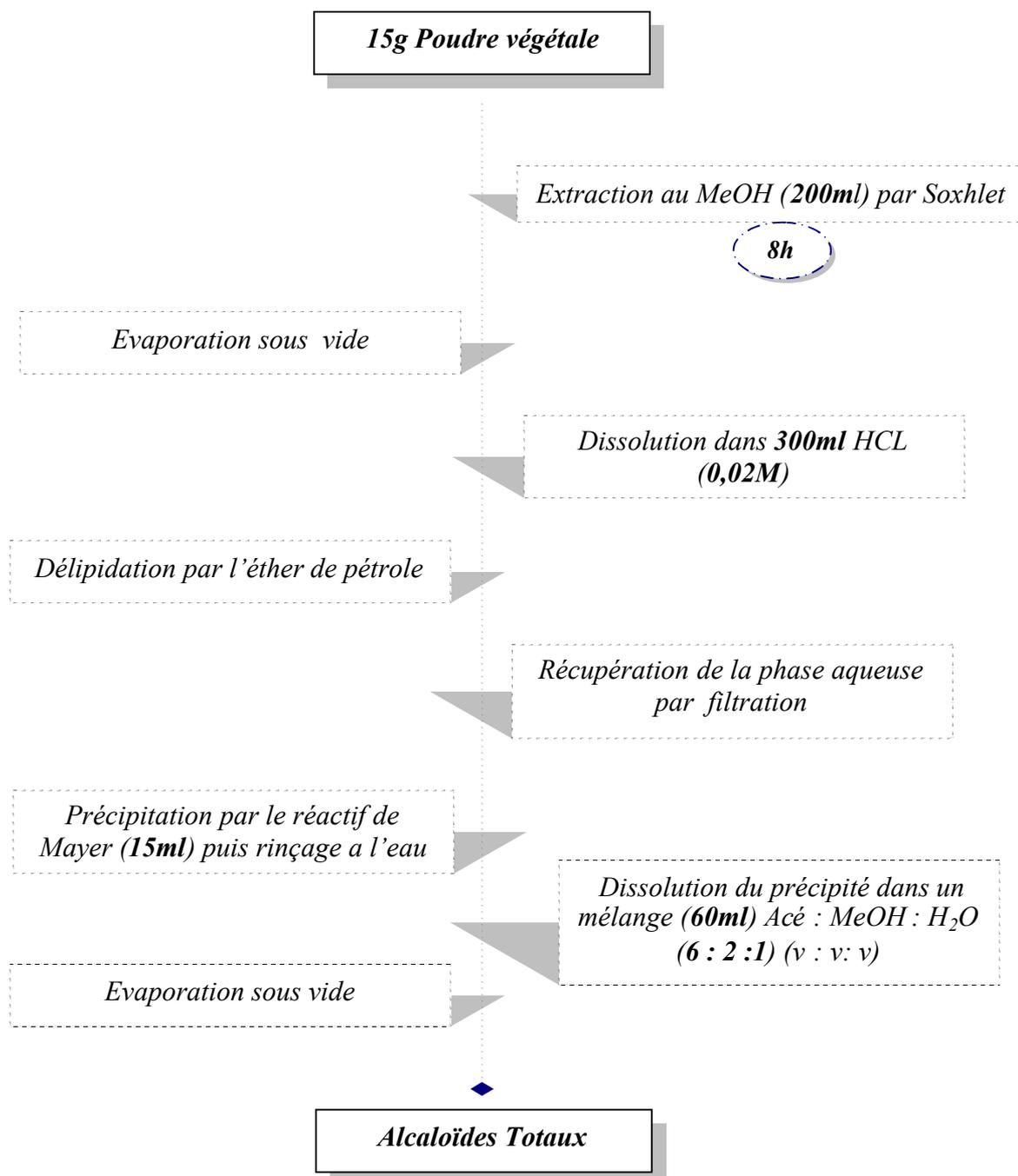


Figure 13 : Différentes étapes d'extraction des alcaloïdes totaux des parties aériennes de *Fumaria capreolata* et *Fumaria bastardii* (Sousek *et al*, 1999).

a.2) Identification par RP-HPLC :

La séparation des alcaloïdes de nos extraits a été tentée par HPLC suivant le protocole schématisé sur la **figure (14)**.

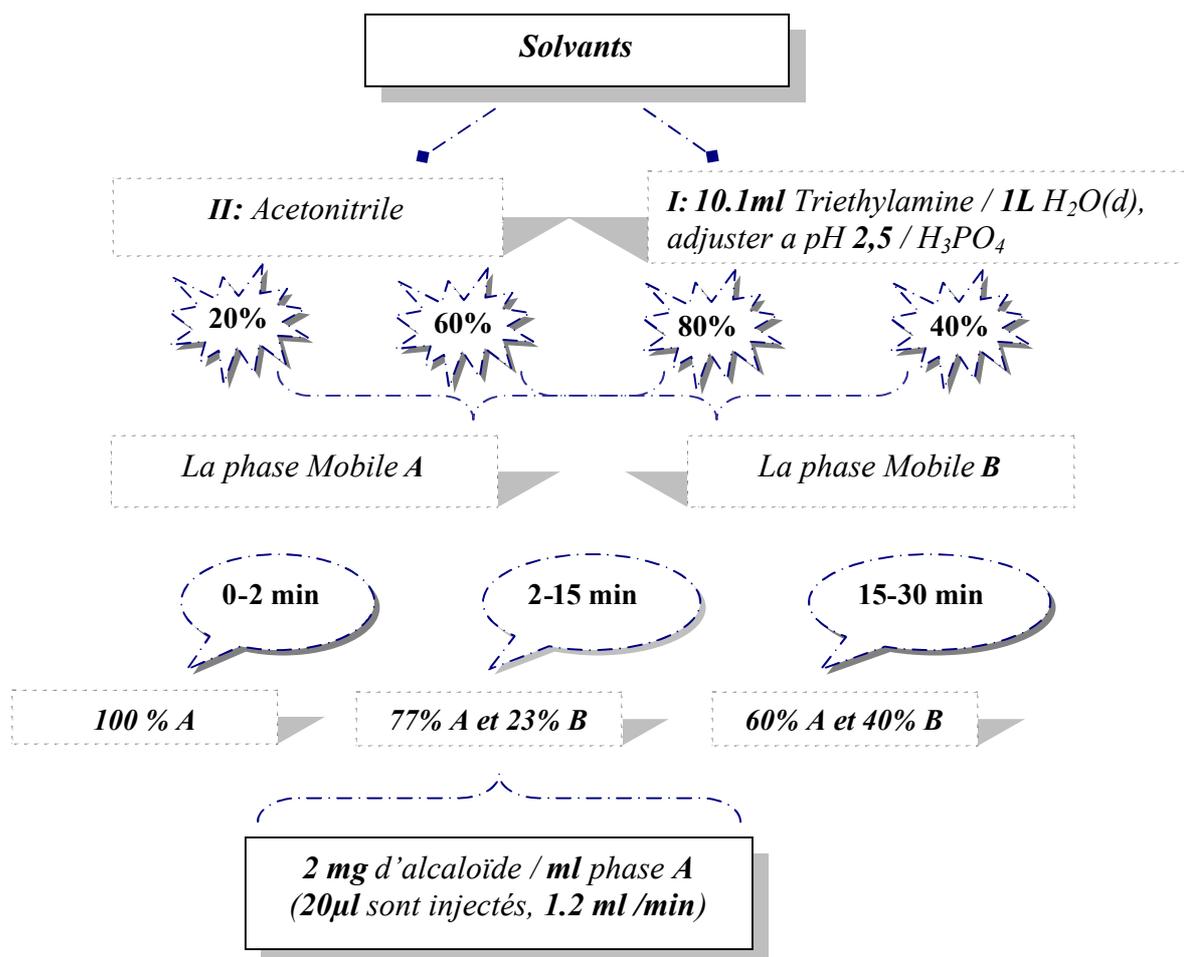


Figure 14 : Séparation des alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* par HPLC (Sousek et al, 1999).

b.1) Extraction d'antioxydant :

Nous avons procédé à l'extraction des substances antioxydantes à partir des poudres végétales en suivant la méthode préconisée par **Sahid *et al* (2007)**. Le protocole d'extraction est reporté sur la **figure (15)**

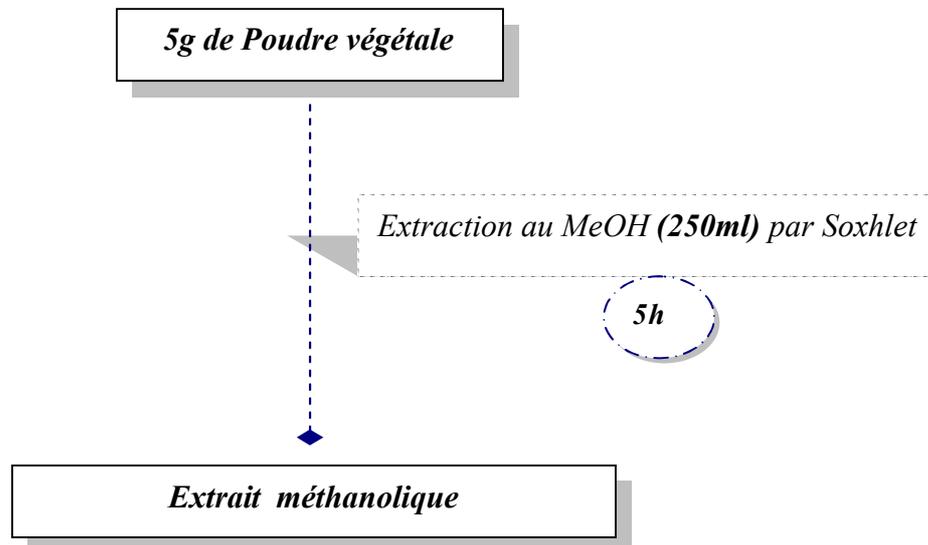


Figure 15 : Extraction des substances actives de nos plantes (**Shahid *et al*, 2007**).

- ❖ L'extrait méthanolique sera analysé par HPLC et utilisé pour les différents tests d'activité antioxydante.
- ❖ Les antioxydants suivants seront utilisés comme références : la Quercétine, la BHA, l'Acide gallique et la Caféine.

b.2) Identification des composés phénoliques totaux par RP-HPLC :

Les composés phénoliques de nos extraits sont analysés par **HPLC** en mode isocratique selon la méthode de **Moore et al (2005)** modifiée. Le protocole suivi est schématisé sur la **figure (16)**.

On doit noter q'une dilution dans le cas de l'extrait méthanolique de *F.bastardii* a été utile pour l'identification des polyphénols par HPLC

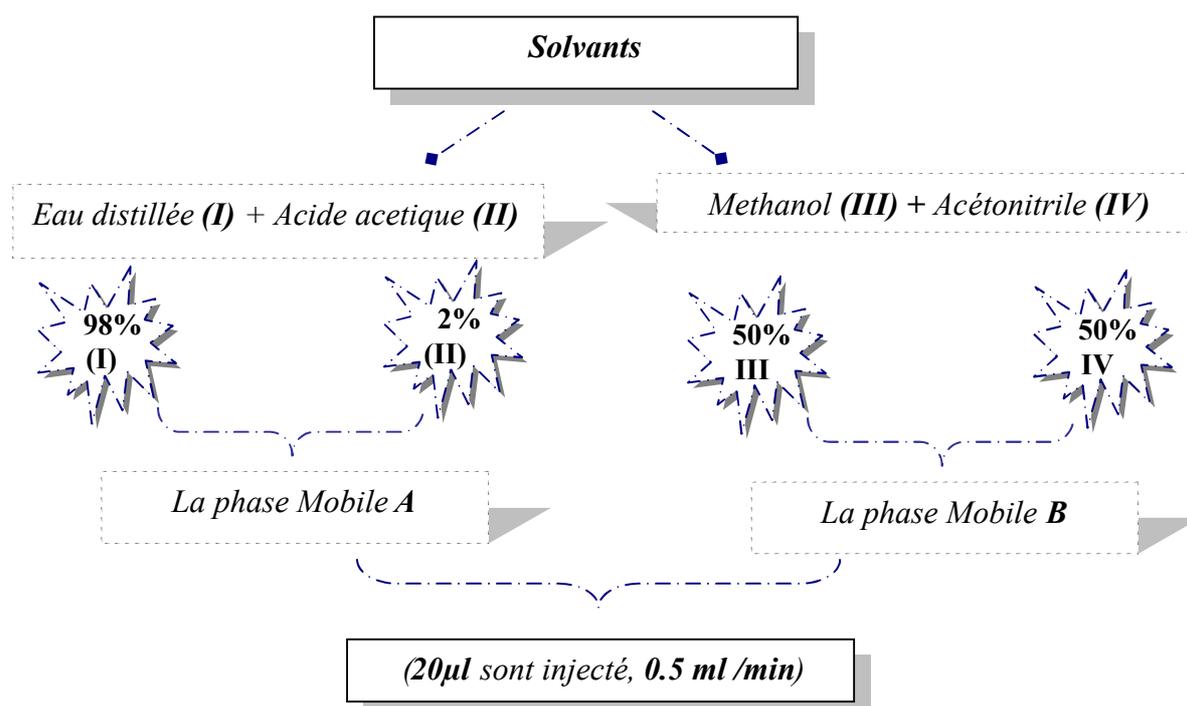


Figure 16 : Conditions opératoires de l'analyse des polyphénols par **HPLC** (**Moore et al, 2005**).

II.4- Dosage des substances actives :

Nous avons procédé à l'extraction des substances à doser à partir des poudres végétales en suivant la méthode préconisée par (Souseck *et al*, 1999). Le protocole d'extraction est reporté sur la **figure (17)**

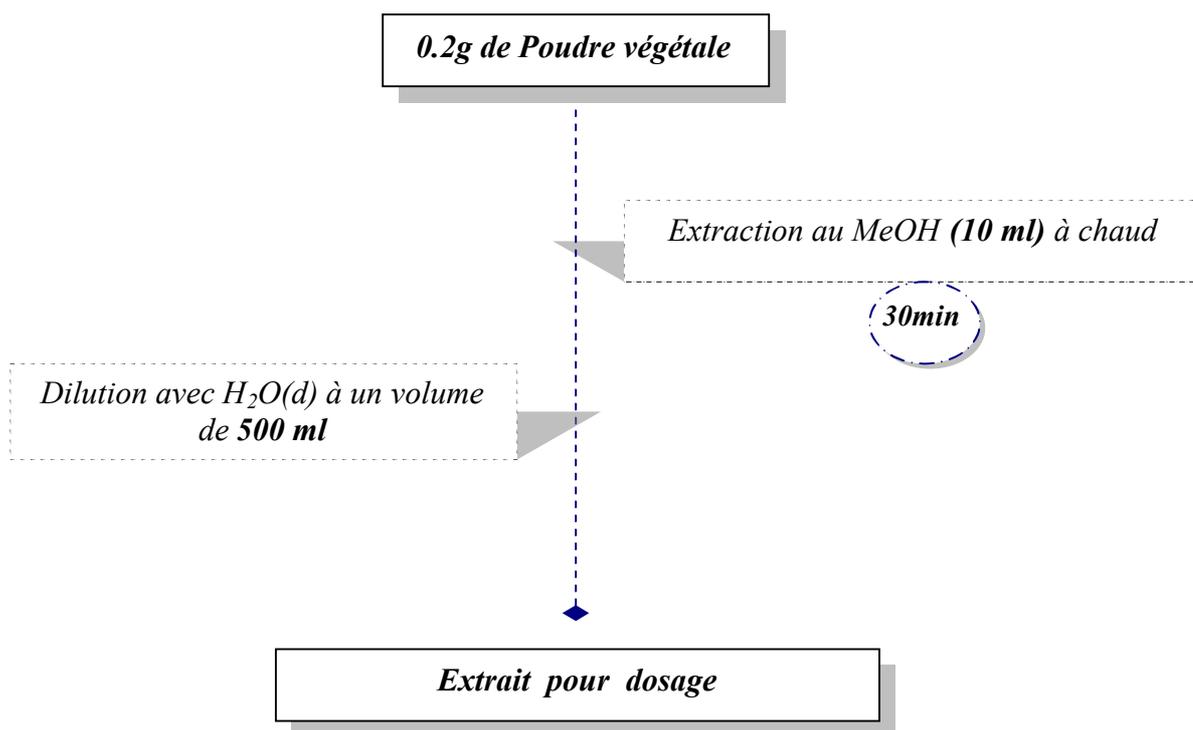


Figure 17 : Extraction des substances actives des deux espèces de fumeterre (Souseck *et al*, 1999).

a)- Dosage des composés phénoliques totaux :

Le taux des composés phénoliques de nos extraits est estimé selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)** in **Souseck *et al* (1999)**.

Le principe repose sur l'interaction des polyphénols avec le réactif de Folin-Ciocalteu qui se traduit par une couleur bleue, où l'intensité dépend du nombre de groupements hydroxyles ainsi que de leur position dans les molécules. Le mode opératoire est schématisé sur la **figure (18)**.

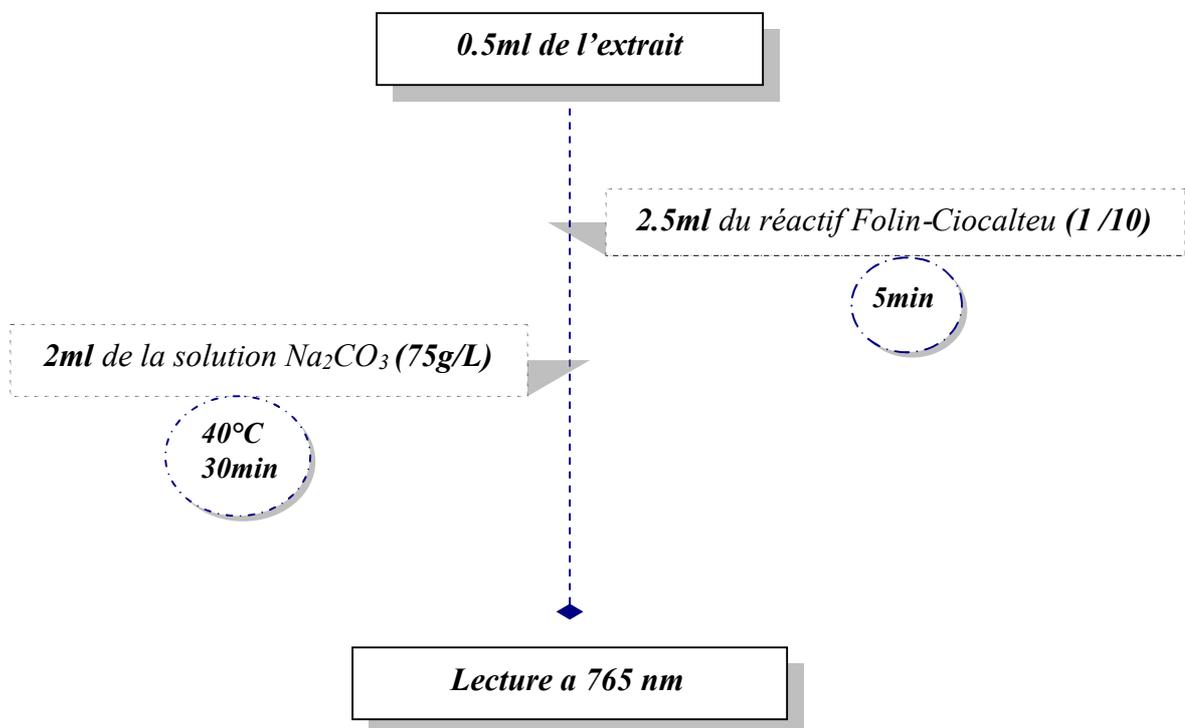


Figure 18 : Protocole de dosage des composés phénoliques (**Souseck *et al*, 1999**).

- ❖ **Le blanc** est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par l'H₂O(d).
- ❖ La concentration en composés phénoliques de l'extrait de nos plantes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant **l'acide gallique**.

b) Dosage des Flavonoides totaux :

Les flavonoides de nos extraits sont déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de **Quettier-Deleu *et al* (2000)** in **Djeridane *et al* (2006)**.

Le principe est basé sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium qui a un maximum d'absorbance à 488 nm. Le protocole est présenté dans la **figure (19)**.

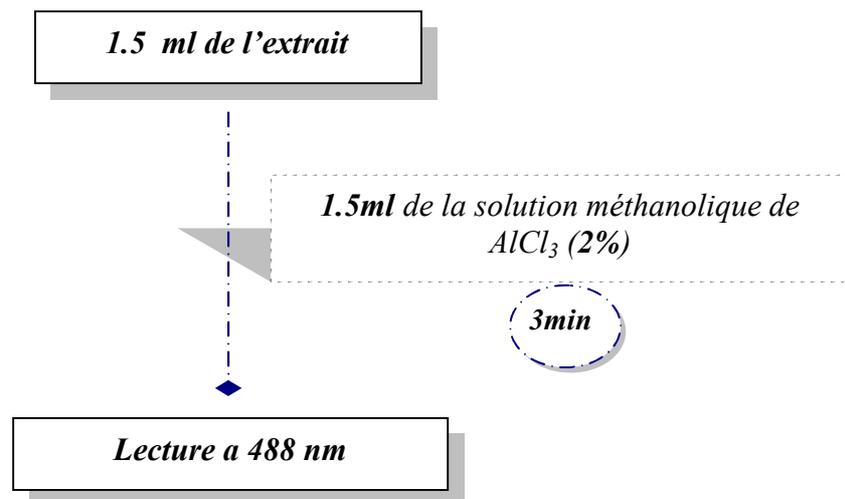


Figure 19 : Procédure de dosage des flavonoides totaux (Djeridane *et al* 2006).

