

*République Algérienne Démocratique 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  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Pharmacologie Moléculaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Évaluation du potentiel antioxydant et étude de la  
cytotoxicité des alcaloïdes totaux et des extraits  
phénoliques bruts de *Fumaria agraria***

Présenté par :

- Sahli Souâd
- Zaidi Sid Ali

Soutenu le: **17 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

Mlle Slimani S.	MAA	<b>Présidente</b>
Mme Sadaoui -Bougoffa K.	MCA	<b>Encadreur</b>
Mlle Adrar S.	MAA	<b>Examinatrice</b>

**Année universitaire : 2016 / 2017**

# ***SOMMAIRE***

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 1

## **Partie I : Synthèse bibliographique**

### **Chapitre I : Plante médicinale et les fumariacées**

I-Généralité sur les plantes médicinales ..... 3

II-Les fumariacées ..... 3

II-1-Généralité ..... 3

II-2-Classification botanique des fumariacées ..... 4

II-3-Les effets pharmacologiques des fumariacées ..... 5

II-4-La composition chimique des fumariacées ..... 6

### **Chapitre II : Activité antioxydante**

I-Les radicaux libres ..... 7

II-Les antioxydants ..... 8

II-1-Mécanismes d'action..... 8

II-2-Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ..... 9

III- La cytotoxicité..... 11

## **Partie II : Etude expérimentale**

### **Chapitre I : Matériel et méthodes**

I-Matériel et méthodes ..... 12

I-1-Matériel..... 12

I-1-1-Matériel végétal..... 12

I-1-2- Appareils et réactifs..... 13

I-2-Méthodes .....	13
I-2-1-Préparation de la poudre végétale .....	13
I-2-2- Extraction des alcaloïdes et des composés phénoliques de <i>F. agraria</i> .....	14
I-2-2-1- Extraction des composés phénoliques .....	14
I-2-2-2-Extraction des alcaloïdes totaux .....	16
I-2-3-Rendement en substances actives.....	17
II-Détermination de l'activité antioxydante .....	19
II-1-Activité scavenging du radical DPPH' .....	19
II-2-Mesure du pouvoir réducteur .....	20
II-3-Test de Molybdate phosphate.....	22
III-Test de cytotoxicité .....	23
IV-Etude statistique .....	24
<b>Chapitre II : résultats et discussion</b>	
I-Taux d'extraction des alcaloïdes .....	25
II-Dosage des composés phénoliques.....	25
III-Activité antioxydante .....	30
III-1-Activité scavenging du radical DPPH.....	30
III-2-Mesure du pouvoir réducteur .....	34
III-3-Test de Molybdate Phosphate .....	36
IV- La cytotoxicité.....	38
Conclusion et perspectives .....	41
Références bibliographiques	
Annexes	

## ***REMERCIEMENTS***

En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation.

Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à notre encadreur, **Mme BOGOFFA-SADAOUI**, Qui a mis toute sa compétence à notre disposition, pour ces directives et Conseils judicieux et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce modeste travail.

Nous tenons à remercier particulièrement **Mr SAHNOUNE** pour l'identification d'échantillons.

Nous voudrions aussi exprimer toute notre gratitude et nos remerciements à tous les enseignants existés pendant le travail en laboratoire de recherche de biologie moléculaire.

Nous remercions les membres du jury **Mlle ADRAR, Mme SLIMANI** d'avoir accepté de juger notre modeste travail.

Nous remercions également tous les membres de laboratoire de recherche de biologie moléculaire qui nous ont beaucoup aidés à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.

Nos profonde gratitude aussi au **docteur DJAMA** pour leur accueil sympathique et chaleureux au sein de son laboratoire d'analyse médicale, ainsi que l'ensemble des employés du laboratoire, pour leur intérêt qu'ils nous ont porté tout au long de notre stage mémoire ainsi pour leur aide et précision.

Nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

*Sahli & Zaidi*

## ***DÉDICACES***

***Souâd :***

*Je dédie ce modeste travail a :*

*Mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, amour, tendresse, soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*Ma chère sœur **Souraya**, pour son encouragement permanent et son soutien moral,*

*Mon grand frère **Farouk** et sa femme **Katia** et mon petit frère **A.Aziz**, Pour leur soutien,*

*Ma tante adoré **Lola** et ces enfants, qui a été la toujours là pour moi et me servir d'exemple,*

*Son oublié mes tantes **Saida**, **Latifa** et ces enfants, ma cousin **Kahina** que j'aime tellement,*

*Mon binôme **Zaidi sid ali** et tout sa famille,*

*Mes amis, qui n'ont cessé de m'encourager et toute la promo « Pharmacologie moléculaire 2017 ».*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.*

## ***DÉDICACES***

***Sid Ali :***

*Je dédie ce modeste travail a :*

*Mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, amour, tendresse, soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*Mon grand frère Pour son soutien,*

*Ma famille d'une manière générale*

*Mes amis, qui n'ont cessé de m'encourager et toute la promo « Pharmacologie moléculaire 2017 ».*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.*

## Liste des abréviations

**AT** : Alcaloïde totaux

**Dpph** : Radical 2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl

**Atp** : Adenosine triphosphate

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**IC<sub>50</sub>** : Concentration d'inhibition 50 de radicale du Dpph

**mg EQ/100g** : Milligramme équivalent quercétine par 100 gramme de poudre sèche

**mg GAE/100g** : Milligramme équivalent acide gallique par 100 gramme de poudre sèche

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**SOD** : Super-oxyde dismutase

**XO** : Xanthine Oxydase

**PBS** : tampon phosphate salin

**GR** : Globule rouge

**UV** : Ultra-violet

**BHT** : Hydroxytoluène butylé

**GC-MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplé à spectroscopie de masse

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Dessin de la partie aérienne de <i>Fumaria Officinalis</i> .....	4
<b>Figure 02</b> : Photographie de <i>Fumaria agraria</i> .....	12
<b>Figure 03</b> : Schéma du protocole d'extraction par macération d'extrait brut des composés phénoliques .....	14
<b>Figure 04</b> : Schéma du protocole d'extraction par soxhlet d'extrait brut contenant les composés phénoliques. ....	15
<b>Figure 05</b> : Schéma du protocole d'extraction des alcaloïdes totaux. ....	16
<b>Figure 06</b> : Protocole de dosage des composés phénoliques. ....	18
<b>Figure 07</b> : Procédure de dosage des flavonoïdes totaux.....	19
<b>Figure 08</b> : Protocole d'étude de l'effet scavenging du DPPH.....	20
<b>Figure 09</b> : Protocole d'étude du pouvoir réducteur. ....	21
<b>Figure 10</b> : Protocole du Test de Molybdate Phosphate. ....	22
<b>Figure 11</b> : Protocole d'étude de l'effet hémolytique .....	24
<b>Figure 12</b> : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	26
<b>Figure 13</b> : Teneur en polyphénols totaux .....	27
<b>Figure 14</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine .....	28
<b>Figure 15</b> : Teneur en flavonoïde.....	29
<b>Figure 16</b> : Teneur en flavonoïde par rapport au taux de polyphénol totaux.....	30
<b>Figure 17</b> : Activité scavenging du DPPH de l'extrait ethanolique et l'acide gallique ...	31
<b>Figure 18</b> : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques .....	32
<b>Figure 19</b> : Mode d'action d'un radical phénoxy.....	32
<b>Figure 20</b> : Activité scavenging du DPPH des alcaloïdes totaux et de la boldine.....	33
<b>Figure 21</b> : Pouvoir réducteur de l'extrait ethanolique et de l'acide gallique.....	34
<b>Figure 22</b> : Mécanisme de réduction de fer par les polyphénols .....	35
<b>Figure 23</b> : Pouvoir réducteur des alcaloïdes totaux et de la boldine .....	36
<b>Figure 24</b> : Activité antioxydant totale de l'extrait ethanolique et de l'acide gallique ....	37
<b>Figure 25</b> : Activité antioxydant totale des alcaloïdes totaux et de la boldine.....	38
<b>Figure 26</b> : Effet hémolytique de l'extrait ethanolique et de l'acide gallique.....	29
<b>Figure 27</b> : Effet hémolytique des alcaloïdes totaux et de la boldine .....	40