- ❖ **Le blanc** est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par l'H₂O(d)..
- ❖ La concentration en Flavonoides de l'extrait de nos plantes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la **quercétine**.

II.5- Détermination de l'activité antioxydante :

Afin de déterminer le pouvoir antioxydant de nos différents extraits nous avons procédé à différents tests biologiques tels que l'étude de leur pouvoir réducteur, de leur effet « Scavenger » (capture des radicaux libres), de l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique ainsi que la mise en évidence d'une activité anti-peroxydase de nos extraits.

a) Mesure du pouvoir réducteur

Cette étude est réalisée selon la méthode de **Oyaizu (1986)** in **Amarowicz et al (2004)**. L'étude repose sur la détection d'un complexe de couleur bleu qui à un maximum d'absorbance à 700nm et dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en antioxydant. Le mode opératoire est schématisé sur la **figure (20)**.

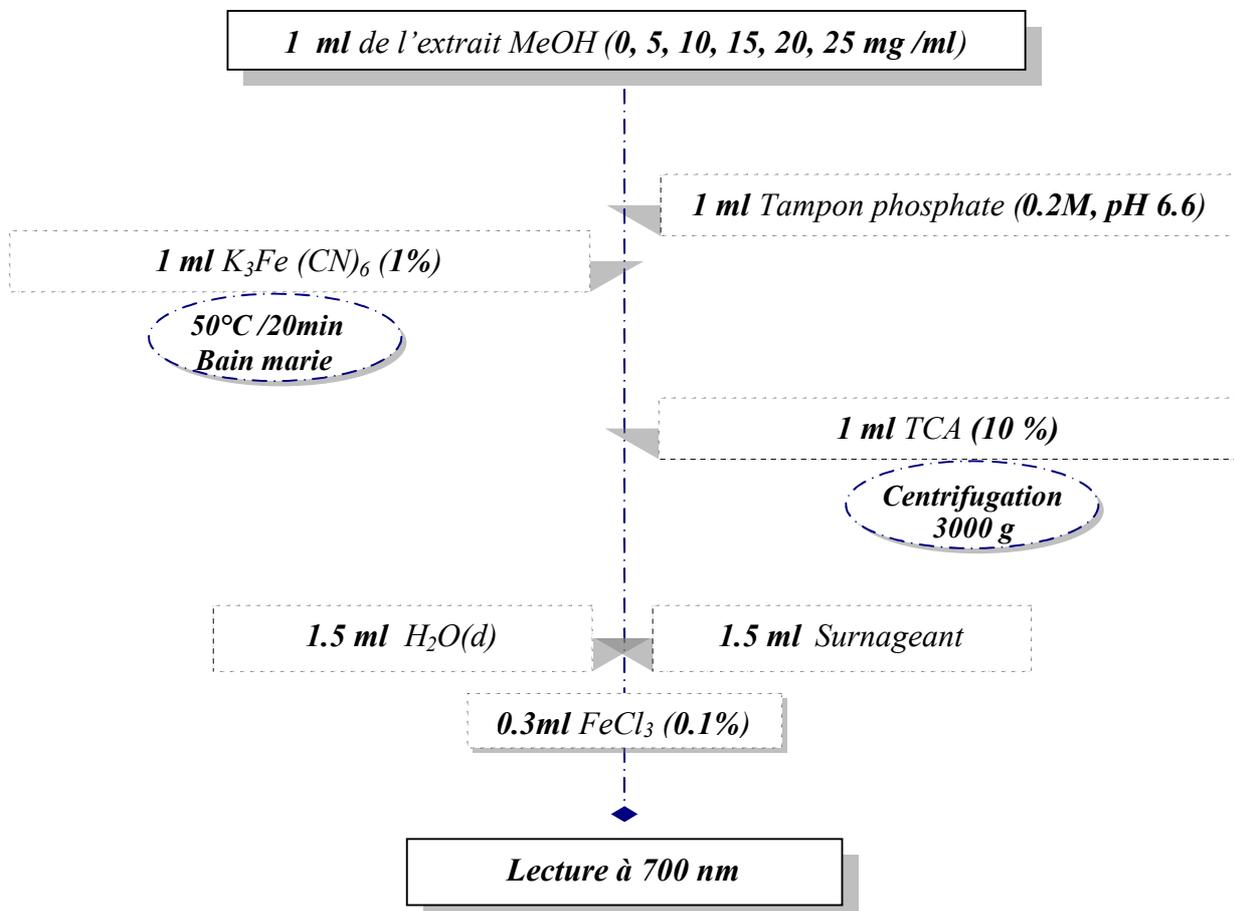


Figure 20 : Protocole d'étude du pouvoir réducteur (Amarowicz et al, 2004)

- ❖ **Le blanc** est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant.
- ❖ Une augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur (**Blàzovics et al, 2003**).

b) Activité « scavenging » du radical DPPH :

L'effet « scavenger » de nos extraits vis à vis du radical **DPPH** est mesuré selon la méthode de **Shirwaikar *et al* (2006)**.

Le but de l'expérimentation est la mesure par spectrophotométrie de la capacité des extraits de nos plantes à réduire une espèce radicalaire. Le **DPPH** de couleur violette en solution vire vers une couleur jaunâtre lorsque son électron célibataire est apparié avec un hydrogène provenant d'un antioxydant (test de décoloration). L'intensité de la couleur est inversement proportionnel à la concentration d'antioxydant et au temps de la réaction (**Molyneux, 2004**).

Le protocole suivi est reporté sur la **figure (21)**.

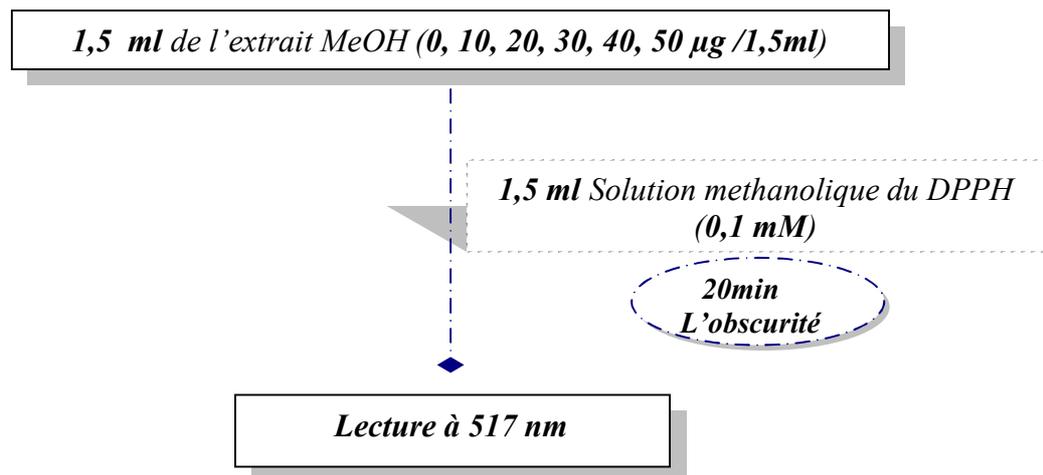


Figure 21 : Protocole d'étude de l'activité « scavenging » du DPPH (**Shirwaikar *et al*, 2006**).

Le pourcentage «scavenging » est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Scavenging du radical DPPH} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100\%$$

- ❖ A_b : Absorbance du blanc (l'extrait est remplacé par le MeOH + DPPH).
- ❖ A_s : Absorbance en présence chaque concentration d'extrait (extrait + DPPH).

c) Mesure de l'inhibition de l'auto-oxydation de l'acide linoléique :

Cette activité antioxydante a été mesurée selon la méthode de thiocyanate ferrique (FTC) rapportée par Pérez et ses collaborateurs (2003). C'est une méthode colorimétrique (figure 22) permettant l'évaluation du taux des peroxydes présents en absence et en présence d'antioxydant. Le pourcentage d'inhibition est calculé par la même formule que pour l'activité scavenger du DPPH.

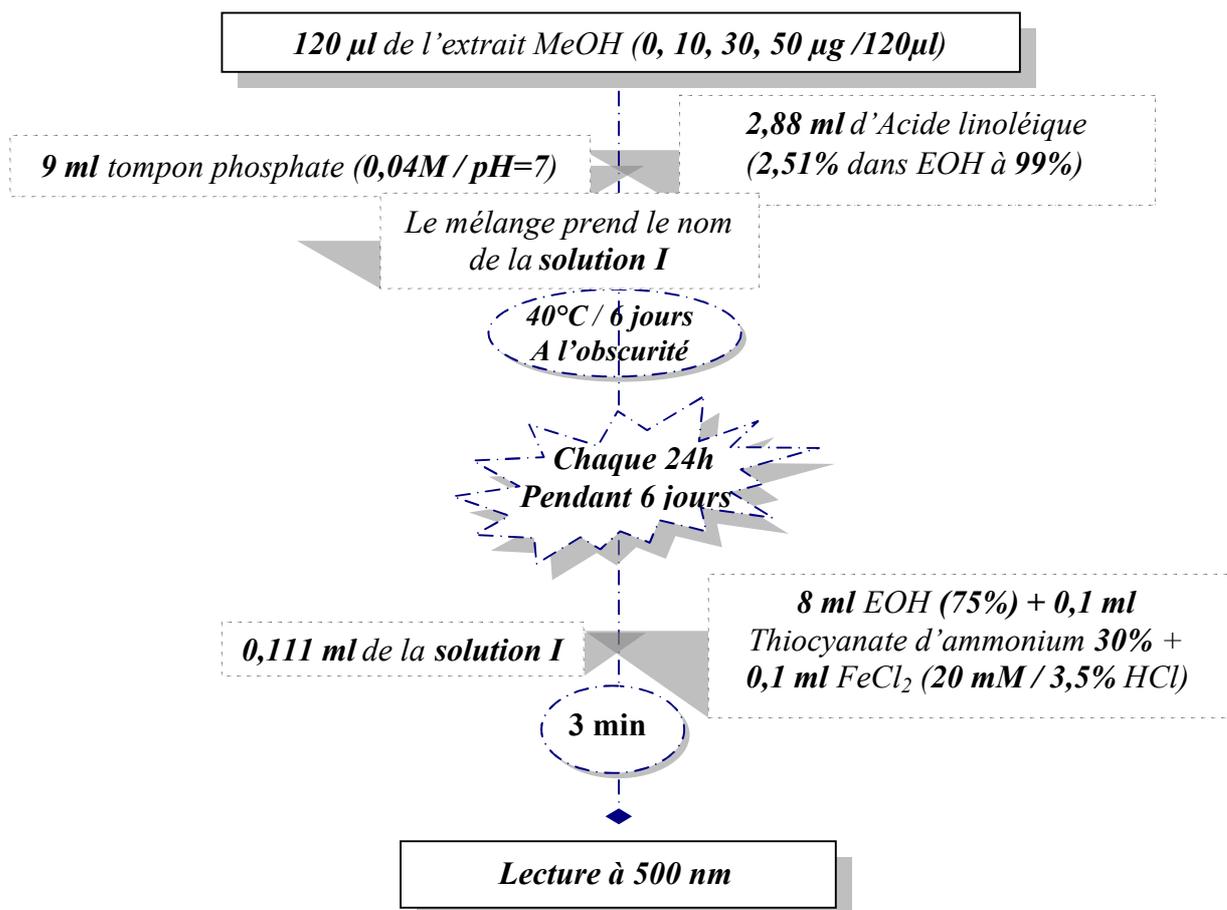


Figure 22 : Protocole d'étude de l'inhibition de l'acide linoléique (Pérez *et al*, 2003).

d) Mesure de l'activité anti-peroxydase :

Les denrées alimentaires peuvent subir des réactions de dégradation diverses durant toutes les étapes impliquées dans leur production à partir du champ jusqu'au consommateur. Ces denrées vont subir à des degrés variables des détériorations physiques, chimiques, enzymatiques et/ou microbiologiques. Les détériorations, qu'un aliment peut subir, dépendent de la nature de son état (frais ou transformé) des conditions de récolte, de transformation, de conditionnement, de stockage et de commercialisation (**Amiot *et al*, 1997**).

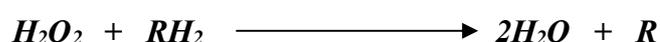
Les principales réactions chimiques de dégradation des aliments sont : le brunissement enzymatique, le brunissement non enzymatique, l'oxydation des lipides et l'hydrolyse enzymatique des constituants des aliments comme les lipides et les glucides (**Amiot *et al*, 1992**).

Les réactions de dégradation des aliments sont généralement indésirables dans la mesure où elles aboutissent à l'altération de l'aliment en modifiant ses caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles. Dans d'autres cas, certains de ces réactions sont recherchés pour donner à l'aliment la couleur et le goût désiré (**Chen *et al*, 2000**).

Le brunissement enzymatique correspond à la conversion des composés phénoliques en polymères colorés, le plus souvent bruns ou noirs « les mélanines ».

Les cellules végétales renferment des composés phénoliques qui s'oxydent facilement en quinones en présence d'oxygène, sous l'action d'enzymes (polyphénol-oxydase, peroxydases). Les quinones formées s'oxydent à leur tour, sans faire appel à des enzymes particulières, et se polymérisent en donnant des composés bruns qui sont responsables du brunissement superficiel ou profond apparaissant en diverses circonstances (**Kranl *et al*, 2005**).

La peroxydase intervient dans la réduction de l' H_2O_2 pour donner un complexe actif qui peut inter-agir avec des molécules donneuses.



L'acidification du milieu ou un traitement à température élevée (70 à 90°C), Les sulfites, qui sont des inhibiteurs puissants du brunissement enzymatique, sont très souvent utilisés pour prévenir les brunissements, ainsi que l'utilisation d'additifs (NaCl, CaCl₂) (**Fayad-Dahouk, 1998**).

Le consommateur préfère toujours des aliments avec le moins possibles de produits chimiques, c'est pour cette raison et pour la conservation des qualités nutritionnelles et sensorielles, que des chercheurs se sont intéressés à la recherche des inhibiteurs naturels du brunissement enzymatique des aliments (**Castaner et al, 1992., Peschel et al, 2005**).

Le choix de l'étude de l'effet de nos extraits sur l'activité de cet enzyme est lié au fait que ce dernier est probablement l'enzyme qui présente le meilleur rapport entre la facilité de préparation et de conservation et la variété des applications pédagogiques possibles (**Andrews et al, 2000**).

d.1) Préparation de l'extrait enzymatique :

Le travail est réalisé sur un extrait brut obtenu à partir de chou frais (le chou étant une plante connue pour sa richesse relative en peroxydase) (**Neves, 2002**).

Le choix du chou comme source d'enzyme (peroxydase) a été fait en se basant sur les résultats obtenus par **Ponce et ses collaborateurs (2004)** qui en étudiant plusieurs extraits végétaux, ont montré que l'extrait brut du chou présente la plus grande activité enzymatique (**29081,88 UI/min/g**) en comparaison à d'autres extraits tels que l'extrait d'épinard (**1745,87 UI/min/g**), l'extrait de laitue scarolle (**4647,21 UI/min/g**), d'épinard blette (**1285,381 UI/min/g**), de laitue romaine (**1014,53 UI/min/g**)

La préparation de l'extrait enzymatique est réalisée selon le protocole schématisé sur la **figure (23)**.

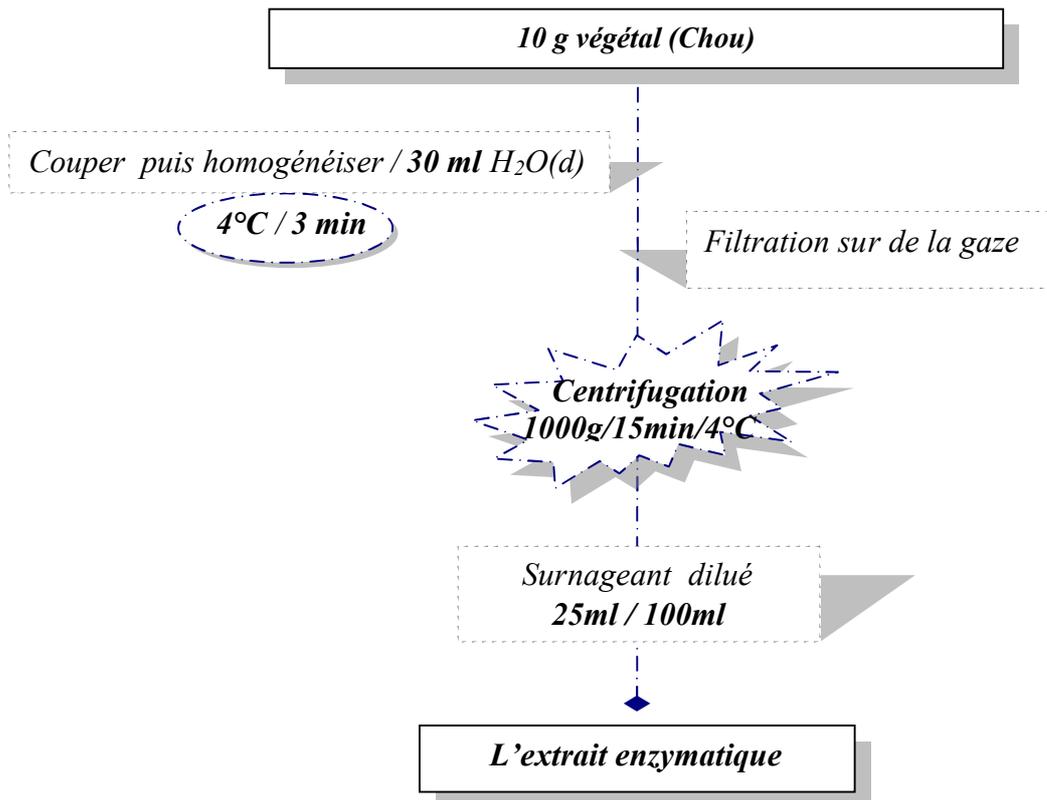


Figure 23 : Schéma de préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase (Ponce *et al*, 2004).

d.2) Préparation de la solution « Substrat » :

L'enzyme est spécifique du peroxyde comme accepteur d'hydrogène mais tolère de très nombreux substrats « RH_2 » comme donneur d'hydrogène. Ces substrats sont des dérivés phénoliques comme le méthoxyphénol ("gaiacol"), la dianisidine, la diaminobenzidine (cancérigène) le 4-hydroxydiphényl et la 1,2-phénylène diamine (les deux donneurs les plus actifs) etc. Ils changent de couleur lorsqu'ils sont oxydés par l'enzyme. Cette propriété rend possible l'étude de l'activité enzymatique par photolorimétrie.

Réduction**Oxydation**

- ❖ Le peroxyde à **10 V** (volumes) est utilisé comme solution mère (Substrat peroxyde).
- ❖ Le gaiacol à **100 %** est utilisé comme solution mère (Substrat gaiacol).

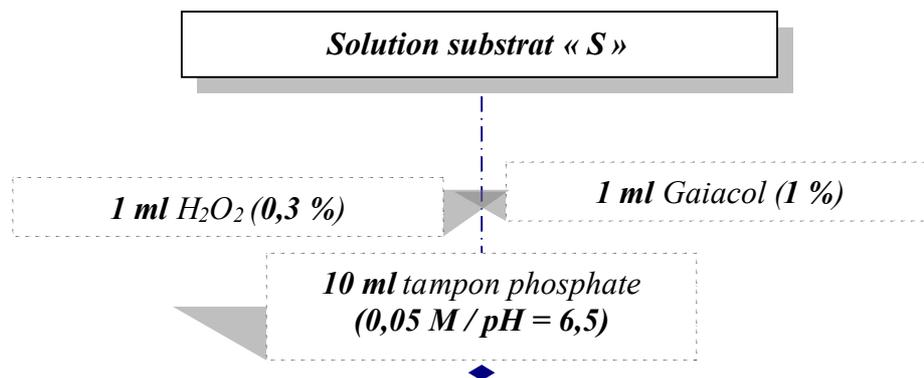


Figure 24 : Procédure de préparation de la solution Substrat (Ponce *et al*, 2004).

d.3) Mesure de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique de la peroxydase est estimée par spectrophotométrie, l'oxydation du gâicol (donneur d'hydrogène) en présence de l'enzyme donnant une couleur brun-rosé dont l'apparition peut être suivie à 470nm.

Le test est réalisé :

- ❖ En absence de l'antioxydant qui sera remplacé par le méthanol (le blanc).
- ❖ En présence de l'enzyme et de l'antioxydant.

La même opération est répétée pour les diverses concentrations d'antioxydant et d'extraits. On note les absorbances au temps **20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 et 160** secondes pour chaque concentration (y compris le blanc).

La réaction est déclenchée immédiatement après ajout au milieu réactionnel de **0,1ml** de l'extrait enzymatique.

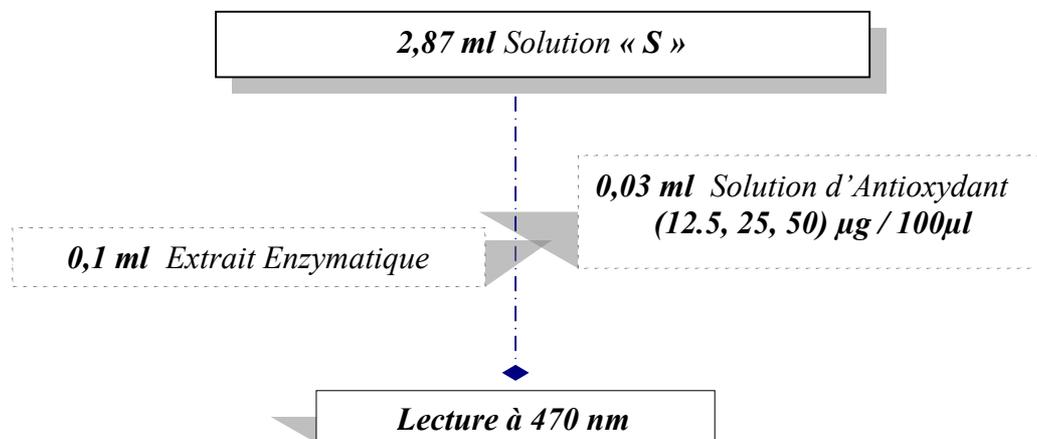


Figure 25 : Mode opératoire de l'étude de l'activité anti-péroxydase (Ponce *et al*, 2004).

Chapitre II
Résultats et discussions

Résultats et discussion :

I. Taux d'extraction des alcaloïdes :

L'extraction d'alcaloïdes est réalisée dans un milieu acide en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. La technique de précipitation par le réactif de Mayer (le précipité est un complexe d'alcaloïdes sous forme d'iodomercures) convient particulièrement aux alcaloïdes tertiaires et quaternaires, ceux recherchés dans notre étude (Suau *et al*, 2002).

Le taux d'extraction d'alcaloïdes des deux espèces de *Fumaria* a été calculé par rapport à la masse de la poudre initiale.

Le tableau suivant (n° 7) résume le pourcentage d'alcaloïdes que renferme *F.capreolata* et *F.bastardii*

Tableau n° 7 : Le rendement en alcaloïdes totaux de *F.capreolata* et *F.bastardii*.

substrat \ Extrait	<i>F.capreolata</i>	<i>F.bastardii</i>
Alcaloïdes	1,33%	2,66%

Les taux de 1,33% et 2,66% semblent être élevés pour un métabolite secondaire dans une plante, mais certaines plantes alcaloïdifères peuvent renfermer jusqu'à 4% voir 10% d'alcaloïdes (Bruneton, 1999). Nos deux espèces semblent être plus riches en alcaloïdes en comparaison à d'autres espèces du même genre. En effet on observe chez *F.bella* un taux de 0,67%, dans le cas de *F.sepium* et *F.agraria* des rendements allant respectivement jusqu'à 0,88% et 0,83% ont été observés (Rahman *et al*, 1994., Susplugas *et al*, 1975). Les forts taux d'alcaloïdes calculés chez nos deux espèces peuvent s'expliquer par la méthode d'extraction utilisée, l'utilisation du réactif de Mayer, un des réactifs de la famille des réactifs généraux des alcaloïdes, permettant la récupération sélective des alcaloïdes totaux sous forme de précipité. Les autres rendements obtenus dans d'autres études n'utilisent pas la même procédure d'extraction c'est-à-dire n'utilisent pas un réactif spécifique aux alcaloïdes.

II. Identification par RP-HPLC des alcaloïdes et des polyphénols des deux espèces de *Fumaria* :

II.1 Identification des alcaloïdes :

L'analyse des extraits d'alcaloïdes de *F. capréolata* et *F. bastardii* par RP-HPLC montre l'existence de plusieurs fractions alcaloïdiques pour les deux espèces. L'identification sera faite par comparaison avec des données bibliographiques.

L'utilisation du gradient « Acétonitrile : Triéthylammonium Phosphate » permet une bonne résolution de la séparation des alcaloïdes tertiaires et quaternaires (Souseck *et al*, 1999).

L'analyse par HPLC à gradient des extraits alcaloïdiques de nos échantillons nous a permis d'obtenir 11 et 9 fractions pour respectivement *F. capreolata* (figure 26) et *F. bastardii* (figure 27). L'identification des alcaloïdes isoquinoléiques constituant ces fractions a été faite par comparaison directe des temps de rétentions « t_R » avec des données bibliographiques (Forgacs *et al*, 2000., Kursinszki *et al*, 2006., Suau *et al*, 2002., Pander *et al*, 1978., Souseck *et al*, 1999).

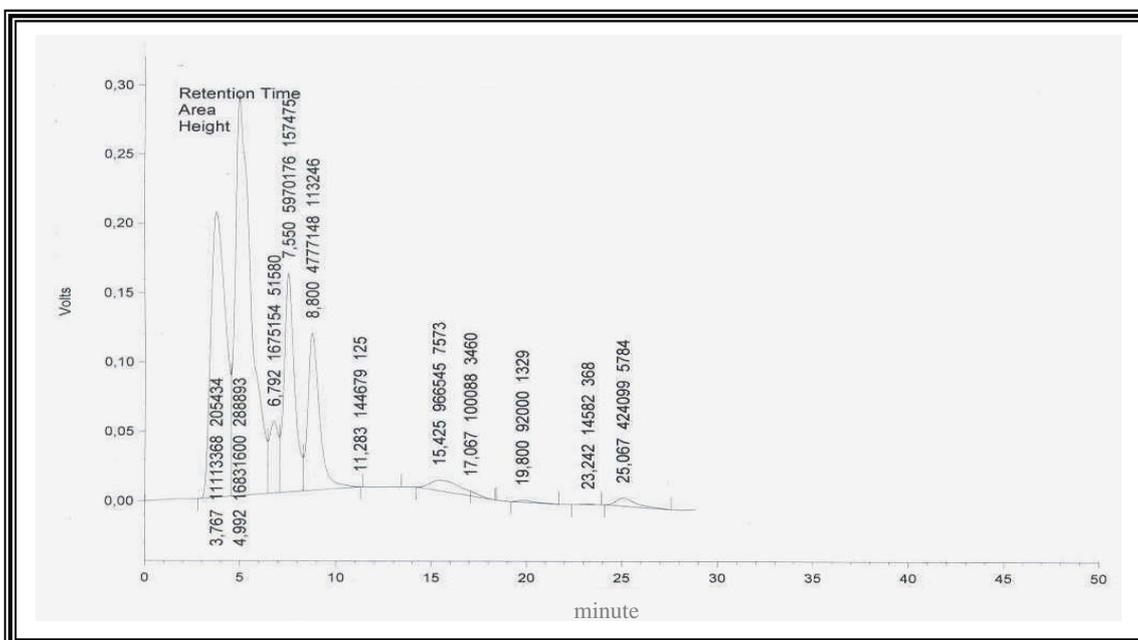


Figure 26 : Profil HPLC des Alcaloïdes de *F. capreolata*

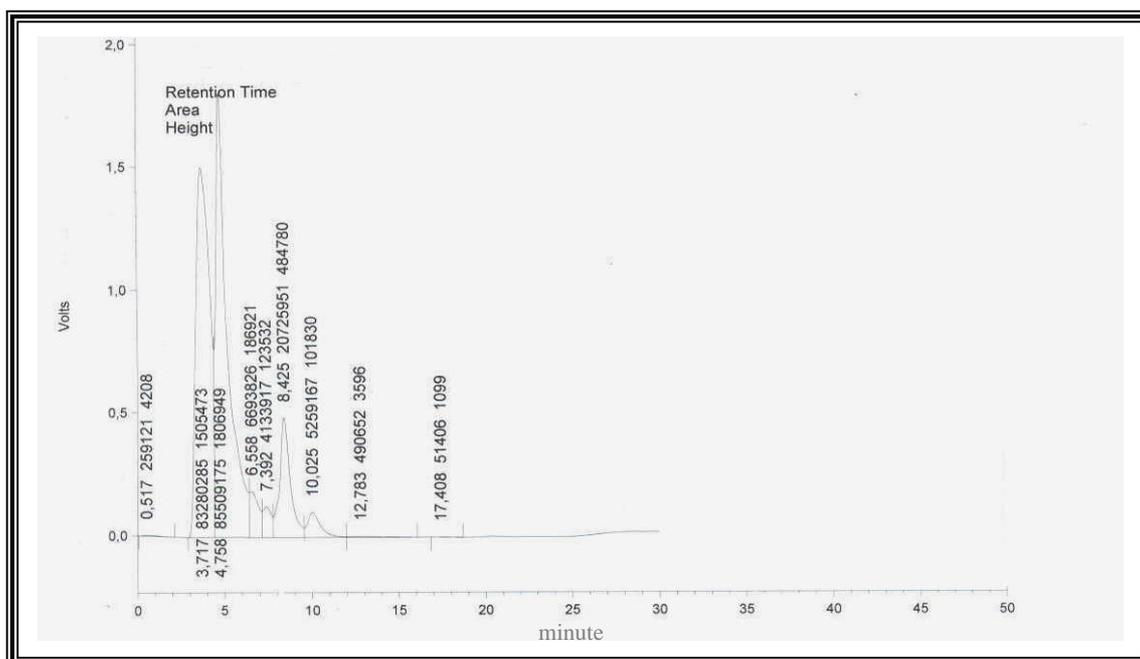


Figure 27 : Profil HPLC des Alcaloïdes de *F. bastardii*

Sur les tableaux (n° 8) et (n° 9) sont reportés les alcaloïdes identifiés chez *F. capreolata* et *F. bastardii* respectivement, avec leurs temps de rétentions et leurs intensités relatives (intensité du pic).

Tableau n° 8 : alcaloïdes de *F. capreolata* identifiés par RP-HPLC à gradient.

Temps de rétentions	Alcaloïdes correspondants	Intensité
3,76	<i>Fumaritine</i>	+++
4,99	<i>Corytuberine</i>	+++
6,79	<i>Fumaricine</i>	++
7,55	<i>Adlumediceine</i>	++
8,80	<i>Protopine</i>	++
11,28	<i>Cryptopine</i>	±
15,42	<i>Fumariline</i>	+
17,06	<i>Stylopine</i>	+
19,8	<i>N-methylstylopine</i>	±
23,24	<i>Copticine</i>	±
25,06	<i>Palmitine</i>	±

Tableau n° 9 : alcaloïdes de *F.bastardii* identifiés par RP-HPLC à gradient.

Temps de rétentions	Alcaloïdes correspondants	Intensité
3,71	<i>Fumaritine</i>	++
4,75	<i>Corytuberine</i>	+++
6,55	<i>Parfumine</i>	±
7,39	<i>Fumaricine</i>	++
8,42	<i>adlumidiceine</i>	+
10,02	<i>Fumarphycine</i>	+
12,78	<i>Protopine</i>	+
17,40	<i>Stylopine</i>	±

F.bastardii présente un taux d'alcaloïdes totaux plus élevé, presque le double, que *F.capreolata*. Cependant *F.capreolata* présente un plus grand nombre d'alcaloïdes. Ces alcaloïdes appartenant à la famille des alcaloïdes isoquinoléique se classent suivant leurs structures en différents groupes.

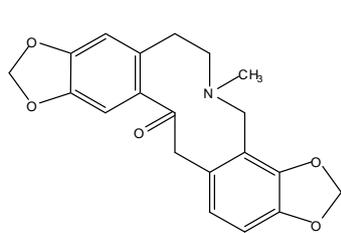
Sur le **tableau (n° 10)** nous avons reporté les différents alcaloïdes identifiés classés selon leur appartenance structurale. Sur la **figure (28)** sont reportés les structures des ces alcaloïdes.

Tableau n° 10 : Classement des alcaloïdes isoquinoléique de *F. capreolata* et *F. bastardii*.

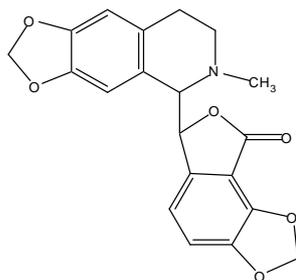
Groupe	Alcaloïde	F. capreolata	F. bastardii
Protopines	<i>Protopine</i>	+	+
	<i>Cryptopine</i>	+	-
Phtalidisoquinoléine	<i>Parfumine</i>	-	+
	<i>Palmitine</i>	+	-
Aporphine	<i>Corytuberine</i>	+	+
Benzylisoquinoléine	<i>Cryptopine</i>	+	—
	<i>Stylopine</i>	+	+
	<i>N-methylstylopine</i>	+	—
Spirobenzylisoquinoléine	<i>Fumaritine</i>	+	+
	<i>Fumariline</i>	+	+
	<i>Fumarophycine</i>	-	+
	<i>Fumarocine</i>	+	-
	<i>Adlumidiceine</i>	+	+

+ : présence, — : absence.

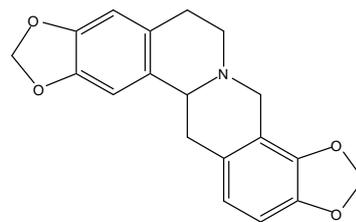
Nous remarquons que les deux espèces de *Fumaria* sont surtout riches en alcaloïdes du groupe benzylisoquinoléines et du groupe spirobenzylisoquinoléines.



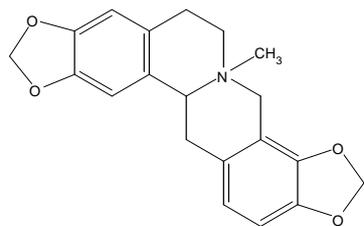
Protopine



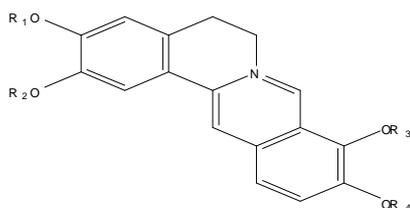
Cryptopine



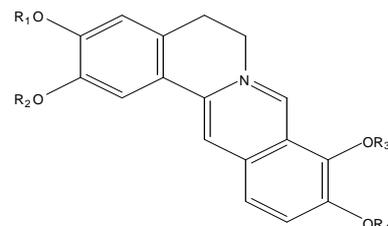
Stylopine



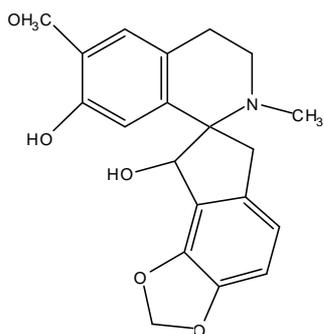
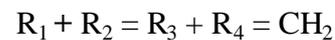
N-methylstylopine



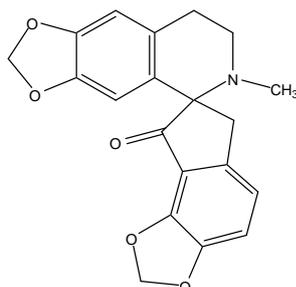
palmitine



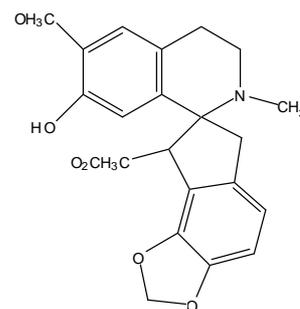
Coptisine



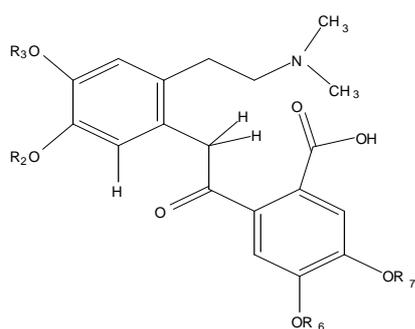
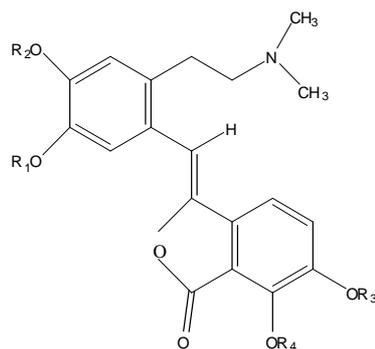
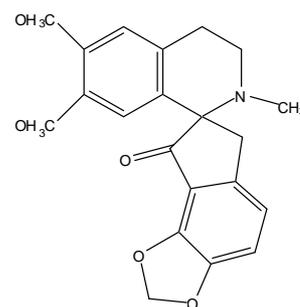
Fumaritine



Fumariline



Fumarophycine

Adlumidicine
 $R_2 + R_3 = R_6 + R_7 = CH_2$ Fumaricine
 $R_1 + R_2 = R_3 + R_4 = CH_2$ 

Parfumine

Figure 28 : Structure des alcaloïdes isoquinoléiques identifiés chez *F. capreolata* et *F. bastardii*.

II.2 Identification des composés phénoliques :

La séparation et l'identification partielle des composés phénoliques des extraits méthanoliques des deux espèces de *Fumaria* a été réalisée par analyse par HPLC en mode isocratique. Les résultats sont discutés en comparant les temps de rétention de nos échantillons à ceux de substances standards et à des références bibliographiques (Nergheen *et al*, 2006).

L'analyse par HPLC de nos échantillons nous a permis d'obtenir 9 fractions pour *F.capreolata* (figure 29) et 8 fractions pour *F.bastardii* (figure 30). Les composés ont été identifiés par comparaison à des références bibliographiques (Souseck *et al*, 1999) et en se référant à une base de données (Chromatography database, 1995).

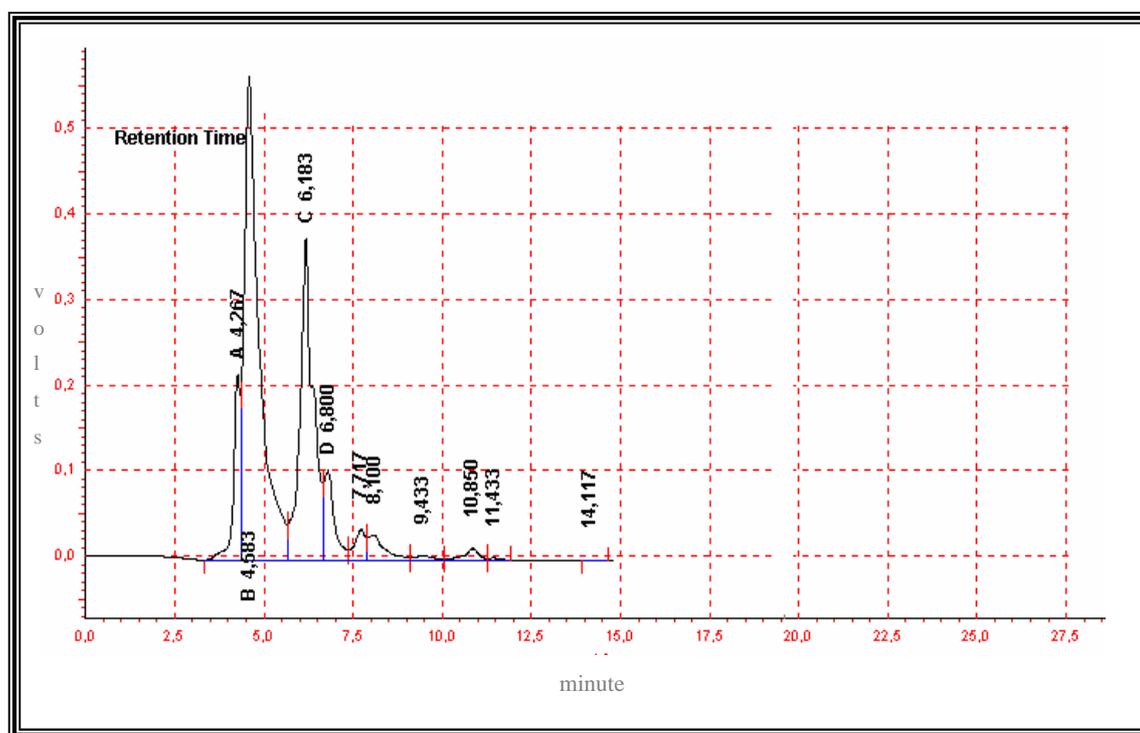


Figure 29 : Chromatogramme (HPLC) des polyphénols de *F.capreolata*.