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Exemple des médicaments à base de la parité aérienne de la fumeterre. ....	5
<b>Tableau II</b> : Les principaux constituants chimiques des fumariacées. ....	6
<b>Tableau III</b> : Description botanique de la partie aérienne de <i>Fumaria agraria</i> . ....	12
<b>Tableau IV</b> : Les taux en composés phénoliques de <i>Fumaria agraria</i> . ....	28

# Introduction

---

## Introduction

Au cours de la dernière décennie, une réelle prise de conscience c'est portée sur l'importance de la phytothérapie pour le traitement de diverses maladies.

Les plantes, à travers leurs différentes voies métaboliques, synthétisent deux types de métabolites. Les métabolites primaires, essentiels à la vie de la plante, lui assurent la couverture de ses besoins nutritifs et énergétiques, ils incluent les acides aminés, les glucides, les acides nucléiques... Les métabolites secondaires, permettent à la plante d'interagir avec son écosystème et lui garantissent une protection contre les différentes agressions (prédateurs, infections,...etc). Les métabolites secondaires, qui sont subdivisés en trois grands groupes : les composés phénoliques, les huiles essentielles et les alcaloïdes (**Dai et Mumper, 2010 ; Corradini et al., 2011**) font l'objet de nombreuses études, en raison de leurs nombreuses activités biologiques. Ces activités incluent l'activité antibactérienne, antifongique, anticancéreuse, antioxydante... (**Pandey et Rizvi, 2009**).

De nombreuses études ont démontré que les extraits de plantes étaient pourvus d'une activité antioxydante, ce qui suscite un grand intérêt en recherche (**Pincemail, 1998**). Plus de 3350 espèces de plantes ont été étudiées pour leur potentiel cytotoxique et de nombreuses molécules utilisées en thérapeutique anticancéreuse dérivent du règne végétale ; plusieurs exemples peuvent être cités : le taxol, les vinca-alcaloïdes (**Fang et al., 2008**).

Au cours de ces dernières années, une étude menée sur l'espèce qui a fait l'objet de notre travail, *Fumaria agraria* de la famille des Fumariacées, a débuté par une enquête ethnopharmacologique afin de prendre connaissance avec les différentes plantes médicinales utilisées dans la région de Bejaia et de ses alentours. Cette enquête a été réalisée afin d'interroger des tradipraticiens et des personnes de troisième âge se soignant avec les plantes (**Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**).

Le genre « *Fumaria* » est très répandu dans notre région, son utilisation dans la médecine traditionnelle couvre plusieurs pathologies. Ils sont connues pour leurs multiples activités biologiques comme, laxative, antipyrétique et surtout dans le traitement des désordres hépatobiliaires (**Gilani et al., 2005**).

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) et à la présence des composés phénoliques (acides organiques, flavonoïdes...) qui contribuent également aux différentes activités biologiques (**Suau et al., 2002**).

Cette étude s'est déroulée au sein du laboratoire de Biologie moléculaire (Université Abderrahmane Mira, Bejaia) et laboratoire d'analyse médical **Dr DJAMA** où, le travail pratique a été divisé en deux parties : premièrement, il a été procédé à la collecte des échantillons et à la préparation des extraits de plantes et leurs dosages. Deuxièmement, on a visé l'évaluation du potentiel antioxydant ainsi que la cytotoxicité des extraits précédents.

Le présent document est divisé en deux parties : la première concerne une synthèse bibliographique partagée en deux chapitres, le premier est consacré aux généralités sur les plantes médicinales ainsi que la plante étudiée, alors que le deuxième chapitre traitera l'activité antioxydante et la cytotoxicité. La deuxième partie est consacrée au travail expérimental proprement dit et comprend deux parties : méthodologies, résultats et discussions.