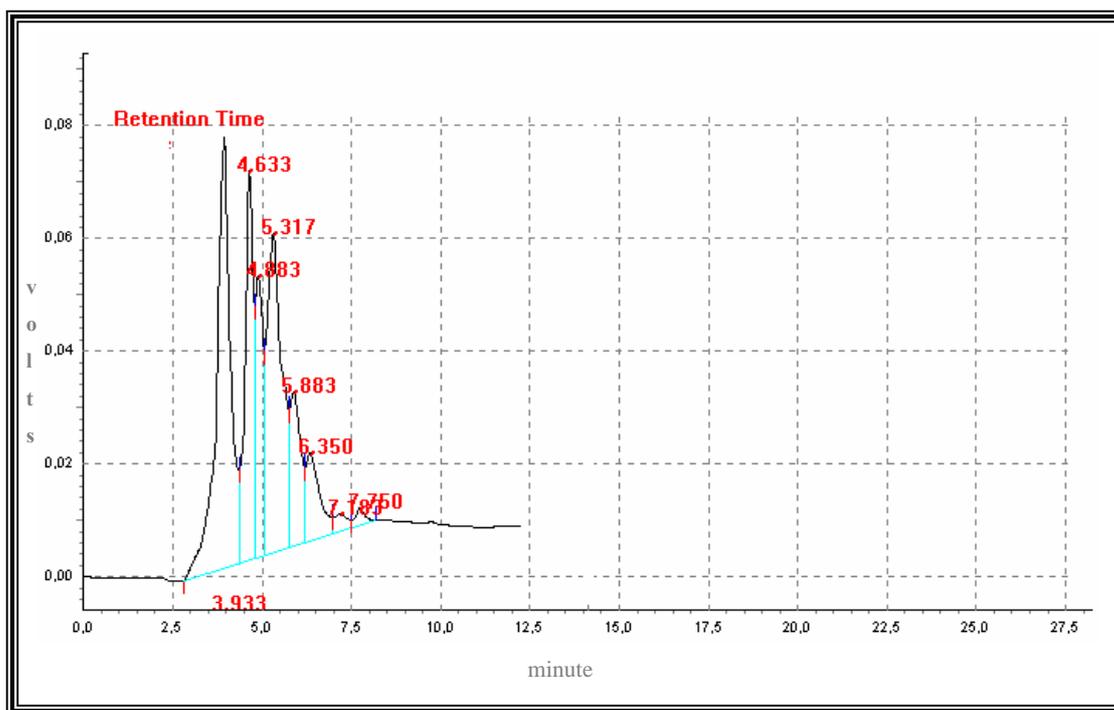


Figure 30 : Chromatogramme (HPLC) des polyphénols de *F. bastardii*

Sur le **tableau (n° 11)** et **(n° 12)** sont reportés les acides organiques identifiés respectivement chez *F. capreolata* et *F. bastardii* avec leurs temps de rétention.

Tableau n° 11 : Les composés phénoliques de *F. capreolata* identifiés par RP-HPLC isocratique.

Temps de rétention	Acide organique
4,267	Hydroxyphénol
4,583	Acide caféique
6,183	Acide fumarique
6,800	N.I
7,717	Acide 3-hydroxybenzoïque
8,100	N.I
9,433	N.I
10,850	N.I
11,433	N.I

N.I : Non Identifié

Tableau n° 12 : Les composés phénoliques de *F.bastardii* identifiés par RP-HPLC isocratique

Temps de rétention	Acide organique
3,933	Hydroxyphénol
4,633	Acide caféique
4,833	Acide methyl-ester caféique
5,317	Acide coumarique
5,813	Acide ferulique
6,350	Acide fumarique
7,185	Acide malique
7,75	4,HBA

La aussi on peut remarquer que du point de vue quantitatif c'est l'espèce *F.bastardii* qui est plus riche, alors que d'un point de vue qualitatif, c'est toujours *F.capreolata* qui présente le plus grand nombres de composés. Les 8 composés retrouvés chez *F.bastardii* ont pu être identifiés par contre par manque de données, nous n'avons pu identifier que 4 composés phénoliques sur les 9 retrouvés chez *F.capreolata*. Malgré quelques temps de rétention proches des acides phénols retrouvés chez *F.bastardii* nous ne pouvons affirmer l'identité des pics bien qu'il existe une forte probabilité qu'ils soient identiques. Pour les pics à temps de rétention beaucoup plus élevés nous n'avons pu malheureusement retrouver des références correspondantes.

III. Les Dosages :

Etant donné que dans un extrait de plante, il existe un mélange de substances absorbant à des longueurs d'ondes voisines, il n'est pas possible d'effectuer un dosage spécifique à partir d'une seule mesure. On utilise le plus généralement une méthode différentielle, qui consiste à mesurer la variation de l'absorbance à une longueur d'onde donnée, après intervention d'un réactif spécifique d'une substance ou d'un groupe de substances.

III.1 Dosage des composés phénoliques totaux :

L'existence de plusieurs protocoles d'extraction des composés phénoliques permet de donner un résultat optimal pour chaque échantillon. L'extraction est souvent réalisée par utilisation d'eau, de méthanol, d'éthanol ou d'acétone comme solvant extracteur.

Dans notre étude, une extraction méthanolique a servi pour l'optimisation du taux des polyphénols contenus dans nos échantillons.

La teneur en composés phénolique de nos échantillons (*F.capreolata* et *F.bastardii*) est déterminée à partir d'une courbe standard utilisant l'acide gallique (AG) comme étalon de référence (figure 31). Les taux (tableau n° 13) seront exprimés en équivalents « mg E.AG/ 100g PS » (PS : Poids Sec).

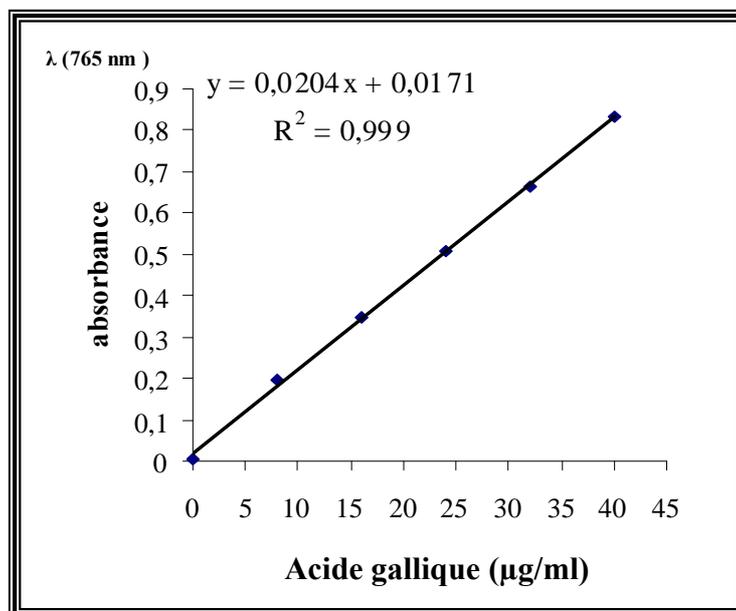


Figure 31 : Courbe standard pour le dosage des composés phénoliques en équivalents d'acide gallique

Tableau n° 13 : Taux de polyphénols observés dans les parties aériennes de *F.capreolata* et *F.bastardii*.

substrat solvant	<i>F.capreolata</i>	<i>F.bastardii</i>
Méthanol	1900 mg / 100 g	3750 mg / 100 g

On constate, d'après les résultats obtenus, que la teneur de la partie aérienne de *F. capreolata* en composés phénolique est de « **1900mg / 100g** », comparativement à celle observée chez *F. bastardii*, qui est pratiquement de l'ordre du double avec « **3750mg / 100g** ». Ces résultats sont comparables à ceux trouvés chez d'autres espèces du même genre de *Fumaria*, récoltées à la même période (mois d'Avril) mais dans une région espagnole (Malaga) (Sousek *et al*, 1999), pour *F. agraria* le taux est de « **1884mg / 100g** », *F. capreolata* « **2143mg / 100g** », *F. officinalis* « **2820mg / 100g** » et *F. parviflora* « **2275mg / 100g** ».

La teneur en polyphénols totaux dans la même espèce dépend de plusieurs facteurs, parmi eux l'environnement. Une même espèce récoltée à des périodes différentes, présente des taux en composés phénoliques variables (Shahid *et Bhangar*, 2006). Chez le genre *Fumaria*, des études sur des échantillons récoltés pendant les mois de Mars, Avril, Mai et Juin ont permis de confirmer l'influence de la saison sur la teneur en polyphénols (Sousek *et al*, 1999).

Le tableau suivant (n° 14) nous a permis de comparer les taux en polyphénols de quelques espèces de *Fumaria* récoltée à des périodes variables

Tableau n° 14 : Les taux en composés phénoliques de quelques espèces de *Fumaria* (Sousek *et al*, 1999).

Espèce	Taux (mg E.AG/100g PS)
<i>F. agraria</i>	2095 ^d , 1884 ^e , 1962 ^f
<i>F. capreolata</i>	2533 ^d , 2143 ^e , 2102 ^f
<i>F. densiflora</i>	2425 ^d , 2539 ^f
<i>F. muralis</i>	5171 ^g
<i>F. officinalis</i>	2938 ^d , 2820 ^e , 2616 ^f
<i>F. parviflora</i>	2037 ^d , 2275 ^e , 2180 ^f
<i>F. spicata</i>	1672 ^g
<i>F. vaillanii</i>	2041 ^g

^d : mois de Mars, ^e : mois d'Avril, ^f : mois de Mai, ^g : mois de Juin.

Nous pouvons constater que nos résultats sont compris dans l'intervalle des taux obtenus par **Souseck *et al* (1999)**. Les légères différences peuvent être expliquées par la différence en composition du sol, la région, climats,...etc.

III.2 Dosage des flavonoides :

Les flavonoides constituent une classe très importante des composés phénoliques. La teneur en flavonoides de nos plantes est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine (**figure 32**). Les taux sont exprimés en « **mg** » de quercétine par rapport à « **100g** » du poids sec (PS) de la plante.

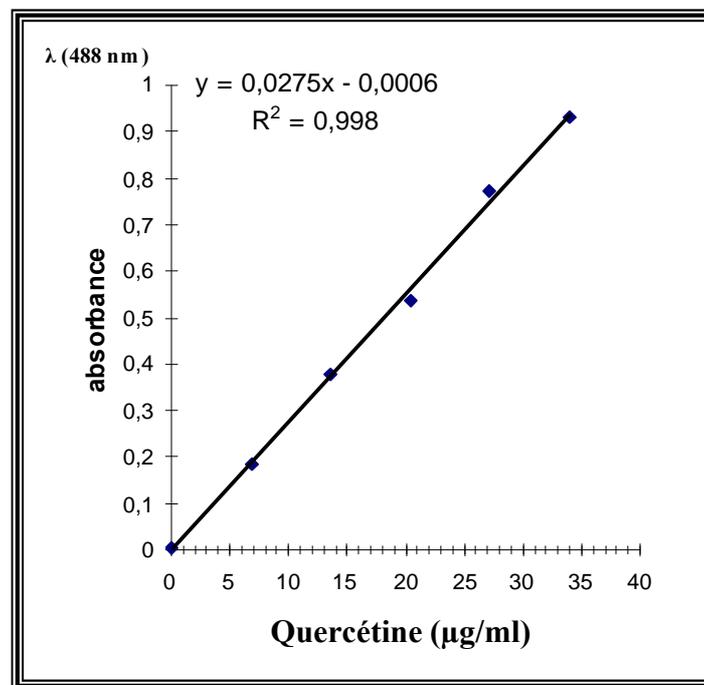


Figure 32 : Courbe standard pour le dosage des flavonoides en équivalents de quercétine

Pour *F.capreolata*, la teneur en flavonoides après une extraction méthanolique est de «**1300mg/100g** », concernant *F.bastardii* le taux est plus élevé, il est de «**1725mg/100g** » (**tableau n° 15**).

Tableau n° 15 : Taux de flavonoïdes observés dans la partie aérienne de *F.capreolata* et *F.bastardii*.

substrat solvant	<i>F.capreolata</i>	<i>F.bastardii</i>
Méthanol	1300 mg /100 g	1725 mg / 100 g

On remarque que *F.bastardii* est plus riche en flavonoïdes que *F.capreolata*. La grande majorité des polyphénols de *F.capreolata* sont des flavonoïdes (1300mg/1900mg polyphenols totaux). Pour *F.basradii*, les flavonoïdes constituent presque 50% des composés phénoliques (1725mg/3750mg). La couleur pourpre des fleurs de *F.bastardii* ainsi que les extrémités foncées des fleurs de *F.capreolata* peuvent s'expliquer par la présence des flavonoïdes et éventuellement d'autres pigments.

Le dosage des phénols totaux nous renseigne que qualitativement *F.bastardii* est plus riche, presque deux fois plus, en composés phénoliques que *F .capreolata*, et notamment en flavonoïdes.

IV. Etudes de quelques activités antioxydantes

IV.1 Effet « scavenging » du radical DPPH :

Le DPPH[•] (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyle) est largement utilisé pour estimer la capacité des substances d'agir en tant que piègeurs des radicaux libres ou donateurs d'hydrogène, et d'évaluer ainsi leur activité antioxydante (Milardović *et al*, 2006). La capacité à piéger ces radicaux libres est proportionnelle à la concentration de la substance antioxydante (Luis *et al*, 2006).

La figure (33) illustre le pourcentage « scavenging » du radical DPPH des extraits (méthanoliques et alcaloïdes totaux) de *F.capreolata* et *F.bastardii* et des antioxydants de références (BHA, Quercétine, Caféine), à des concentrations allant de 0 µg à 50µg dans un volume total de 1,5ml, la concentration à 100µg ayant montré une activité trop élevée

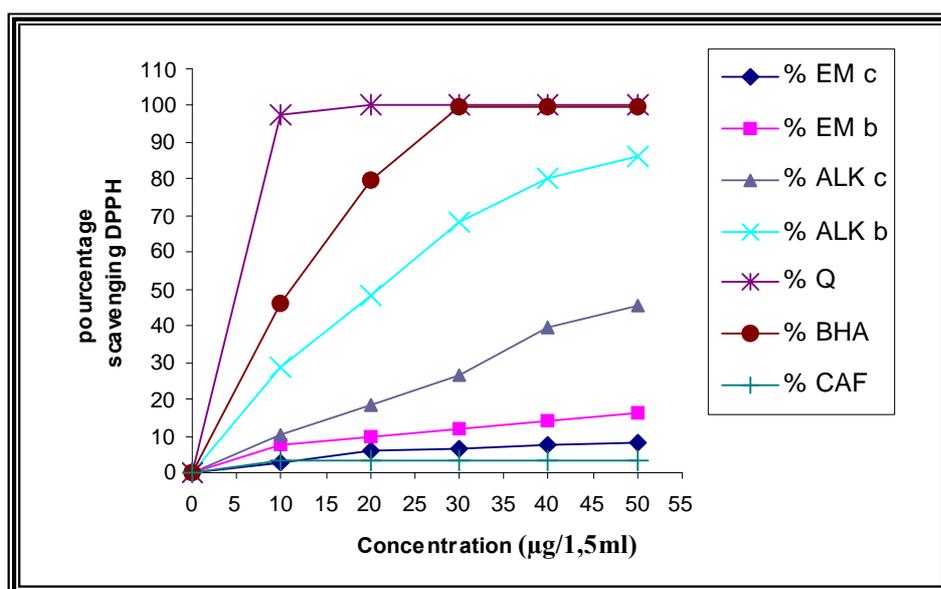


Figure 33 : Activité scavenging du DPPH des extraits (EM : extraits méthanoliques ; Alk : alcaloïdes) de *F.capreolata* (c) et *F.bastardii* (b), et de trois standards (Q : la quercétine ; CAF: la caféine ; la BHA).

Entre les deux espèces on remarque que *F.bastardii* exerce la plus grande activité antiradicalaire. Cela peut être expliqué par la richesse quantitative en substances actives (alcaloïdes et polyphénols) de *F.bastardii* par rapport à *F.capreolata*.

Il a été rapporté par **Dawidowicz** et ses collaborateurs (2006), que l'activité « scavenging » du radical DPPH par les extraits de plantes médicinales peut être attribuée à la présence d'un groupement hydroxyle, à la structure moléculaire du composé, à la disponibilité de l'hydrogène phénolique et à la possibilité de la stabilisation du radical formé résultant d'un donneur d'hydrogène.

Les polyphénols, la vitamine C, la vitamine E, la BHA, la quercétine,... sont connus comme des substances antioxydantes dotées d'un potentiel antiradicalaire très important (**He et Venant, 2004**).

Les alcaloïdes de nos plantes ont montré une grande capacité à piéger le radical DPPH (préparé à une concentration de **100µM**), même à une concentration de **10µg/1,5ml** (la plus faible concentration étudiée), qui est supérieure à celle obtenue par les extraits méthanoliques. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la quercétine suivi de la BHA.

Il est important de noter qu'un extrait méthanolique des plantes ne contient pas que des polyphénols. On trouve en plus des composés phénoliques, des lipides, de la chlorophylle,...qui peuvent peut être influencer négativement sur l'activité des substances antioxydantes.

Une étude menée par **Shirwaikar** et ses collaborateurs (2006) sur un alcaloïde de type isoquinoléine « **la berberine** », a montré que ce dernier exerce une activité antiradicalaire très remarquable vis-à-vis du radical DPPH. Un maximum d'effet « scavenger » est observé à une concentration de berberine de « **256µg/ml** », une concentration de « **2µg/ml** » s'avère la limite la plus inférieure exerçant un effet antiradicalaire. D'autre part La berberine présente une **IC₅₀** (concentration inhibant 50% du radical libre) de « **42,7µg/ml** » alors que celle de l'acide ascorbique (utilisé comme substance de référence) est de « **62,4µg/ml** ». On peut donc conclure que la berberine est plus efficace en tant que piégeur des radicaux libres que la vitamine C (acide ascorbique).

L'analyse de la **figure (33)** indique que les alcaloïdes de *F. bastardii* et *F. capreolata* présentent des pourcentages plus élevés (**86,02% et 45,59%**) que les extraits méthanoliques (**16,22% et 7,97%**). Toutefois ils sont inférieurs à ceux des standards de référence BHA et quercétine (**100%** d'effet inhibiteur pour les deux). Le plus faible pourcentage a été obtenu avec la caféine (**5%**).

Nos résultats sont en accord avec une étude menée par **Iwasa** et ses collaborateurs (2006), qui a démontré que la capacité à réduire le radical DPPH par trois groupes d'alcaloïdes isoquinoléiques (une capacité de **98%** dans le cas de la N-methyltetrahydropapaveroline qui est un alcaloïdes 1-benzylisoquinoléine) est supérieure à celle de l' α -tocopherol (vitamine E) (**70%**) à une concentration de **250 μ g/ml**. Les alcaloïdes benzylisoquinoléines sont le groupe qui exerce l'activité antiradicalaire la plus importante par rapport aux protoberberines et aux isoquinoléines simples. Nos plantes étant riches en un mélange d'alcaloïdes isoquinoléiques (principalement des benzylisoquinoléines et spirobenzylisoquinoléines), la synergie entre les différents types d'alcaloïdes peut expliquer leur pouvoir antiradicalaire important.

Il est important de noter que plusieurs facteurs dans la molécule antioxydante influencent l'activité antiradicalaire. Au niveau des alcaloïdes une N-méthylation, une méthylation des groupements « **OH** » en positions C₆ et C₇ ou une oxydation réduit ou détruit l'activité antiradicalaire de la molécule (**Racková et al, 2004**).

Une autre étude menée par **Sanchez** et ses collaborateurs (1998), sur 7 acides phénoliques, a démontré que l'acide gallique présente une capacité à réduire le radical DPPH avec une **IC₅₀** de **476,19 μ g/ml**. L'**IC₅₀** de la berbérine étant de « **42,7 μ g/ml** » ces résultats rejoignent les nôtres à savoir que les extraits alcaloïdiques présentent un meilleur effet « scavenging » du radical DPPH que les extraits méthanoliques.

La structure, le nombre des groupements d'hydroxyles attachés aux noyaux phénoliques ainsi que leur arrangement spatial et le nombre de noyaux phénoliques jouent un rôle crucial dans la capacité scavenging du radical DPPH. La présence d'un groupement « **C=CH-COOH** » semble également participer positivement à l'activité antioxydante (**Nagendram et al, 2005**).

D'autres chercheurs (**Williams et al, 1994**) ont remarqué que la BHA peut réduire jusqu'à deux ou plus de deux molécules de DPPH alors qu'elle présente qu'un seul groupement « **OH** ». Trois hypothèses ont été émises pour expliquer l'efficacité antiradicalaire des composés monophénoliques (**figure 34**).

1^{ère} hypothèse : Réduction du radical libre par un hydrogène provenant d'un antioxydant après délocalisation électronique (1).

2^{ème} hypothèse : Dimérisation entre deux radicaux phenoxy (2).

3^{ème} hypothèse : Le radical DPPH[•] Peut former un complexe avec un radical phenoxy (3).