Partie I :

Synthèse bibliographique

---

Chapitre I :

Plante médicinale et les fumariacées

---

## **I-Généralité sur les plantes médicinales**

En médecine traditionnelle, des milliers d'espèces végétales sont utilisées dans divers vertus, leurs propriétés pharmacologiques sont dues à leurs richesses en métabolites secondaires. Selon l'OMS, plus de 50% des 252 médicaments considérés comme essentiels, sont d'origines végétales (**Rates, 2010**).

Dans ces dernières années, plus de 80 % de la population africaine font recours à la nature et aux drogues végétales pour traiter certains maladies (diabète, la grippe, hypertension,...etc) (**Marles et Farnsworth, 1996**).

Ce retour à la médecine traditionnelle est la cause de divers raisons à savoir, le coût qui est faible comparant aux médicaments conventionnels, à la disponibilité des plantes et notamment à l'existence des maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement pharmaceutique efficace (**Touami, 2017**).

## **II-Les Fumariacées**

### **II-1-Généralité**

Le nom « *Fumaria* » vient du mot latin : « *fumus terrae* » qui signifie fumée de terre, cette dénomination se décline du suc de la plante qui fait pleurer les yeux comme la fumée (**Finte et Weiss, 2004**), Son nom vernaculaire selon la région kabyle : tidjudja–yesghi ou bien takejirte teskourte (**Idres et Madi, 2009**).

Les fumeterres sont des plantes herbacées annuelles ou bisannuelle, dressée ou diffuse. Elles présentent une tige dressée de 30 à 70 cm, fortement rameuse avec des feuilles alternées très finement découpées. Les fleurs sont petites de couleurs variables, allant du blanc au rose violacé avec des taches pourpres à leur extrémité. Le fruit est une silicule globuleuse renfermant une seule graine, tronquée au sommet. La plante contient un latex et présente un goût amer, qui lui vaut le nom de « fiel de terre » (**Jolyclerc, 1799**).



**Figure 01** : Dessin de la partie aérienne de *Fumaria Officinalis* (Chazel et Chazel, 2012).

Les Fumariacées sont des plantes qui poussent dans les champs, les terrains vagues et sur les bords des chemins. Ils sont repartis dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord, en particulier dans les régions tempérées d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Espagne (Suau et al., 2004 ; Gilani et al., 2005).

## II-2-Classification botanique du genre « *Fumaria* »

Selon les caractéristiques morphologiques des fumeterres on distingue deux classifications reparties comme suite :

### A. Classification classique :

Cette classification sera détaillée dans la partie matérielle et méthodes.

### B. Classification phylogénique :

En botanique les Fumariacées et les Papavéracées sont considérés comme un même genre qui est le genre *Fumaria* (Liden et al., 1997).

- **Ordre** : Ranunculales
- **Famille** : Fumariaceae / Papaveraceae
- **Genre** : *Fumaria*

### II-3-Les effets pharmacologiques des Fumariacées

De nombreuses études ont montré que les fumeterres sont très riches en alcaloïdes de type isoquinoléique, qui sont responsables d'une large gamme d'activité pharmacologique à savoir la régulation de l'activité du foie et de la vésicule biliaire (**Sener, 2002**).

En médecine traditionnelle, les fumeterres sont utilisées comme anti hypertensive, laxative, diurétique (**Suau et al., 2002**). Ainsi que dans le traitement des maladies de la peau et les désordres gastro-intestinaux tel que la constipation et la diarrhée (**Gilani et al., 2005 ; Goetz et al., 2009**).

Ils possèdent également des effets antitumoraux, antimicrobiens et antimalarials (**Maiza-Benabdesselam et al., 2007 ; Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**).

En médecine traditionnelle des médicaments à base de la fumeterre sont commercialisés sous divers noms et formes pharmaceutiques, illustrés dans le tableau ci-dessous (**Tableau I**) (**Goetz et al., 2009**).

**Tableau I** : Exemple des médicaments à base de la parité aérienne de la fumeterre

Nom commercial	Composition	Classe thérapeutique
Actibil	160 mg titrant 0,5% de protopine de la parité aérienne.	Gastro-intestinale
Arkogelule	220 mg titrant 0,5% de protopine de la parité aérienne.	Entéro-Hépatologique
Oddibil	250 mg d'extrait sec de la partie aérienne.	Entéro-Hépatologique

## II-4-La composition chimique des Fumariacées

L'analyse phytochimique des fumeterres a démontré une richesse en substances secondaires notamment en alcaloïdes de la classe isoquinoléine. Certains constituants sont illustrés dans le tableau ci-dessous (**Tableau II**).

**Tableau II** : Les principaux constituants chimiques des Fumariacées (**Suau, 2002 ; Sousek et Valesova, 1999**).

Famille des constituants chimiques	Constituants chimiques
<b>Alcaloïdes isoquinoléines</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• La sous classe des isoquinoleines : Cryptopine, Protoberbérines, Aurotensine, Stylopine, Sinactine et N-méthylsinactine.</li><li>• La sous classe des Spirobenzylisoquinoleine Fumaricine, Fumaritine, Fumariline.</li><li>• La sous classe des Indenobenzozepine : Fumaritridine, Fumaritrine, ... etc</li></ul>
<b>Hétérosides Flavoniques</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hétéroside de la quercétine : Isoquercitrine, Rutoside et le quercitrine-3,7-diglucoside-3-arabinoglucoside.</li></ul>
<b>Acides Phénols</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Acide caféique, Chlorogénique et Fumarique.</li><li>• Esters d'acide malique, d'acide cinnamique et de l'acide caféique</li></ul>
<b>Acides organiques</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Acide malique, Acide éritique, Acide glycolique, Acide succinique, Acide lactique...etc.</li></ul>

Chapitre II :

Activité antioxydante

---

## I-Les radicaux libres

### ➤ Généralité

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires dans la production d'énergie « ATP » et par conséquent dans leurs vitalités. En revanche, une partie de cet oxygène peut s'échapper à ces mécanismes et se métaboliser en espèces toxiques dites radicaux libres (**Favier, 2003**).

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés dans son orbital externe. Cette molécule étant très instable, elle réagit rapidement avec d'autres composants (lipides, protéines, ...etc), essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité (**Martinez-Cayuela, 1995**).

L'âge et le vieillissement sont des facteurs important dans l'augmentation de production de radicaux libres qui est en faveur d'introduction le stress oxydant (**Favier, 2003**).

En faisant apparaitre des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, ceci sera la principale cause de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, œdème pulmonaire...etc (**Favier, 2003**).

### ➤ Origine des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, la plupart se forment au cours de métabolisme de l'oxygène en eau dans les mitochondries. Cependant, une réduction incomplète de l'oxygène en eau peut aboutir à la production de l'oxygène singulet mais surtout de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). La dismutation de  $O_2^{\cdot-}$  va donner naissance au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), que à lui-même n'est pas toxique mais donne naissance à une molécule radicalaire hautement toxique, le radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ) (**Valko et al., 2006**).

Les radicaux libres peuvent également être produits lors de La régulation des fonctions cellulaires létales telles que la mort cellulaire programmée et dans la réponse immunitaire. Lors de cette dernière, les cellules phagocytaires libéreront un anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) afin de neutraliser l'agent pathogène (**Valko et al., 2006**).

D'autres facteurs exogènes tels que les rayonnements UV et les radiations ionisantes sont responsables de la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $^1O_2$  qui sont des molécules génératrices de radicaux libres (**Favier, 2003**).

## II-Les antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres, susceptibles d'inhiber directement leurs productions, de limiter la propagation ou de détruire ces espèces radicalaires (**Favier, 2003**). Deux lignes de défense pour détoxifier la cellule sont connues :

### ➤ Les antioxydants endogènes

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (**Avissar et al., 1989**).