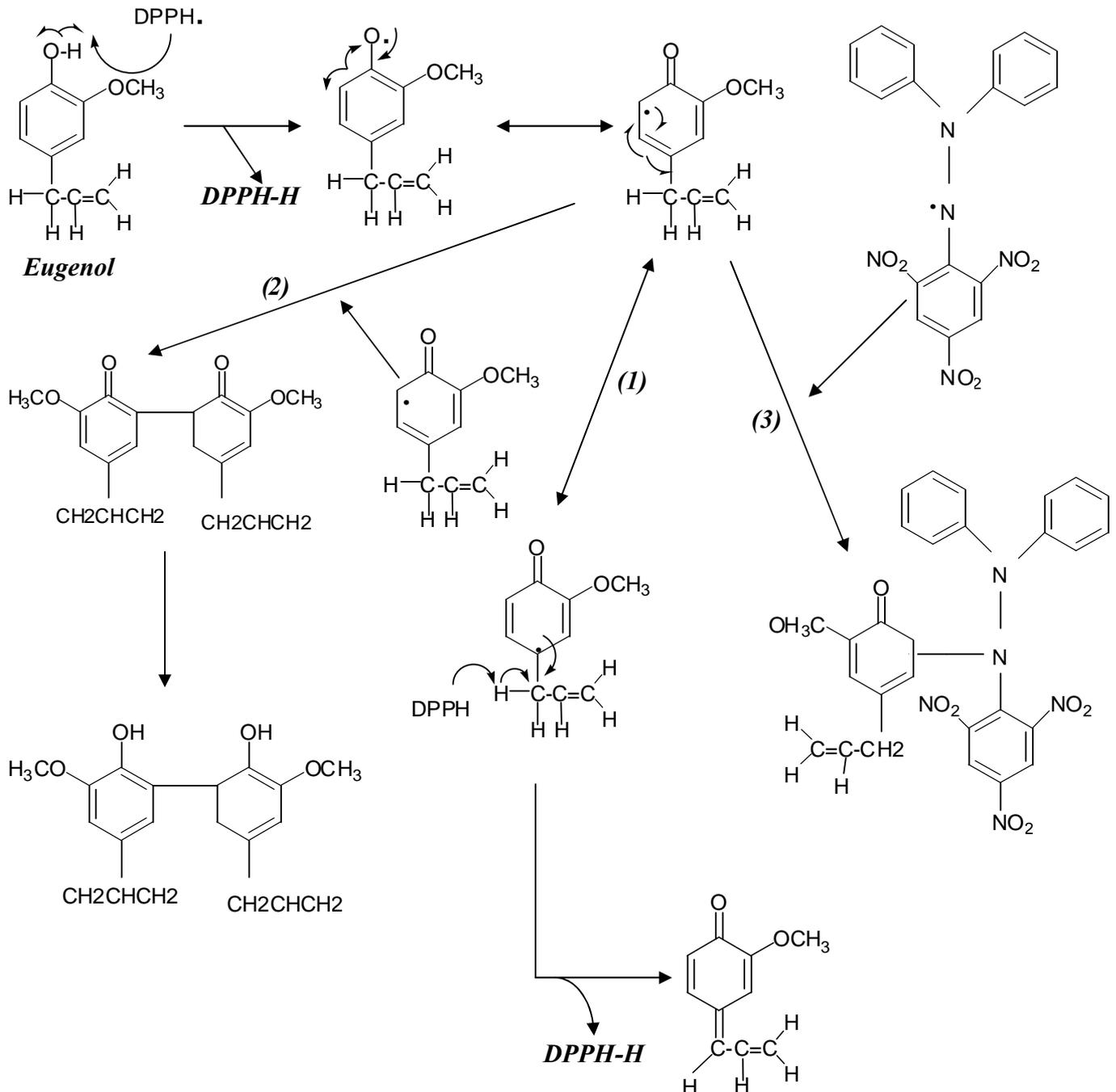


Figure 34 : Réaction du DPPH avec l'Eugenol (Williams *et al*, 1994).

IV.2 Le pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur est la capacité d'une substance à transférer un électron ou à donner un atome d'hydrogène. Dans cet essai nous mesurons ce potentiel réducteur à travers la réduction du complexe Fe^{3+} / ferricyanure de potassium en forme ferreuse (Fe^{2+}) qui se traduit par une couleur bleue. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son potentiel antioxydant (Kranl *et al*, 2005). La **figure (35)** montre que le pouvoir réducteur de nos extraits méthanoliques est plus important que celui exercé par les alcaloïdes.

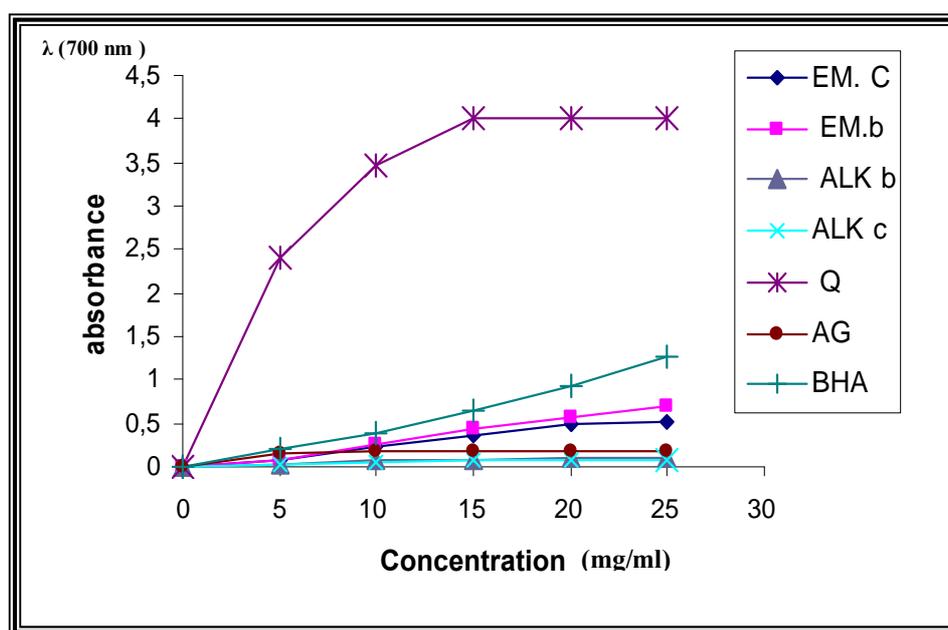


Figure 35 : Pouvoir réducteur des extraits (EM : extrait méthanolique ; Alk : alcaloïdes) de *F. capreolata* (c) et *F. bastardii* (b), et de trois standards (Q : la quercétine ; AG : l'acide gallique ; la BHA).

Les résultats de la **figure (35)** indiquent que le pouvoir réducteur augmente avec l'augmentation de la concentration en extraits de *F. capreolata* et *F. bastardii* (alcaloïdes et extraits méthanolique) et en substances standards (quercétine, acide gallique, BHA).

L'absorbance reflétant la quantité de composés antioxydants présente dans l'échantillon testé (Zhan *et al*, 2006), cette mesure permet une évaluation « semi-quantitative » des composés participant à la réaction réductrice (Ozturks *et al*, 2006).

Les potentiels réducteurs observés se classent dans l'ordre décroissant suivant : Quercétine > BHA > extrait méthanolique de *F.bastardii* (EMb) > extrait méthanolique de *F.capreolata* (EMc) > acide gallique > alcaloïdes de *F.bastardii* (ALKb) > alcaloïdes de *F.capreolata* (ALKc). A une concentration de **25mg/ml**, les différents extraits et les substances de références présentent les valeurs maximums suivantes : Quercétine (**3,99**), BHA (**1,27**), EMb (**0,695**), EMc (**0,506**), acide gallique (**0,19**), ALKb (**0,1**), ALKc (**0,084**).

Comme on le remarque la richesse (en quantité) de l'espèce *F.bastardii* lui permet une meilleure activité dans les deux types d'extraits par rapport à *F.capreolata*.

Le pouvoir réducteur des extraits méthanolique est nettement plus important que celui des alcaloïdes totaux, ceci étant dû au potentiel réducteur élevé des polyphénols présents dans ces extraits (**Blazovics et al, 2003., Berker et al, 2007**).

Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs dont les travaux de **Odabasglu et al (2004)** qui ont observé un coefficient de corrélation linéaire, entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir réducteur de plusieurs plantes médicinales, compris entre **0,85** et **0,96**, autrement dit **85%** à **96%** de la capacité réductrice de ces plantes est due au composés phénoliques.

IV.3 Mesure de l'inhibition de l'acide linoléique :

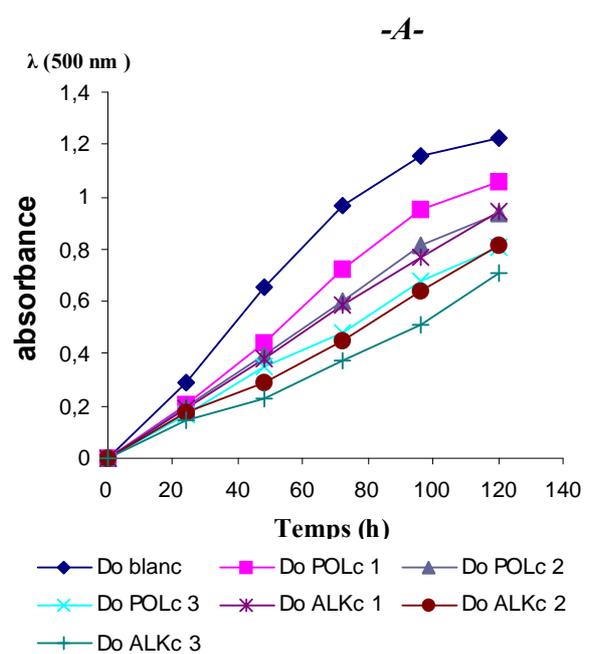
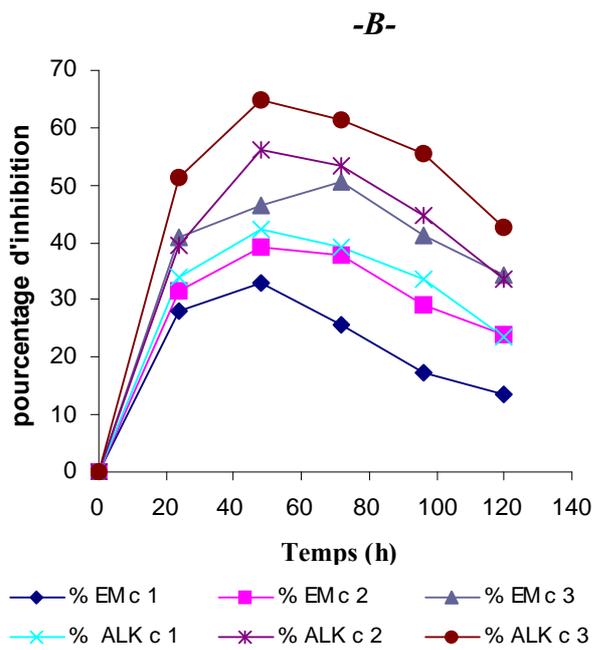
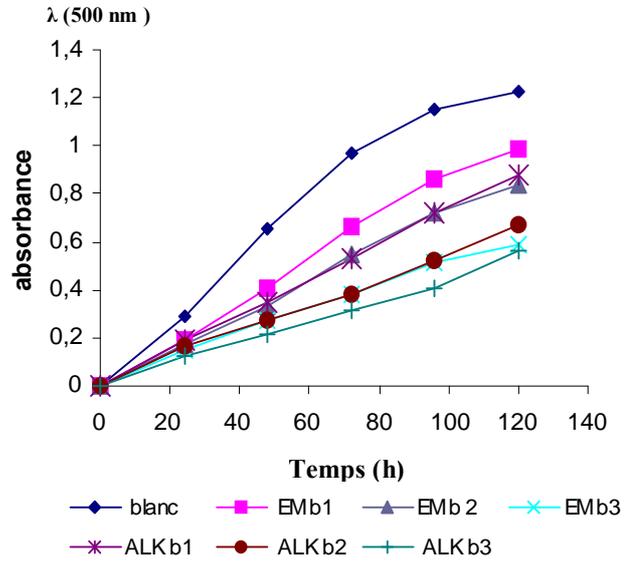
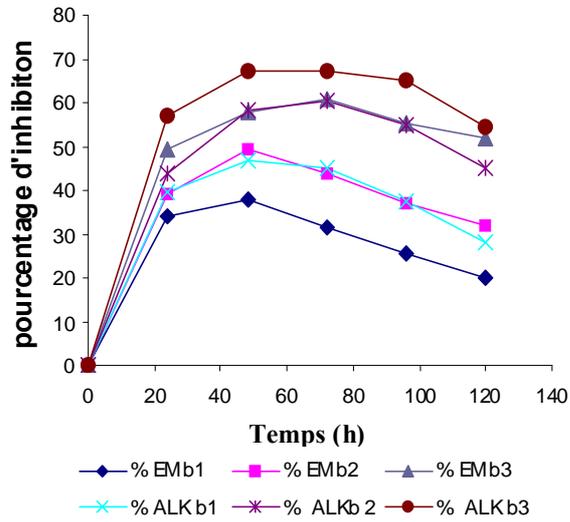
La mesure du taux d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique est l'une des méthodes les plus utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante d'un composé.

D'un point de vue chimique, un composé antioxydant n'est qu'un composé réducteur, c'est-à-dire il peut réagir avec les oxydants pour les éliminer ou les neutraliser. Ainsi le rôle principal d'un antioxydant est de protéger l'organisme par la réduction des radicaux libres à pouvoir oxydant élevé.

Dans cette étude le taux d'inhibition de l'oxydation des lipides a été évalué par une méthode colorimétrique utilisant le thiocyanate ferrique (**FTC**), qui permet d'estimer le taux des peroxydes présents dans le milieu réactionnel à travers l'absorbance du complexe formé, suivant la réaction entre le produit de l'oxydation de **FeCl₂** et le **SCN** (Thiocyanate d'ammonium). Une absorbance élevée traduit une oxydation importante et par conséquent une absorbance faible en présence d'un composé à tester signifie une activité antioxydante élevée (**Wong *et al*, 2006**).

Les résultats d'inhibition de l'acide linoléique de nos extraits, à différentes concentrations, sont présentés dans la **figure (36)**.

A une concentration de **0,5µg/ml**, les extraits de plantes ainsi que les standards, exercent un très grand pouvoir antioxydant.



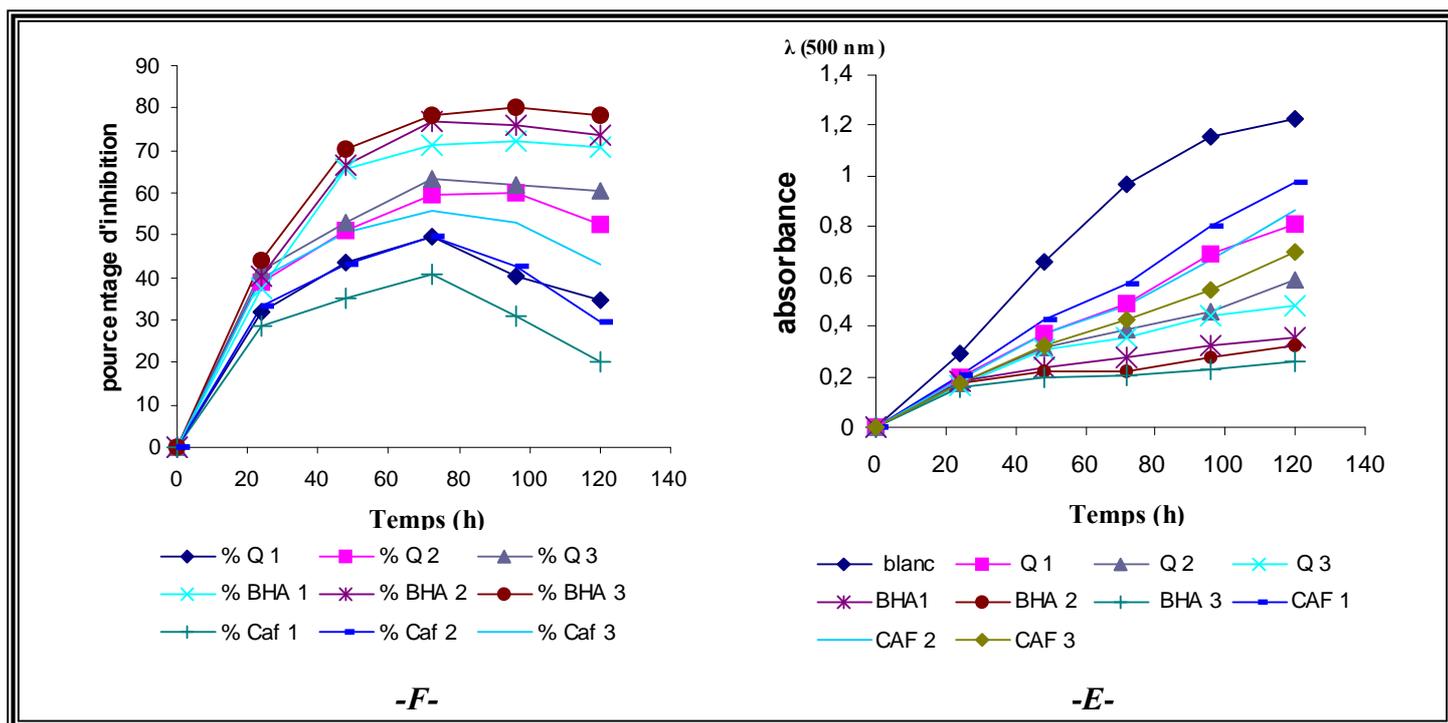


Figure 36 : L'effet d'inhibition de nos extraits (à différentes concentrations) sur l'acide linoléique.

- **A** : activité antioxydante des extraits méthaloniques (EM) et alcaloïdes (ALK) de *F.bastardii*.
- **B** : pourcentage d'inhibition des extraits méthaloniques (EM) et alcaloïdes (ALK) de *F.bastardii*.
- **C** : activité antioxydante des extraits méthaloniques (EM) et alcaloïdes (ALK) de *F.capreolata*.
- **D** : pourcentage d'inhibition des extraits méthaloniques (EM) et alcaloïdes (ALK) de *F.capreolata*.
- **E** : activité antioxydante des standards (Q : la quercétine ; CAF : la caféine ; la BHA).
- **F** : pourcentage d'inhibition des standards.
- « 1 » correspond à une concentration de **0,1mg/ml**.
- « 2 » correspond à une concentration de **0,3mg/ml**.
- « 3 » correspond à une concentration de **0,5mg/ml**.

On remarque que l'absorbance du blanc (le contrôle) augmente jusqu'à un seuil maximal observé à **96 heures**, ceci est en accord avec les résultats obtenus par d'autres équipes travaillant sur l'effet des extraits de plantes médicinales et des fruits sur la peroxydation des lipides (Shirififar *et al*, 2003., Peschel *et al*, 2005).

Des études ont montré que plus il y a formation de peroxydes dans le milieu réactionnel plus il y a oxydation de Fe^{+2} en Fe^{+3} , et par conséquent une grande quantité de complexe (Fe^{+3} , 3SCN⁻) formé. Ce complexe de couleur rouge a un maximum d'absorbance à 500 nm. Le taux de la peroxydation lipidique est calculé à **96** heures qui correspondent expérimentalement à la stabilité du contrôle et à la peroxydation maximale de l'acide gras. La réduction de l'absorbance après **120** heures peut être due à l'accumulation de malonaldéhydes (**MDA**) composés instables et qui peuvent être aussi convertis en produits secondaires, tels qu'alcools et acides (**Endrini et al, 2002**).

Une activité antioxydante est observée avec tous les extraits de *F.capreolata* et *F.bastardii* ainsi qu'avec les substances standard (**figure 42**). Cette activité varie de **27%** à **80%** (**tableau n° 16**).

Comme pour les autres tests antioxydants effectués, les pourcentages d'inhibition des extraits de *F.capreolata* sont plus faibles que ceux de *F.bastardii* (**tableau n° 16**). Ces résultats sont toujours en relation avec les taux de substances actives qui sont plus importants chez l'espèce *F.bastardii*.

La plus grande activité antioxydante des extraits de nos plantes est observée dans le cas des alcaloïdes et principalement ceux de *F.bastardii*, qui présentent un effet inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique allant jusqu'à **67,8 %** à une concentration de **0,5mg/ml**.

Tableau n° 16 : Pourcentages d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par les extraits de *F.capreolata* et *F.bastardii* et par les antioxydants standards.

Extraits	% d'inhibition (<i>Fumaria capreolata</i>)	% d'inhibition (<i>Fumaria bastardii</i>)
Extraits méthanoliques		
• 0,1mg/ml.	33	39
• 0,3mg/ml.	39	49
• 0,5mg/ml.	50	59,8
Alcaloïdes totaux		
• 0,1mg/ml.	42	48,3
• 0,3mg/ml.	55	60
• 0,5mg/ml.	65	67,8

Substance antioxydante	% d'inhibition
Quercétine	
• 0,1mg/ml.	50
• 0,3mg/ml.	60
• 0,5mg/ml.	64,3
Caféine	
• 0,1mg/ml.	40
• 0,3mg/ml.	50
• 0,5mg/ml.	56,2
BHA	
• 0,1mg/ml.	71
• 0,3mg/ml.	75,3
• 0,5mg/ml.	80

L'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique augmente avec la concentration en antioxydant. Des études menées par Pérez *et al* (2003) ainsi que Elmastas et ses collaborateurs (2006) montrent qu'à des concentrations très élevées et à des temps très avancés les alcaloïdes et les extraits méthanoliques ne se comportent plus comme des antioxydants mais comme des « pro-oxydants » (transporteurs d'oxygène), il en est de même pour les antioxydants de référence (Shahid et Bhanger, 2006). Nos résultats (figure 36) indiquent que les extraits de *F.capreolata* et *F.bastardii* se comportent comme des

prooxydants après **48h** d'incubation période à partir de laquelle nous observons une diminution de l'effet inhibiteur observé à des temps plus précoces.

La corrélation entre pouvoir réducteur de nos échantillons et leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique est représentée sur la **figure (37)**.

Le coefficient de corrélation (**r**) entre deux activités est calculé par rapport à une droite de corrélation linéaire théorique. Plus les points correspondants aux différentes activités testées s'éloignent de cette droite, plus le coefficient de corrélation entre les deux activités est petit.

D'après nos résultats, on remarque que tous les extraits de *F.capreolata* et de *F.bastardii* possédant ou pas un fort pouvoir réducteur, présentent une bonne activité antioxydante. Cette constatation est confirmée par les coefficients de corrélation obtenus pour les différents extraits de nos plantes.

Les coefficients de corrélation entre l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique et le pouvoir réducteur, des alcaloïdes et de l'extrait méthanolique, de *F.bastardii* sont légèrement plus importants que les coefficients observés pour les extraits de l'espèce *capreolata*. Ceci s'explique toujours par l'importance quantitative en substances actives chez *F.bastardii*.