Chaque une des enzymes précédemment citées neutralisent sélectivement tel ou tel radical libre.

### ➤ Les antioxydants exogènes

De nombreuses molécules issues de notre alimentation sont dotées d'un pouvoir antioxydant, parmi : les vitamines (la vitamine C, la vitamine E), certains métabolites secondaires végétales (les caroténoïdes, les polyphénols et les alcaloïdes), ...etc (**Lehucher et al., 2001**).

## II-1-Mécanismes d'action des antioxydants

Les antioxydants agissent par divers mécanismes à savoir, la neutralisation de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes et la chélation des métaux de transition (**Valko et al., 2006**).

Les antioxydants sont en effet des agents de prévention, ils bloquent l'initiation d'une autre réaction d'oxydation en s'oxydant eux même en cédant un atome d'hydrogène ou d'électron ou encore en se complexant avec les radicaux libres (**Pincemail et al., 2002**).

## II-2-Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

### ➤ Test de blanchissement du $\beta$ -carotène (test *in vitro*)

#### Principe :

Dans ce test, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du  $\beta$ -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

#### Mode opératoire :

L'émulsion du  $\beta$ -carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 3 mg du  $\beta$ -carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 $\mu$ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au évaporateur rotatif, par la suite 100ml d'eau oxygénée sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement.

350 $\mu$ l de solution d'extrait ou antioxydant de référence (BHT) sont additionnés à 25 ml de l'émulsion précédente. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490nm pendant 48h (**Khartal et al., 2007**).

$$\text{AAR} = (\text{Abs Échantillon} / \text{Abs BHT}) \times 100.$$

Où :

**AAR** : Activité anti-oxydante relative.

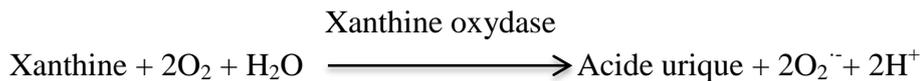
**Abs Échantillon** : absorbance de l'échantillon après 48 heures.

**Abs BHT** : Absorbance du BHT après 48 heures.

### ➤ Mesure de l'activité scavenger de l'anion superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) (test *in vitro*)

#### Principe :

Cette activité est basée sur la capacité d'un composé à capturer un radical libre, l'anion super-oxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). Ce radical est généré *in vitro* par le système xanthine oxydase/xanthine (**Robak et Gryglewski, 1988**).



### Mode opératoire :

Un volume d'une gamme de concentrations de l'extrait à tester sont dissouts dans du tampon phosphate (pH 7.4), auxquelles sont additionnés des volumes connus de l'enzyme « XO », du substrat « xanthine » et d'un cofacteur « cytochrome c ». La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 550 nm.

### ➤ **Activité antioxydante (*in vivo*) : l'effet anti-hémolytique**

#### Principe :

Dans cette étude la capacité antioxydante est évalué selon la capacité anti-hémolytique réalisé sur 3 lots de souris, un lot qui reçoit un xénobiotique comparé aux deux autres lots, le lot témoin négatif (recevant le véhicule du xénobiotique) et le lot témoin positive (recevant un antioxydant de référence) (**Zerargui, 2015**).

#### Mode emploi :

Des souris mâles, Swiss albinos, adultes, de poids variant, sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en trois lots expérimentaux de 6 à 7 animaux chacun. Les animaux sont maintenus à température ambiante avec accès libre en eau et en nourriture.

Durant trois semaines, une injection intra-péritonéale quotidienne d'une dose de 100 mg/kg de l'extrait à tester est appliquée au premier groupe. Le lot témoin positif recevra 50 mg/kg d'acide ascorbique. Tandis que le lot contrôle négatif reçoit un volume de la solution saline normale (0,9%).

La capacité anti hémolytique est évaluée sur les 100 µl du sang récupéré (**Zerargui, 2015**).