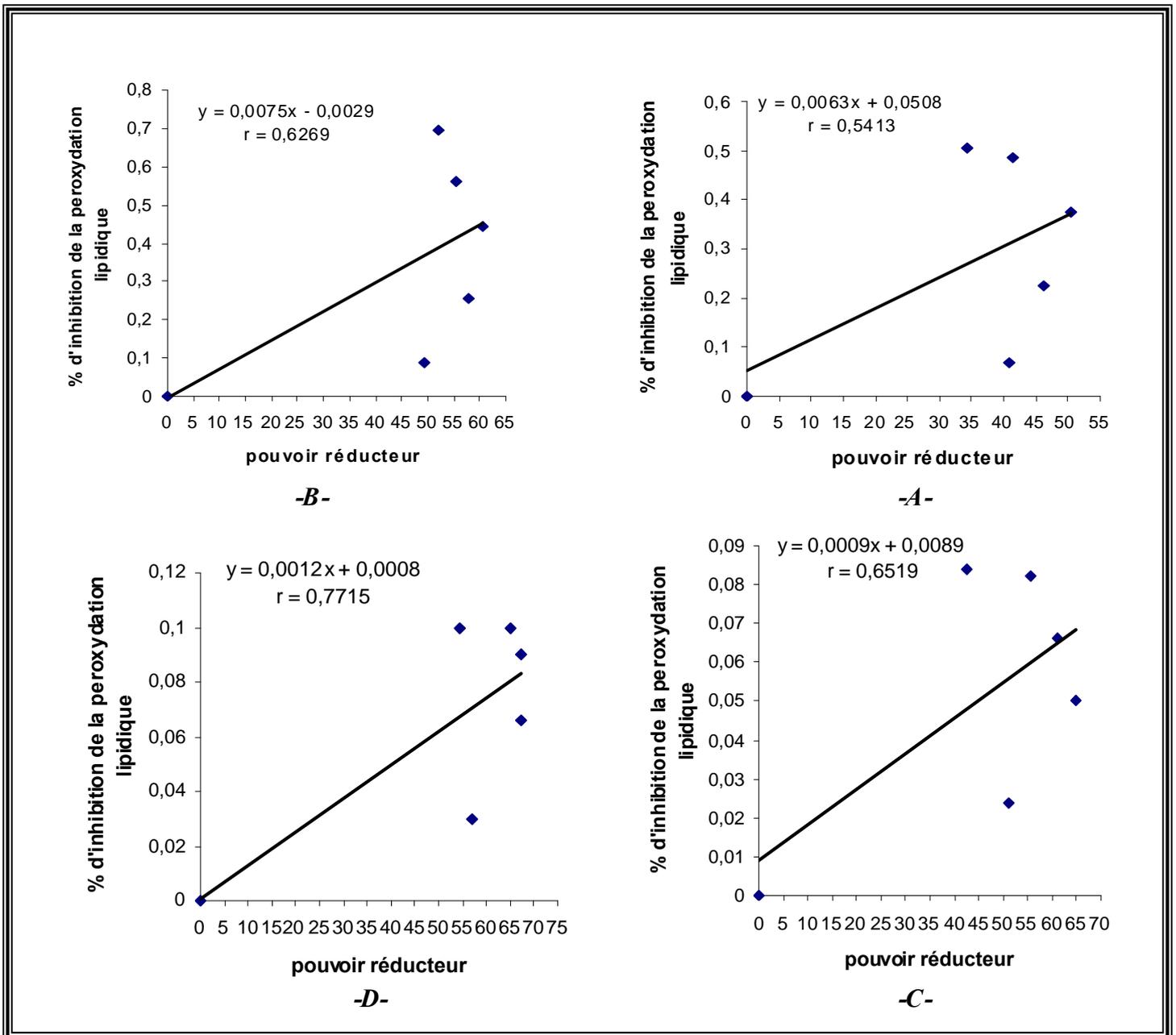


Figure 37 : Corrélation entre le pouvoir réducteur et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de *F. capreolata* et *F. bastardii*.

- **A** : Corrélation entre le pouvoir réducteur et le pourcentage de la peroxydation lipidique d'extrait méthanolique de *F. capreolata*.
- **B** : Corrélation entre le pouvoir réducteur et le pourcentage de la peroxydation lipidique d'extrait méthanolique de *F. bastardii*.
- **C** : Corrélation entre le pouvoir réducteur et le pourcentage de la peroxydation lipidique d'alkaloïdes totaux de *F. capreolata*.
- **D** : Corrélation entre le pouvoir réducteur et le pourcentage de la peroxydation lipidique d'alkaloïdes totaux de *F. bastardii*

La concentration en antioxydants influence le coefficient de corrélation. A différentes concentrations en extraits méthanoliques et alcaloïde (pour le test d'inhibition de l'acide linoléique), ces derniers présentent des coefficients de corrélation plus significatifs que les extraits méthanoliques. Le coefficient de corrélation des extraits varie de **0,135** à **0,799** (tableau n° 17).

A la concentration la plus élevée en alcaloïdes, nous notons une corrélation plus faible que celle observée a la concentration inférieure. A cette concentration les alcaloïdes agissent bien comme des pro-oxydants en accélérant la peroxydation de l'acide linoléique (tableau n° 17).

Tableau n° 17 : Les coefficients de corrélation entre le pouvoir réducteur et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de *F.capreolata* et *F.bastardii*.

Extraits	Coefficients de corrélation (<i>Fumaria capreolata</i>)	Coefficients de corrélation (<i>Fumaria bastardii</i>)
Extraits méthanoliques		
• 0,1mg/ml.	0,135	0,217
• 0,3mg/ml.	0,439	0,416
• 0,5mg/ml.	0,541	0,651
Alcaloïdes totaux		
• 0,1mg/ml.	0,556	0,621
• 0,3mg/ml.	0,635	0,799
• 0,5mg/ml.	0,626	0,771

Une étude réalisée par **Velioglu *et al* (1998)** sur l'activité antioxydante de 28 plantes par une méthode utilisant l'acide linoléique comme substrat d'oxydation et le β -carotène comme indicateur de l'oxydation, montre l'existence d'une faible corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des plantes riches en anthocyanines ($r = 0,462$).

Zhiong et Yuanzong (2004) ont constaté une faible corrélation entre le potentiel réducteur de certains composés antioxydants et leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique. Cette capacité montre par ailleurs une bonne corrélation avec le caractère lipophile de la molécule ce qui n'est pas observé avec le pouvoir réducteur.

En effet les lipides dans un milieu aqueux forme un système constitué de « micelles », les radicaux peroxylys résultant de la peroxydation des lipides se trouvent à l'intérieur du core lipophile des micelles et seules les substances qui arrivent à franchir la barrière de la surface des micelles présenteront une activité antioxydante.

L'activité antioxydante élevée de l'extrait alcaloïdique par rapport à l'extrait méthanolique peut donc être expliquée par le caractère basique des alcaloïdes et leur relative hydrophobicité.

IV.4 L'activité anti-péroxydase:

Le contrôle et la prévention du brunissement enzymatique peuvent être réalisés de trois façons. La première repose sur l'inhibition des enzymes qui causent le brunissement, la deuxième repose sur le piégeage des quinones et la troisième repose sur la limitation de la disponibilité de l'oxygène. (Amiot et al, 1992).

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à l'étude de l'efficacité des extraits (méthanolique et alcaloïdes) à inhiber l'activité de la peroxydase (extrait enzymatique de choux) enzyme responsable du brunissement des fruits et végétaux.

Dans cette étude le taux d'inhibition de l'activité anti-péroxydase est déterminé par une méthode colorimétrique, qui permet d'estimer le taux de gaiacoquinone (produit coloré) suite à la dégradation du gâïacol (substrat incolore) en présence d'une molécule d' H_2O_2 . Une absorbance faible en présence d'un composé à tester signifie une activité antioxydante élevée.

Les extraits de nos plantes et les antioxydants de référence (à différentes concentrations ; **1** : 0,50mg/ml; **2** : 0,25mg/ml ; **3** : 0,125mg/ml) utilisés présentent une activité inhibitrice à des degrés variables. Les résultats sont reportés sur la **figure (38)**.

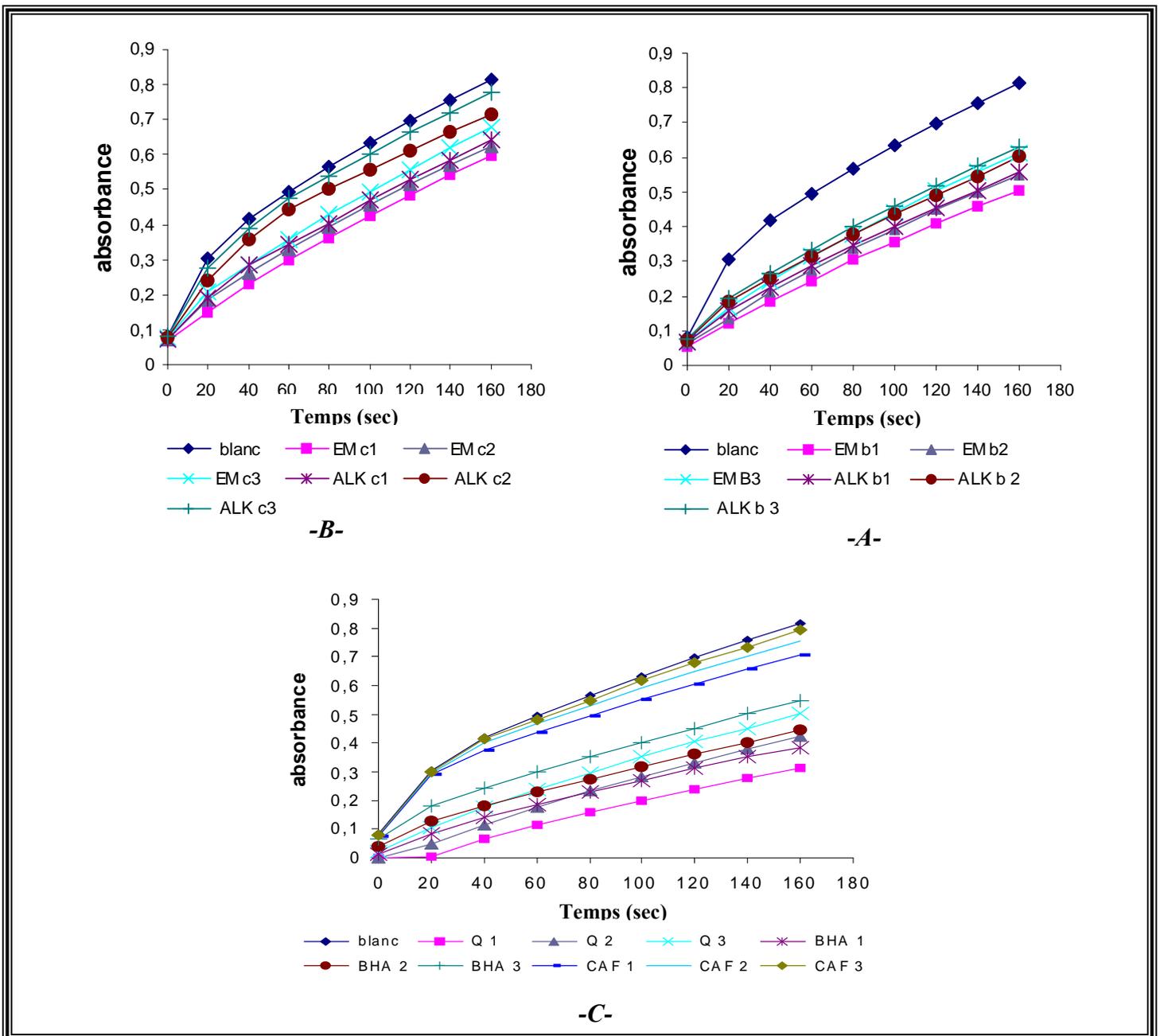


Figure 38 : Mesure de l'activité anti-peroxydase (EM : extrait méthanolique ; Alk : alcaloïdes de *F. capreolata* (c) et *F. bastardii* (b), Q : la quercétine ; CAF: la caféine ; la BHA).

Les résultats de l'activité anti-péroxydase de nos extraits, à différentes concentrations, sont présentés dans la **figure (38)**. Les pourcentages d'inhibition de l'activité enzymatique après une minute ont été calculés en présence et en absence des extraits de *F.capreolata* et *F.bastardii* ainsi que les antioxydants de synthèses. Les résultats sont résumés sur le tableau (n° 18).

Tableau n° 18 : Pourcentages d'inhibition de l'activité enzymatique de la peroxydase en présence des extraits de *F.capreolata* et *F.bastardii* et des antioxydants standards.

Extraits	% d'inhibition (<i>Fumaria capreolata</i>)	% d'inhibition (<i>Fumaria bastardii</i>)
Extraits méthanoliques		
• 0,125mg/ml.	19,8	27,87
• 0,25mg/ml.	26,14	35,63
• 0,5mg/ml.	30,17	59,45
Alcaloïdes totaux		
• 0,125mg/ml.	0,04	25,86
• 0,25mg/ml.	12,06	29,45
• 0,5mg/ml.	24,28	34,62

Substance antioxydante	% d'inhibition
Quercétine	
• 0,125mg/ml.	41,95
• 0,25mg/ml.	52,15
• 0,5mg/ml.	65,66
Caféine	
• 0,125mg/ml.	1,70
• 0,25mg/ml.	6,89
• 0,5mg/ml.	12,93
BHA	
• 0,125mg/ml.	35,05
• 0,25mg/ml.	48,27
• 0,5mg/ml.	55,17

Comme pour les autres tests antioxydants *F.bastardii* dont nous rappelons la richesse relative en substances actives d'un point de vue quantitatif, présente toujours un plus grand effet que *F.capreolata*.

La plus grande activité antioxydante des extraits de nos plantes est observée dans le cas des extraits méthanoliques (principalement ceux de *F.bastardii*) avec un pourcentage d'inhibition allant jusqu'à **59,45%** à une concentration de **0,5 mg/ml**. Cette valeur est importante puisque nous notons une valeur de **65,66%** d'inhibition avec la Quercétine qui est l'antioxydant de référence le plus employé. Le pouvoir inhibiteur de ces extraits se révèle plus important que celui observé avec un autre antioxydant de référence utilisé à la même concentration à savoir la BHA (**55,17%**). En ce qui concerne les alcaloïdes les pourcentages observés tout en étant appréciables (**24,28%** et **34,62%** pour *F.capreolata* et *F.bastardii* respectivement) restent inférieurs à ceux obtenus avec les extraits méthanoliques et avec les standards à l'exception toutefois de la caféine qui s'est révélée la moins efficace avec un taux de **12,93%** seulement.

L'inhibition de l'activité anti-péroxydase augmente avec la concentration en antioxydant ainsi qu'avec le temps. Des études menées par **Ponce et al (2004)** ainsi que **Hemeda et ses collaborateurs (1990)** sur un extrait brut de la peroxydase de chou et d'autres végétaux, montrent aussi qu'à des concentrations variables en substances antioxydantes on note une activité anti-péroxydase (extrait de chou) importante. Par exemple à une concentration minimale inhibitrice (MIC), cette activité est de **33%** pour les huiles essentielles de « *S.aromaticum* », elle est de **35%** dans le cas de l'acide ascorbique (vitamine C).

L'inhibition du brunissement peut être due à une inhibition directe de l'enzyme (cas de la Quercétine) ou par réduction et piégeage des quinones (cas de la vitamine C) résultants de l'oxydation des polyphénols (**Hemeda et al, 1990**).

Des études ont montré que des acides organiques à noyau aromatique (acide benzoïque et cinnamique) sont de bons inhibiteurs compétitifs de la peroxydase (**Castaner et al, 1996**).

Nos extraits méthanoliques contiennent des composés phénoliques qui sont structuralement analogues au substrat de la peroxydase (le gâïacol). Cette analogie leur confère une activité inhibitrice de type compétitif vis-à-vis de l'enzyme. En plus de la capacité inhibitrice, les composés phénoliques sont connus comme des agents réducteurs (résultats du test du pouvoir réducteur) et des piègeurs de radicaux libres (résultats de l'effet scavenger du DPPH). Les alcaloïdes (à haut pouvoir antiradicalaire) quand à eux se comportent seulement comme des piègeurs des quinones (produits de la réaction de la peroxydase). L'effet de synergie entre les différentes activités (inhibitrice et piégeage) des composés phénoliques de nos plantes explique leur effet anti-péroxydase plus important que celui des alcaloïdes.

Conclusion

Conclusion & perspectives

Les résultats des analyses effectuées sur la partie aérienne des plantes *Fumaria capreolata* et *Fumaria bastardii* indiquent qu'elles contiennent différents principes actifs. En effet, ces plantes sont riches en polyphénols, présentent divers types de flavonoides et acides phénoliques et sont surtout riches en alcaloïdes isoquinoléiques.

F.bastardii semble être plus riche quantitativement en polyphénols totaux (**3750mg/100g PS**) et en alcaloïdes que *F.capreolata* (taux de polyphénols de **1900mg/100g PS**) qui présente à son tour un nombre plus important que se soit en types d'alcaloïdes ou en composés phénoliques.

En ce qui concerne les méthodes d'extraction des alcaloïdes, la méthode utilisant le réactif de Mayer (celle utilisée dans notre étude) est assez simple, et a permis un bon rendement (**2,66%** pour *F.bastardii* et **1,33%** pour *F.capreolata*). Ces résultats sont proches de ceux retrouvés par d'autres auteurs (**Souseck et al, 1999**).

L'analyse par **HPLC** a montré que *F.bastardii* renferme **9** fractions d'alcaloïdes alors que *F.capreolata* en présente **11**. Pour les polyphénols nous notons **8** fractions chez *F.bastardii* et **9** fractions chez l'autre espèce. Le groupe des alcaloïdes identifiés est celui de la classe des isoquinoléines. Les deux espèces de *Fumaria* sont surtout riches en alcaloïdes du groupe benzyloisoquinoléines et du groupe spirobenzyloisoquinoléines.

On peut conclure que l'**HPLC** est une méthode simple et spécifique et qui peut être utilisée pour identifier et quantifier les alcaloïdes d'un matériel végétal et ceci à partir de quelques grammes de drogue végétale.

Les plantes du genre *Fumaria* ont été choisies pour l'étude de l'activité antioxydante sur le principe de leurs utilisations en médecine traditionnelle.

Les tests, pouvoir réducteur, effet « scavenger » du radical DPPH, inhibition de l'acide linoléique et activité anti- peroxydase, ont prouvé la capacité de nos extraits à se comporter comme des substances antioxydantes.

Le pourcentage « scavenging » à une concentration de **50µg/1,5ml** des alcaloïdes (**86,02%** pour *F.bastardii* et **45,59%** pour *F.capreolata*) semble être plus important que celui des extraits méthanoliques à la même concentration (**16,22%** et **7,97%** par *F.basatardii* et *F.capreolata* respectivement). De même pour le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique, c'est les alcaloïdes qui exercent le pouvoir inhibiteur le plus élevé en comparaison aux extraits méthanoliques. En ce qui concerne le pouvoir réducteur, les extraits méthanoliques montrent un effet réducteur plus élevé par rapport aux alcaloïdes isoquinoléiques.

L'étude de l'effet des extraits de *F.capreolata* et *F.bastardii* sur la peroxydase a montré une activité inhibitrice appréciable, plus importante dans le cas des extraits méthanoliques que des alcaloïdes. Ce test confirme les capacités antioxydantes de nos extraits. La peroxydase intervient surtout dans les phénomènes de brunissement enzymatique des végétaux qui peuvent avoir des conséquences néfastes sur la qualité organoleptique de nombreux fruits et légumes. Pour palier à cet inconvénient on fait généralement appel à des antioxydants de synthèse. La capacité d'inhibition de cette enzyme par certains extraits végétaux donne une alternative à l'utilisation de ces composés synthétiques. Un approfondissement des connaissances dans ce domaine a pour but d'aider les technologues dans la recherche d'inhibiteurs naturels et non toxiques du brunissement, applicables sur des fruits et légumes frais et/ou transformés.

Cette première approche de l'analyse de la composition en substances actives de nos deux plantes étant effectuée, il serait intéressant d'approfondir cet aspect notamment celui concernant les alcaloïdes (analyse par **GC** et **RMN**) et d'aborder l'aspect activités biologiques de nos extraits, notamment l'activité antimicrobienne ; l'effet sur la contraction des muscles lisses (sur le jéjunum), pour expliquer l'utilisation empirique dans la régulation du transit intestinal (**Rahman et al, 2005**) ainsi que l'effet « scavenger » d'autres radicaux libres voir O_2^{\cdot} , H_2O_2 ,...

Il serait intéressant d'approfondir l'aspect activité inhibitrice de la peroxydase. Les résultats préliminaires obtenus montrent que nos extraits aussi bien phénoliques qu'alcaloïdiques exercent une activité inhibitrice. Des tests d'activités et de suivi de la cinétique de cette enzyme en présence de substances actives de nos plantes permettraient de déterminer plus précisément le type d'inhibition exercée (probablement de type compétitif vu la similitude structurale des composés actifs de la plante avec le substrat) ainsi que le calcul des principaux paramètres cinétiques afin de mieux orienter l'utilisation de ces extraits en tant qu'antioxydants.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ahmad U.V & Iqbal S (1992)** - Cohristine, a new isoquinoline alkaloid from *Cocculus hirsutus*. *Fitoterapia*. (63), p: 10-308.
- **Al-Khalil S., Al-Eisawi D., Sharaf M. Schiff P.L (1993)** - In: Schiff P.L. 1997. Bisbenzylisoquinoline alkaloids - Review. *Journal of Natural Products*. (60), p: 934-953.
- **Al-Mamary, M; Al – Meeri, A and Al-habori, M. (2002)**. Antioxydant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Resarch*. (22),p: 1041-1047.
- **Amaral A.C.F. & Barnes R.A (1998)** - A tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. *Phytochemistry*. (47), p: 1445-1447.
- **Amarowicz R, Pegg R.B, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weile J.A (2004)** – Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* (84), ph: 551–562.
- **Amiot M.J, Tachini M, Aubert S, Nicolas J (1992)** - Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci*, (57), p: 958-962.
- **Amiot M.J, Fleuriet A, Cheynier V, Nicolas J (1997)** - Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Eds, Clarendon Press, Oxford. p: 51-85.
- **Andrews J, Malone M, Thompson L.C, Burton K.S (2000)** – Peroxidase isozyme patterns in the skin maturing tomato fruit. *Plant. Cell and Environement*. (23), p: 415-422.
- **Barbosa-Filho J.M, Ca-Cunha E.V.L, Gray A.I (2000)** - Alkaloids of the Menispermaceae. In: *The Alkaloids*. (54), p: 1-190.
- **Barouki R., Morel Y (2004)** - Oxidative stress and gene expression. *J Soc Biol*. (195), p: 82-377.
- **Bergman M, Perelman A, Dbinsky Z, Grossman S (2003)** – Scavenging of reactive oxygen species by a novel glucurinated flavonoid antioxidant isolate and purified from spinach. *Phytochemistry*. (62), p: 753-762.

- **Berker I.K, lu G.K, Tor I, Apak R (2007)** - Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, doi:10.1016/j.talanta.2007.01.019.
- **Bhargava R, Bogdal D, Chang T, Hukler D, Koeing J.L, Macko T, Penczek J, Pielichowski J, Prociak A, Wang Q.S (2003)** – Liquid Chromatography. *Ed Spring. P: 1,61.*
- **Blanco O.M, Castedo, villaverde I (1993)** - Alkaloids from *platycapnos spicata*. *Phytochemistry. (32), p: 1055-1057.*
- **Blázovics A, Lugasi A, Szentmihályi K, Kéry A (2003)** - Reducing power of the natural polyphenols of *Sempervivum tectorum* in vitro and in vivo. *Acta Biologica Szegediensis. 47(1-4), p: 99-102.*
- **Bortolomeazi R, Sibastianutto N, Tniolo R, Pizzariello A (2007)** – Comparative evolution of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry. (100), p: 1481-1489.*
- **Boveris A & Chance B (1973)** - The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem Journal. (134), p: 707–716.*
- **Bruneton J (1999)** - Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} Edition *Technique et Documentation Lavoisier : 784-873.*
- **CHAIB KOURI F (2004)** - Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae). *Thèse de doctorat présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, Suisse. p: 5-9.*
- **Candrasedkar K, Madhusudhana K, Ramakrishna S, Diwan P.V (2006)** – Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: Asensitive screening method for polyhebal formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. (40), p: 460-464.*
- **Castaner M, Gil M.I, Artes F, Tomas-barberan F.A (1996)** - Inhibition of browning of harvested head Lettuce. *J. Food Sci. (61), p: 314-316.*

- **Chang S.W, Chang H.Y, Lu F.J, Chiang C.H (1994)** – Inhibitory Effects of Phenolics on Xanthine Oxidase. *Anticancer Research. (14)*, p: 501-506.
- **Chen L, Mehta A, Berenbaum M, Zangerl A.R, Engeseth N.J (2000)** - Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruits and vegetables homogenates. *J. Agric. Food Chem. (48)*, p: 4997-5000.
- **Christelle K.R (2006)** - Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme. (20)*, p: 165–177.
- **Chromatography (1995)**. *Alltech Databasis*, p: 532, 460.
- **Cordell A.G, Quinn-Bettie L.M, Farnsworth N.R (2001)** – The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother.R. (15)*, p: 183-205.
- **Coste H (1937)** - Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes. *Edition Librairie des sciences et des Arts, Paris*, p : 191.
- **Croteau R, Kutchan M.T, Lewis G.N (2000)** – Natural products (Secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Ed B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, American Society of Plant Physiologists. P: 1250-1318.*
- **Dawidowicz A, Wianwoska D, Baraniak B (2006)** – The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra L.* (antioxidant properties of extracts). *LWT. (39)*, p: 308-315.
- **Debelmas A. M & Delaveau P (1978)** - Guide des plantes dangereuses. *Edition Maloine, Paris*, p: 59.
- **Debuigne G (1991)** - Dictionnaire des plantes qui guérissent. *Edition Larousse. p: 74.*
- **Debray M, Jacquemin H, Razafindrambao R (1971)** – Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar. *Edition de l'office de la recherche Scientifique et Technique Outre-mer. p : 55-59.*
- **Dekhuijzen P.N (2004)** - Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J. (23)*, p: 36- 629.

- **Delattre J & Coll (1995)** - Radicaux libres et vieillissement. *Act. Pharm. Biol. Clin.* (8), p : 31-47
- **Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, BoutassounaD, Stocker P, Vidal N (2006)** – Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extractx phenolic compounds. *Food Chemistry.* (97), p: 654-660.
- **Deysson G (1970)** - Physiologie et biologie des plantes vasculaires. *Edition, sedes, paris.* (3), p : 10-21.
- **Dohou N, Yamni K , Tahrouch S, Idrissi L. M. H, Badoc B, Gmira K (2003)** - Screening phytochimique d'une endémique Ibéro_Marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* (142), p : 61-78.
- **Droge W (2002)** – Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* (82), p: 47-95.
- **Elmastas M, Gulcin I, Isildak O, Kufriveoglu I.O, Ibaoglu K, Enein A.H.Y (2006)** – Radical scavenging activity and antioxidant activity of Bay leaf extracts. *Jornal of Iranian Chemical Society.* 3(3), p: 258-266.
- **Endrini S, Rahmat A, Ismail P, Yan hin T.Y (2002)** - Anticarcinogenic properties and antioxidant activity of Henna (*Lawsonia inermis*). *Asian Network for Scientific Information*, 2 (4): 194-197.
- **Fayad-Dahouk N (1998)** - Etude de traitements alternatifs à l'utilisation du sulfite comme moyen de prévention du brunissement enzymatique. *Thèse Doct., Université de Paris VII.* p: 170.
- **Forgacs P, Provost J, Touche A, Jehanno A (2000)** – Alkaloids from *Fumaria capeolata* and *Fumaria bella*. *Jornal of Natural Products.* 1(49), p: 178.
- **Fosset B, Lefrou C, Masson A, Mingotaud C (2000)** – Chimie Physique expérimentale. *Hermann, Editeurs des Sciences et des Arts.* P : 101.
- **Franklin S & Brooks P (2004)** - A critical evaluation of high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the detection and determination of small molecules of significance in clinical and forensic science. *Electrophoresis.*(25), p: 1413-1446.

- **Frei B & Higdon J.V (2003)** – Antioxidant activity of polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *American Society from Nutritiona Sciences*. (66), p: 22-31.
- **Fridovich I (1997)** - Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*, 272 (30), p: 7-18515.
- **Fulbert J.C, Cals M.J (1992)** - Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathol. Biol.*, 49(1), p: 66-77.
- **Gaboriaud R (1996)** – Physico-Chimie des solutions (Cours et problèmes corrigés). *Ed Masson-Paris*. P : 4-7.
- **Garnier, N; Richardin, P; Cheynier, V; Regert, M. (2003)**. Of thermally assisted hydrolysis and Methylation products of polyphenols from modern and archaeological vine derivatives using gas Chromatography – Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 493: 137-157.
- **Gavilovic M, Maginot M.J, Gavrilovic C.S, Wahach J (1996)** – Manipulation d’analyse Biochimique. *Ed Doin-Paris*. P: 25,189, 423, 301.
- **German M.P, D’Angelo V, Biasini T, Sanogo R, De Pasquale R, Catania S (2006)** - Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. *Journal of Ethnopharmacology*. (105), p: 368–373.
- **Gilani, A.H. (2001)**. The Presence of different antihypertensive combinations in medicinal plants. Asia Pacific. *Journal of Pharmacology*, 2: 54-55.
- **Gilani A.H, Atta U. R (2005)** - Perspective paper. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. (100), p: 43-49.
- **Ghosh P, Reddy K.M.M, Sashidhar B.R (2005)** - Quantitative evaluation of sanguinarine as an index of argemone oil adulteration in edible mustard oil by high performance thin layer chromatography. *Food Chemistry*. (91), p : 757–764.
- **Guignard J.L (1996)** – Les composés phénoliques, Biochimie végétale. *Edition Masson*. p : 164-176.
- **Guignard J. L (2000)** - Les composés aromatiques. In *Abrégé de Biochimie Végétale*. *Edition Dunod* : 116-124.

- **Groussard C (2006)** - Stress oxydatif et exercice anaérobie : Oxidative stress and anaerobic exercise. *Science & Sports*. (21), p: 62–67.
- **Hansen J.M., Go Y.M., Jones D.P (2006)** - Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev.Pharmacol. Toxicol.* (46), p: 215–234.
- **He Q & Venant N (2004)** – antioxidant power of phytochemicals from *Psidium Guajava* leaf. *J Zhejiang*. 5(6), p: 676-683.
- **Hemeda H.M & Klein B.P (1990)** – Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of Food Science*. 55(1), p: 184-186.
- **Henshen A, Hupe K.P, Loh Speich L, Volter W (1985)** – High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry. *Ed VCH. P: 1, 15, 79, 599-616*.
- **Hesse M (2002)** – Alkaloids, nature’s cruse or blessing? *Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley*. p: 239.
- **Hitchon C.A & El-Gabalawy H.S (2004)** - Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* (6), p : 265–278.
- **Houghton P. J. & Raman A (1998)** - Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. *Chapman et Hall, Londres, 1^{ère} éd.*, 29-31.
- **Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H (1998)** -Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation*. (97), p: 8-363.
- **Hou W.C, Lin R.D, Cheng K.T, Hung Y.T, Cho C.H, Chen C.H, Hwang H.S, Lee H.M (2003)** - Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine*. (10), p: 170–175.
- **Hostettmann K, Kizu H, Tomimori T (1982)** - Molluscicidal Properties of Various Saponins. *Planta Med.* (44), p: 34-35.
- **Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T (2005)** - Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. (96), p: 145–150.

- **Iwasa K, Kamiguachi M, Ueki M, Taniquchi M (1996)** – Antimicrobial activity and structure-relationships of berberine analogs. *Eur Med Chem.* (31), p: 469-478.
- **Iwasa K, Kamiguachi M, Sugira M, Nanba H (1997)** – Antimicrobial activity of some 13-Alkyl substituted Protoberberinium salts. *Planta Med.* (63), p195-290.
- **Iwasa K, Nanba H, Lee D.U, Kang I.S (1998)** – Structure-activity relationships of Protoberberines having Antimicrobial activity. *Planta Med.* (64), p : 683-780.
- **Iwasa K, Nishiyama Y, Ichimaru M, Moriyasu M, Kim H.S, Wataya Y, Yamori T, Takacshi T, Lee D.Y (1999)** – Structure-activity relationships of quaternary protoberberine alkaloids having an antimicrobial activity. *Eur.J.Med.Chem.* (34), p: 1077-1083.
- **Iwasa K, Moriyasu M, Nader B (2000)** – Fungicidal and herbicidal activities of berberine related alkaloids. *Biosc.Biotechnol.Biochem.* 64(9), p: 1998-2000.
- **Iwasa K, Moriyasu M, Yamori T, Turuo T, Lee D.U, Wiegredede W (2001)** – In vitro cytotoxicity of the protoberberine-type alkaloids. *J.Nat.Prod.* (64), p : 896-898.
- **Iwasa K, Moriyasu M, Tachibana Y, Kim H.S, Wataya Y, Wiegredede W, Bastow F.K, Cosentino M, Kozuka M, Lee H.K (2001)** – Simple isoquinoline and benzylisoquinoline alkaloids as potential Antimicrobial, Antimalarial, Cytotoxic and Anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* (9), p : 2871-2884.
- **Jean-Pierre S (2003)** – Séparation et analyse des Biomolécules (Méthodes physicochimiques)-Cours et exercices. *Ed Ellipses, Technosup.* p : 4-8, 40-47.
- **Joël P., Karine B., Karine C., Jean O.D (2002)**- Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante : Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme.* (16), p : 233–239.
- **Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M (2006)** - Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry.* (94), p: 550–557.
- **Kenneth B.W (2000)** - β -Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* (17), p: 247-268.
- **Kessler M, Ubeau G, Jung L (2002)** - Anti-and pro-oxidant activity of rutine and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* (55), p: 1-11.

- **Kranl K, Schlesier K, Bitsch R, Hermann H, Rohe M, Bohm V (2005)** - Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – use of different assays. *Food Chemistry*. (93), p: 171–175.
- **Kursinszki L, Sarkozi A, Kery A, Szoke E (2006)** – Improved RP-HPLC method for analysis of isoquinoline alkaloids in extracts of *Chelidonium majus*. *Chromatographia Supplement*. (63), p: 131-135.
- **Leboeuf M, Cavé A, Forgac P, Tierghie R, Provos J, Touchb A, Jacquem H (1982)** – Alcaloides des Annonacées : etude chimique et pharmacologique des alcaloides de l'annona montanamacf. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*. (3), p : 169-184.
- **Leclerc H (1922)** - Précis de phytothérapie, essai de thérapeutique par les plantes françaises. *Edition Masson, paris*. p: 141.
- **Liangli Y & Zhou K (2004)** – Antioxidant properties of bran extracts from “Platte” wheat grown at different locations. *Food Chemistry*. (90), p: 311-316.
- **Liden M (1986)** - Synopsis of *Fumarioideae (Papaveraceae)* with a monograph of the tribe *Fumariaceae*. *Opera Botanica*. (88), p: 1-133.
- **Liden M, Fukuhara T, Rylander J, Oxelman B (1997)** - Phylogeny and classification of *Fumariaceae*, with Emphasis on *Dicentra* S.I. based on the plastid gene RPS. *Plant systematics and Evolution*. (206), p : 411-420.
- **Loo A.Y., Jain K, Darah I (2007)** - Antioxidant and radical scavenging activities of the pyroligneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry*. (15), p: 513-517.
- **Lopez S, Tojo E, Blanco O, Villavarde M.C, Castedo I (1991)** - Alkaloids from Spanish *Sarcocapnos* species. *Photochemistry*. (30), p: 1175-1182.
- **Lu Y et Foo L.Y (2001)** – Antioxidant activities of polyphenols from sage. *Food Chemistry*. (74), p: 197-202.
- **Luis C.J, Valdés F, Martin R, Carmona A.J, Diaz G.J (2006)** – DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Acnium napellus* sp.lusitanicum. *Fitoterapia*. (77), p: 469-471.

- **Marc F, Davin A, Deglène-Benbrahim L, Ferrand D, Baccaunaud M, Fritsch P (2004)**- Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medecine/Sciences. (20)*, p : 63-458.
- **Marek R, Humpa O, Dostal J, Slavik J, Sklenar V (1999)** – ¹⁵N NMR study of isoquinoline alkaloids. *Magn. Reson. Chem. (37)*, p : 195-202.
- **Marnett L.J (1999)** – Lipide peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res. (424)*, p : 83-95.
- **Martin S & Andriantsitohaina R (2002)** - Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium : Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie. (51)*, p : 304–315.
- **Mata A.T, Proença C, Ferreira A.R, Serralheiro M.L.M, Nogueira J.M.F, Araujo M.E.M (2006)** – Antioxidant and anticetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry. (09)*, p: 16-25.
- **Mates J.M., Perez-Gomez C., Nunes de Castro I (1999)** – Antioxidant enzymes and humen diseases. *Clim. Biochem. (32)*, p: 595-603.
- **Mchaffie H (2004)** – Six Scottish species of Fumitory including the Nationally Scarce. *Scottish Natural Heritage. p : 3-12.*
- **Milardovic S, Ivekovic D, Grabaric B.S (2006)** – A novel ampirometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry. (68)*, p: 175-180.
- **Miller N.J, Rice-Evans C (1997)** - Factor influencing the antioxydant activity determined by the ABTS⁺ radical cation assay. *Free Radical Biol. Med. (26)*, p: 195-199.
- **Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamedi M, Amanzadeh Y, Ebrahimi E.S.S, Ostad N.S (2006)** - Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry. (10)*, p: 9-14.
- **Molyneux P (2004)** - The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol. 26(2)*, p: 211-219.

- **Morales C & Romero A.T. (1991)** - A New species of the genus *Sarcocapnos* (*Fumariaceae*) from eastern Andalusia (Spain). *Plant Systematics Evolution.* (177), p: 1-10.
- **Moore J, Zhigang H, Zhou K, Lither L, Costa J, Yu J.L (2005)** - Carotenoid, Tocopherol, Phenolic Acid, and Antioxidant Properties of Maryland-Grown Soft Wheat. *J. Agric. Food Chem.* (53), p: 6649-6657.
- **Naczek M & Shahidi F (2004)** - Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A.* (1054), p: 95-111.
- **Nagendran B, Kalayana S, Samir S (2005)** – Phenolic compounds in plants and agriindustrial by products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry.* (54), p: 1991-1993.
- **Nishizawa M, Kohno M, Nishimura M, Kitagawa A, Niwano Y (2005)** – Non-reductive scavenging of DPPH by peroxyl radical: A useful method for quantitative analysis of peroxyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* 53(6), p: 714-716.
- **Odabasoglu F., Aslan A., Cakir A., Suleyman H., Karagoz Y., Halici M, Bayir Y (2004)** - Comparison of Antioxidant Activity and Phenolic Content of Three Lichen Species. *Phytotherapy research.* (18), p: 938–941.
- **Orhan I, Sener B, Choudhary M.I, Khaldi A (2004)** – Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* (91), p: 57-60.
- **Ozturk M, Aydogmus F, Ozturk b, Duru E.M, Topc G (2006)** - Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry.* (5), p: 9-16.
- **Pander B.V, Ray A.B, Dasgupta B (1978)** – Minor alkaloids of *Fumaria indica* seeds. *Phytochemistry.* (18), p: 695-696.
- **Pasch H & Trathniyg B (1999)** – HPLC of polymers. *Ed Springer.* P: 25-35.
- **Pereira A.S, Amaral A.C.F, Barnes R.A, Cardoso J.N, Neto F.R.A (1999).** Identification of Isoquinoline Alkaloids in Crude Extracts by High Temperature Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis.* (10), p : 254-258.

- **Pérez R.M, Vargas R, Martinez F.J, Garcia E.V, Hernandez B (2003)** – Antioxidant activity of alkaloids from *Baccharis arborescens*. A study on six testing methods. *Ars Pharmaceutica*. **44(1)**, p: 5-21.
- **Perrot E & Paris R (1974)** - Les Plantes Médicinales. *Edition P.U. F, Paris*. **(2)**, p : 85-91.
- **Peschel W, Rabaneda F.S, Diekmann W, Plescher A, Gartzia I, Jiménez D, Raventos R.L, Buxaderas S, Codins C (2005)** - An industrial approach in the natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* (article in press).
- **Piljac J, Martinez S, Valek L, Stipcevic T, Ganic K.K (2005)** – A Comparison of Methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian Wines. *Food Biotechnol*. **43 (3)**, p: 271-276.
- **Pinkas M, Bezanger-Beauquesne L, Torck M, Trotin F (1990)** - Plantes Médicinales des Régions Tempérées. *Edition Maloine, Paris* p : 113-121.
- **Ponce A.G, Dell Valle C.E, Roura I.S (2004)** – Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*. **(37)**, p: 199-204.
- **Preininger V (1986)** - Chemotaxonomy of *papaveraceae* and *Fumariaceae* . In Brossi A. (Ed), the Alkaloids. *Academic press. New York*. **(29)**, p: 1-98.
- **Principe P (1989)** - The economic significance of plants and their constituents as drugs. In: Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth N.R.(eds.), *Economic and Medicinal Plant Research, Volume 3*. *Academic Press, London*.
- **Quezel P et Santa S (1963)** - Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. *Edition CNRS*, p : 2-59.
- **Racková L, Májeková M, Kost'álová D, Stefek M (2004)** – Antiradical and antioxidant activities of alkaloids from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **(12)**, p: 4709-4715.
- **Rahman A.U, Shakil A, Kalid-Batti M, Iqbal-Choudhary M (1994)** – Alkaloids constituents of *Fumaria indica*. *Phytochemistry*. **2(40)**, p: 593-596.
- **Rathee S.J, Shyam A. H, Subrata C (2007)** - Antioxidant activity of *Nyctanthes arbor-tristis* leaf extract. *Food Chemistry*. **(103)**, p : 1350–1357.

- **Ribereau P (1968)** – Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod* ; p : 5-7, 10-13, 55-86.
- **Richter G (1993)** – Les composés phénolique. Métabolisme des végétaux (physiologie et biochimie). *Edition Dunod*. p : 317-339.
- **Roberts F.M & Wink M (1998)** – Introduction: Alkaloids, Biochemistry, Ecology and Medicinal application. *New York*. p: 1-7.
- **Ron, B.H; Willis, C.A; Bone, K; Morgan, M; (2000)**. Herbal products active constituents, mode of action and quality control. *Nutrition Research Reviews*. (13), p: 47-77.
- **Ruddock G.W, Raleigh J.A, Greenstock C.L (1981)** - Reactivity of chemically generated superoxide Radical anion with peroxides as determined by competition kinetics. *Biochem Biophys Commun*. (102), p: 554-560.
- **Salinas M.J & Suarez-santiago V (2002)** - Floral biology of genus *Sarcocapnos* DC. (*Fumariaceae*). *Acta Botanica Malacitana*. (27), p: 27-40.
- **Salinas M .J, Romero A.T, Blanca G, De la Herran R, Garrido- Ramos M, Ruiz-Rejon C, Morales C, Ruiz- Rejon M, Suarez V (2003)** - Contribution to the Taxonomy and Phylogeny of *Sarcocapnos* (DC). (*Fumariaceae*). *Plant Systematic Evolution*. (237), p: 153-164.
- **Sanchez C.M, Larrauri A.J, CalixtoF.S (1998)** – A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*. (76), p: 270-276.
- **Sander L. C, Sharples S. K. E, Satterfield M. B, Ihara T, Phimey K.W, James Y. H, Wise A. S (2005)** - Determination of Ephedrine Alkaloids in Rietary Supplement Standard Reference Materials. *Anaytical Chemistry*. (77), p: 3101-3112.
- **Santavy F (1970)** - In the Alkaloids. *Edition R. H. F Mansk Academic press, New York*. (12), p: 333.
- **Seger C.S, Strum S, Strasser E.M, Ellmerer E, Stuppner H (2004)** – ¹H and ¹³C NMR signal assignment of benzylisoquinoline alkaloids from *Fumaria officianilis* L (Papaveraceae). *Magn. Reson. Chem*. (42), p: 882-886.

- **Selloum L, Reichl S, Muller M, Sebihi L, Arnhold J (2001)** – Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Biochemistry and Biophysics*. **1(395)**, p: 49-56.
- **Shahid I, Bhanger M.I (2006)** – Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves growing in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis*. (19), p: 544-551.
- **Shahid I, Bhanger M.I, Farooq Anwar (2007)** – Antioxidant properties and components of bran extracts from selected wheat varieties commercially available in Pakistan. *LWT*. (40), p: 361-367.
- **Shakil A (1998)** – Isolation and structural elucidation of chemical constituents from *Fumaria indica*, *Ferula oopoda* and *Withania somnifer*. These de Doctorat. *International center for chemical research, university of Karachi*.
- **Shamma M and Moniot J.L (1982)** - Isoquinoline Alkaloids Research. *Plenum press, New York*. p: 337-353.
- **Shirwaikar A, Shirwaikar A.R, Rajendran K, Punitha I.R.S (2006)** – *In Vitro* Antioxidant Studies on the Benzyl Tetra Isoquinoline Alkaloid Berberine. *Biol.Pharm.Biull.* (29), p: 1906-1910.
- **Shrififar F, Yassa N, Shafiee A (2003)** - Antioxidant activity of *Otostegia persica* (Labiatae) and its constituents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. p: 235-239.
- **Soobrattee A.M, Neergheen S.V, Luximon-Ramma A, Aruoma I.O, Bahorun T (2005)** - Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*. (579), p: 200–213.
- **Souseck K.J & Valesova M (1995)** - Chemical components of genus *Fumaria*. *Phytochemical Analysis*. (89), p: 489-500.
- **Souseck K.J, Guedon D, Adam T, Bochorakova H, Taborska E, Valka I, Simanek A (1999)** - Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species. *Phytochemical Analysis*. (10), p: 6-11.
- **Stahl E, Dumont E, Jork H, Kraus L.J, Rozumek K.E, Schorn P.J (1975)** - Analyse Chromatographique et Microscopique des drogues- Manuel pratique pour les pharmacopées, Entreprises Moderne. *Edition Techniques et Documentation, Paris*, p: 23-31.

- **Suau R, Cabezudo B, Ricor R, Lopez-Romero J. M, Najera F (2002)** - Alkaloids from *Fumaria sepium* and *Fumaria agrarian*. *Biochemical systematic and Ecology*. (30), p: 263-265.
- **Suau R, Cabezudo B, Ricor R, Lopez-Romero J. M, Najera F (2002)** – Direct determination of alkaloids contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phytochem Anal*. (13), p: 363-367.
- **Suau, R, Cabezudo B, Rico R, Najera F, Manuel J, Cuevas A (2004)** - Phytochemical variations within populations of *Platycapnos saxicola Willk*. *Journal of Biochemical systématics end Ecology*. (32), p : 565-572.
- **Suau R, Cabezudo B, Rico R, Najera F, Manuel J, Cuevas A (2005)** - Identification and quantification of isoquinoline alkaloids in the genus *Sarcocapnos* by GC-MS. *Phytochemical analysis*. (16), p: 322-327.
- **Susplugas J, Massa V, Susplugas P, Taillade R, Mme Susplugas C, Salabert J (1975)** – Fumeterre en Languedoc Roussillon. *Anal.Inst.Bot.Cavanilles*. 32(2), p : 233-239.
- **Sundararajan R, Haja A.N, Venkatesan K, Mukherjee K, Saha B.P, Bandyopadhyay A, Mukherjee K.P (2006)** - *Cytisus scoparius* link - A natural antioxidant. *BMC Complementary and Alternative*. (86), p: 1472-6882
- **Tepe B, Akpulat A.H, Sokmen M, Daferera D, Yumrutas O, Aydin E, Polissiou M, Sokmen A (2006)** – Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*. (97), p: 719-724.
- **Thannickal V.J., Fanburg B.L (2000)** – Reactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. Physiol*. (279), p: 1005-1028.
- **Thomas S.R & Stocker R (2000)** - Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implications for atherosclerosis. *Free Rad Biol Med*. (28), p: 805-1795.
- **Trease G.E & Evans W.C (1978)** - Pharmacognosy. *Edition Baillière Tindall, London*. (11), p: 85-91.
- **Valka I and Simanek V (1988)** - Determination of alkaloids of *Fumaria parviflora* and *Fumaria capreolata* by High Performance Liquid Chromatography and Capillary isoachophoreasis. *Journal of Chromatography*. (445), p: 258-263.

- **Vamosi S.M (2006)** - A Reconsideration of the Reproductive Biology of the Atlantic Forest in the Volta Velha reserve. *Journal of Biodiversity and Conservation* (4), p: 1417-1424.
- **Velioglu Y.S, Mazza G, Gao L, Oomah B.D (1998)** - Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (46), p: 4113-4117.
- **Verpoorte R (1986)** – Methods for the structure elucidation of alkaloids. *Journal of Natural Products*. 1(49), p: 1-25.
- **Viegi L, Pieroni A, Guarrera M.P, Vangelisti R (2003)** - A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *Journal of Ethnopharmacology*. (8), p: 221–244.
- **Williams B.W, Cuvelier E.M, Berset C (1994)** – Use of free radical methods to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* (28), p: 25-30.
- **Wong C.C, Li B.C, Cheng K.W, Chen F (2006)** - A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*. (97), p : 705–711.
- **Yunusov S.Y (1966)** – Dynamics of accumulation, Formation of alkaloids and their role in plants. *Nuk. Uz. SSR*. (2), p: 104-106.
- **Zhan Y, Dong C.H, Yao J.Y (2006)** - Antioxidant Activities of Aqueous Extract from Cultivated Fruit-bodies of *Cordyceps militaris* L. Link *in Vitro*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48 (11), p: 1365-1370.
- **Zhiyong & Yuanzong (2004)** – Reducing power: the measure of antioxidant activity of reductant compounds? *Redox Report*. 9(4), p: 213-216.
- **Zhou K & Liangli Y (2004)** – Effects of extraction solvent on Wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* (37), p: 717-721.
- **Zhou K, Su L, Yu L.L (2004)** – Phytochemicals and antioxidant properties in Wheat Bran. *J. Agric. Food Chem.* (52), p: 6108-6114.
- **Zhou K & Yu L (2004)** – Antioxidant properties of bran extracts from Trego Wheat Grown at Different Location. *J. Agric. Food Chem.* (52), p: 1112-1117.

Annexes

Annexe (1): Matériel et produits utilisés :

1- Appareillages utilisés :

- Appareil HPLC (gradient) : SHIMAZU (SPD-10A), Colonne C18, λ (280).
- Appareil HPLC (Isocratique) : SHIMAZU (CTO-10A), Colonne C18, λ (280).
- Bain-marie MEMMERT
- Balance de précision BP 310P
- Broyeur KILA LABORATECHNIK M20
- Centrifugeuse de paillasse HETTICH EBAiii (3000 g)
- Centrifugeuse SIGMA 2-16K (25000 tours/ min).
- Etuve BINDER BD 53
- Papier filtre pour HPLC de type HN (0,45 μ m)
- PH METRE WTWPH 422
- Spectrophotomètre UV- Visible SHIMADZU 1240.
- Tamiseur RETSH AS 53.

2- Produits chimiques :

- Acetone
- Acetonitrile HPLC (CH₃CN), M = 41,05, d = 0,65 (FISION SCIENTIFIQUE EQUIPMENT).
- Acide chlorhydrique : HCL, 37 %, M= 36,46 g/ mol, d = 1, 181 (PROLABO).
- Acide linoléique
- Acide ortho-phosphorique (H₃PO₄), 85%, M = 98 (MERCCK).
- Acide trichloroacétique (TCA).
- BHA (butylhydroxyanisol)
- Caféine
- Chlorure d'Aluminium: AlCl₃, 6H₂O, M= 241,43 g/ mol, (PROLABO).
- Chlorure Ferreu (FeCl₂).

- Chlorure Ferrique : ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$), 98 %, $M = 270,30 \text{ g/mol}$, (PROLABO).
- DPPH (radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), 99%, $M = 46,07 \text{ g/mol}$, $d = 0,81$ (PROLABO).
- Ether de petrole (), $d = 0,65$ (PROLABO).
- Fericyanure de potassium
- Folin-Ciocalteu.
- Gaiacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$), 98%, $M = 124,14$ (FLUKA).
- H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène)
- Methanol HPLC (CH_4O), 100%, $M = 32,04 \text{ g/mol}$, $d = 0,79$ (PROLABO).
- Méthanol: CH_3OH , 99%, $M = 32,04 \text{ g/mol}$, $d = 0,79$, (PROLABO).
- Monohydrates de carbonates sodiques (20%), (PRS Panreac).
- Quercétine (Sigma).
- Thiocyanate d'ammonium
- Triethylamine HPLC ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$), 98%, $M = 101,19$, $d = 0,725$ (FLUKA).

Glossaire médical

- **Analgésique** : variété de médicaments qui permettent d'atténuer, voire de supprimer la douleur.
- **Anesthésique** : toute substance capable d'entraîner la suspension plus ou moins complète non seulement de la sensibilité générale mais aussi de celle d'un organe ou seulement d'une partie du corps.
- **Antidépresseur** : nom générique de diverses substances employées comme tranquillisant et possédant d'autre part des propriétés sédatives, hypnotiques (facilitant en théorie le sommeil) anticonvulsivantes ou amnésiantes (inhibant la mémoire).
- **Antifongique** : médicament actif contre les champignons.
- **Anti-inflammatoire** : Il s'agit d'un groupe de médicaments destinés à traiter une réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent telles que les manifestations rhumatismales.
- **Anti-HIV** : Il s'agit d'un groupe de médicaments destinés à traiter le SIDA, maladie causée par le virus HIV.
- **Anti-malarien** : médicament utilisé pour lutter contre le malaria (paludisme).
- **Antimicrobiens** : médicament utilisé pour traiter des maladies microbiennes.
- **Antimutagène** : médicament utilisé pour traiter des certaines mutations.
- **Antirhumatismales** : médicament utilisé dans le cas du rhumatisme.
- **Antisérotonine** : médicament utilisé pour diminuer ou arrêter la sécrétion de la sérotonine. La sérotonine est le nom usuel de la *5-hydroxytryptamine*, elle est produite par certaines cellules de l'intestin et par les neurones du SNC (rôle dans les synapses). Certaines tumeurs de l'intestin ou du poumon peuvent entraîner une hypersécrétion de sérotonine avec crise vasomotrice typique (rougeurs, sueurs, bouffés de chaleur).
- **Antivirale** : classe de médicament utilisé pour lutter contre les maladie dus au virus comme l'agrippe, ...
- **Bactériostatique** : Substances qui s'opposent au développement et à la reproduction des microbes, sans les tuer. Cas de certains sulfamide et antibiotiques.
- **Dépuratif** : qui purifie l'organisme, qui élimine les toxines ou les poisons.

- **Diurétique** : terme caractérisant de façon générale ce qui augmente la sécrétion urinaire.
- **Germécides** : Produit qui détruit les germes. On utilise des agents physiques (radiation, froid,...), des antibiotiques,...
- **Spasmolytique** : synonyme de antispasmodique, Médicament possédant la capacité de combattre les spasmes (contractures, crampes, convulsions).
- **vasodilatateur** : médicament utilisé pour augmenter le diamètre des vaisseaux sanguins.

Glossaire botanique

- **Actinomorphe** : synonyme de régulier. Se dit d'une fleur régulière à symétrie axiale.
- **Alterné** : qualifie des bourgeons ou des feuilles isolées, attachées alternativement une par une sur la tige à des niveaux différents.
- **Angiosperme** : du grec *angeion*, vase, et *sperma*, graine, (Graine dans une boîte) : classe des "plantes à fleurs" (Phanérogames) dont les graines sont enfermées dans un fruit.
- **Annuelle** : plante vivant une seule année, celle de son semis. Elle grandit, fleurit, fructifie et meurt en l'espace d'un an.
- **Arille** : excroissance ayant pour origine le tégument, expansion ou enveloppe extérieure d'une graine, parfois charnue, constituant un faux fruit.
- **Bilabié** : qualifie un calice ou une corolle dont les éléments sont divisés et soudés en deux lèvres inégales.
- **Bisannuelle** qualifie une plante vivant deux années. La première année, celle de son semis, elle donne une rosette des feuilles, et parfois des fleurs, et constitue des réserves. Elle produit une tige florale et fleurit la deuxième année à la belle saison en produisant de nouvelles graines.
- **Composé** : qualifie un organe formé d'organes plus petit. Qualifie une feuille dont le limbe divisé très profondément est formé de plusieurs folioles qui pourraient être prises pour des feuilles distinctes
- **Cormophyte** : végétal qui possède un cormus (appareil végétative) avec au moins une tige.
- **Dicotylédone** : qualifie un végétal dont la Plantule a deux cotylédons. S'oppose à monocotylédone.

- **Epi** : Inflorescence (groupe de fleurs) indéfinie simple, effilée et généralement dressée, formée par des fleurs sessiles ou subsessiles très voisines échelonnées autour d'un même axe central et directement fixés sans pédicelles ou avec un pédicelle très court.
- **Étamine** : un des organes sexuels mâles de la fleur qui contient le pollen
- **Glabre** : qualifie une plante ou un organe ne portant pas de poils, de cils, de soies, etc. S'oppose à pubescent, tomenteux.
- **Hermaphrodite** : qualifie une plante portant des fleurs avec les organes des deux sexes, mâles (étamines) et femelles (carpelles). La majorité des plantes à fleur est hermaphrodite
- **Lancéolé** : Une feuille lancéolée est de quatre à neuf fois plus longue que large et sa plus grande largeur se situe vers le milieu ou légèrement en dessous
- **Latex** : liquide laiteux ou sève exsudé par les tiges, les feuilles ou d'autres organes coupés.
- **Multipenné** : qualifie une feuille composée avec de plusieurs paires de folioles insérées en rang de chaque côté de la tige centrale ou du pétiole.
- **Pétale** : élément de la corolle d'une fleur, en général très voyant et très coloré, situé entre les sépales et les organes reproducteurs.
- **Pétiolée** : prolongation étroite de la tige portant la feuille ou les folioles, le rachis.
- **Silique** : assez semblable à une gousse, mais provenant de deux carpelles formé de deux pièces appliquées contre une mince cloison membraneuse médiane portant les graines séparées par un lien
- **Stipule** : du latin *stipula*, petite tige, : appendice membraneux ou foliacé, ou écaille situé à la base du pétiole foliaire et en général présent par paire.
- **Uniloculaire** : par rapport a une ovaire qui est composée d'une seule loge
- **Zygomorphe** : qualifie une fleur irrégulière à symétrie bilatérale et non axiale, s'oppose a actinomorphe

Résumé

Fumaria capreolata et *Fumaria bastardii* (Fumariacée) font partie de la grande famille des plantes médicinales largement répandues en algérie. Leurs multiples propriétés pharmacologiques sont dues à leur richesse en substances actives notamment en alcaloïdes isoquinoléines. Nous nous sommes intéressé d'une part au dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) de ces plantes et leur identification par Chromatographie phase liquide à haute performance (HPLC), ainsi qu'à l'extraction des alcaloïdes et leur identification par HPLC. D'autre part une étude de l'activité antioxydante (inhibition de l'acide linoléique, pouvoir réducteur, effet scavenger du radical DPPH et l'activité anti-peroxydase) de ces plantes a été évaluée. Quantitativement *F.bastardii* semble être plus riche en substances actives (37,50mg/g pour les polyphénols totaux et un rendement de 2,66% pour les alcaloïdes) que *F.capreolata* (19mg/g et 1,33%). Suite à cette richesse, *F.bastardii* présente les plus grandes activité que l'espèce *F.capreolata*. Qualitativement *F.capreolata* présente un nombre plus élevé en substances actives. Les alcaloïdes de ces plantes inhibent la peroxydation lipidique (67,43%) et présentent un effet scavenger du radical DPPH' (86%) plus important que l'extrait méthanolique, alors que le pouvoir réducteur est plus important dans le cas des extraits méthanoliques. Ces derniers exercent une inhibition compétitive vis-à-vis de la peroxydase aussi efficace que celle de la Quercétine.

Mots clés : *Fumaria capreolata*, *Fumaria bastardii*, *Fumariacées*, *polyphénols*, *alcaloïdes isoquinoléines*, *HPLC*, *antioxydants*, *activité antioxydante*, *peroxydase*, *activité anti-peroxydase*.

Abstract

Fumaria capreolata and *Fumaria bastardii* (Fumariaceae) belong to the family of the largely widespread medicinal plants in Algeria. They have several pharmacological properties which are due to their active substances and especially to their alkaloids. We were interested on the one hand to the proportioning of polyphenols (total polyphenols and flavonoids) of these plants and their identification by High performance liquid chromatography in addition to the extraction and identification by HPLC of alkaloids. On the other hand a study of the antioxidant activity of our extracts were determined by measuring their reducing power, their ability to inhibit linoleic acid oxidation, DPPH radical scavenging activities and the inhibition of peroxidase activity. Proportionings of the phenolic compounds of the extracts methanolic and a yield total alkaloids showed the richness of *F. bastardii* (37,50mg/g for polyphenols and 2,66% for alkaloids) compared to *F. capreolata* (19mg/g and 1,33%). This richness gives to *F.bastardii* the most important activity than *F.capreolata*. Alkaloids from our plants exhibit the potent DPPH' free radical scavenging activity (86%) and inhibition of linoleic acid peroxidation (67,43%), whereas methanolic extracts which exhibited the biggest reducing power. Methanolic extracts present a competitive inhibition on the peroxidase activity.

Keywords: *Fumaria capreolata*, *Fumaria bastardii*, *Fumariaceae*, *polyphenols*, *isoquinoline alkaloids*, *HPLC*, *antioxidants*, *antioxidant activity*, *peroxidase*, *anti-peroxidase activity*.

ملخص :

فوماريا كابريولاتا و فوماريا باستاردي نباتات طبية من فصيلة فومارياسية، واسعتا الانتشار في الجزائر. تتميزان بخصائص صيدلانية معتبرة نظرا لغناهما بالمركبات النشطة خاصة المركبات العضوية الا لكيدية. نظرنا من خلال دراستنا هذه إلى التقدير الكمي و النوعي لمتعدد الفينول من جهة، و إلى استخلاص و تعيين المواد الا لكيدية الايزوكينيلينية من جهة أخرى. و ذلك باستعمال الفصل الكروماتوغرافي في وسط سائل تحت ضغط مرتفع. من جهة أخرى تم تقييم نشاط هذه المركبات المضادة للأكسدة (قوة منع حمض اللينولييك، قوة تثبط الجذر الحر DPPH ، قوة إرجاع الحديد و قوة تثبيط الأنزيم "بيروكسيداز"). من الناحية الكمية فوماريا باستاردي تحوي أكبر نسبة مواد فعالة (37,5 ملغ/غ مركبات فينولية و نسبة 2,66 % من المركبات الا لكيدية) مقارنة مع فوماريا كابريولاتا (19 ملغ/غ و 1,33 ملغ/غ). هذه القيمة الكمية لفوماريا باستاردي جعلت نشاطها المضاد للأكسدة أكبر بالنسبة لفوماريا كابريولاتا. المركبات الا لكيدية أظهرت أكبر نسب لمنع أكسدة حمض اللينولييك (67,34 %) و قوة تثبيط الجذر الحر DPPH (86%) إذا ما قارناها بالمركبات الفينولية التي أظهرت أكبر قوة إرجاع. نفس المركبات الفينولية أظهرت قوة تثبيط تنافسي للأنزيم "بيروكسيداز" بنفس قوة "الكريسيتين".

مفتاح الكلمات: فوماريا كابريولاتا، فوماريا باستاردي، فصيلة فومارياسية الا لكيدية الايزوكينيلينية، الفصل الكروماتوغرافي في وسط سائل تحت ضغط مرتفع، عديدات الفينول، النشاط المضادة للأكسدة، المركبات المضادة للأكسدة، بيروكسيداز،