Certaines plantes utilisées à des fins thérapeutiques, peuvent à forte dose provoquer une menace sur la santé humaine, suite à sa cytotoxicité qu'elle exerce (**Fourasté, 2000**). Au niveau des sites cellulaires et agissent sur des cibles moléculaires, capables de perturber immédiatement ou à long terme le fonctionnement normal de façon réversible ou irréversible (**Viala et botta, 2007**).

### **III-Cytotoxicité**

La cytotoxicité est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique de provoquer des altérations cellulaires en aboutissant à sa destruction (**Dausset, 1976**).

Ce mécanisme d'action réside sur la perturbation de la membrane cellulaire provoquant une fuite du contenu cellulaire ou bien l'inhibition des fonctions vitales comme le transport d'ion ou la transduction du signal et avec des inhibiteurs de transporteurs spécifiques. (**Xu et al., 2004**).

En effet, l'évaluation de la cytotoxicité repose sur des études qualitatives ou quantitatives. Qui s'adresse aux modèles cellulaires à savoir les cellules épithéliales, les cellules de reproduction ainsi que les globules rouges, qui représentent un bon modèle d'étude en biologie cellulaire et moléculaire, en raison de sa facilité d'isolement et sa relative de simplicité, qui consiste à évaluer l'effet cytotoxique en mesurant la fuite d'hémoglobine dans le milieu à 540 nm (**Viala et botta, 2007**).

Partie II :

Etude expérimentale

---

Chapitre I :

Matériel et méthodes

---

## I-Matériel et méthodes

### I-1-Matériel

#### I-1-1-Matériel végétal

La Fumeterre est une plante herbacée dicotylédone de la famille des Fumariacées, annuelle ou bisannuelle. La description botanique de la plante est représentée ci-dessous (Figure 02 et Tableau I).



**Figure 02** : Photographie de *Fumaria agraria*.

**Tableau III** : Description botanique de la partie aérienne de *Fumaria agraria* (Boissier, 1845).

Organe	Description
<b>Tiges</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Épaisses, longues, grimpantes, rameuses.</li></ul>
<b>Feuilles</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Couleur vert, alternes pétiolées et composées.</li></ul>
<b>Fleurs</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Volumineuses de plus en plus roses après fécondation seuls les pétales latéraux sont pointés pourpre.</li></ul>
<b>Fruits</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Formé d'une capsule, très granuleux de plus de 2,4 mm de largeur.</li></ul>

*Fumaria agraria* est classée comme suit : (Goetz et al., 2009 ; Pérez-Gutiérrez et al., 2012).

**Règne** : Plantae

**Sous règne** : Cormophytes

**Embranchement** : Spermaphytes

**Sous-embranchement** : Angiospermes

**Classe** : Dicotylédones

**Ordre** : Papavérales

**Famille** : Fumariaceae

**Genre** : *Fumaria*

**Espèce** : *Fumaria agraria*

## I-1-2-Matériel et réactifs

Le matériel et les différents réactifs utilisés pour l'extraction et les différents tests sont reportés dans l'annexe (**Annexe I**).

## I-2-Méthodes

### I-2-1-Préparation de la poudre végétale : Échantillonnage, broyage et tamisage

La partie aérienne de *Fumaria agraria* (tiges, feuilles, fleurs et fruits) a été récoltée la matinée dans une région rurale, Akbou, dans la wilaya de Bejaia (Algérie) (GPS : 36° 27' 40"; North, 4° 32' 0" East). La récolte est faite le mois de Mars 2017, durant la période de fructification, qui est un moment propice pour la cueillette. Un échantillon d'herbier a été déposé à l'Herbier des Conservatoires et Jardins botaniques de Nancy, France sous la référence "NCY013571" par le collecteur, Bougoffa-Sadaoui Khalida (**Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**).

La partie aérienne de la plante est soigneusement lavée à l'eau courante puis mis à séchée dans l'étuve à 40°C pendant 5 jours avant utilisation.

Les échantillons séchés sont réduits en poudre grâce à un broyeur électrique puis tamiser à une poudre dont le diamètre est inférieur à 125 µm.

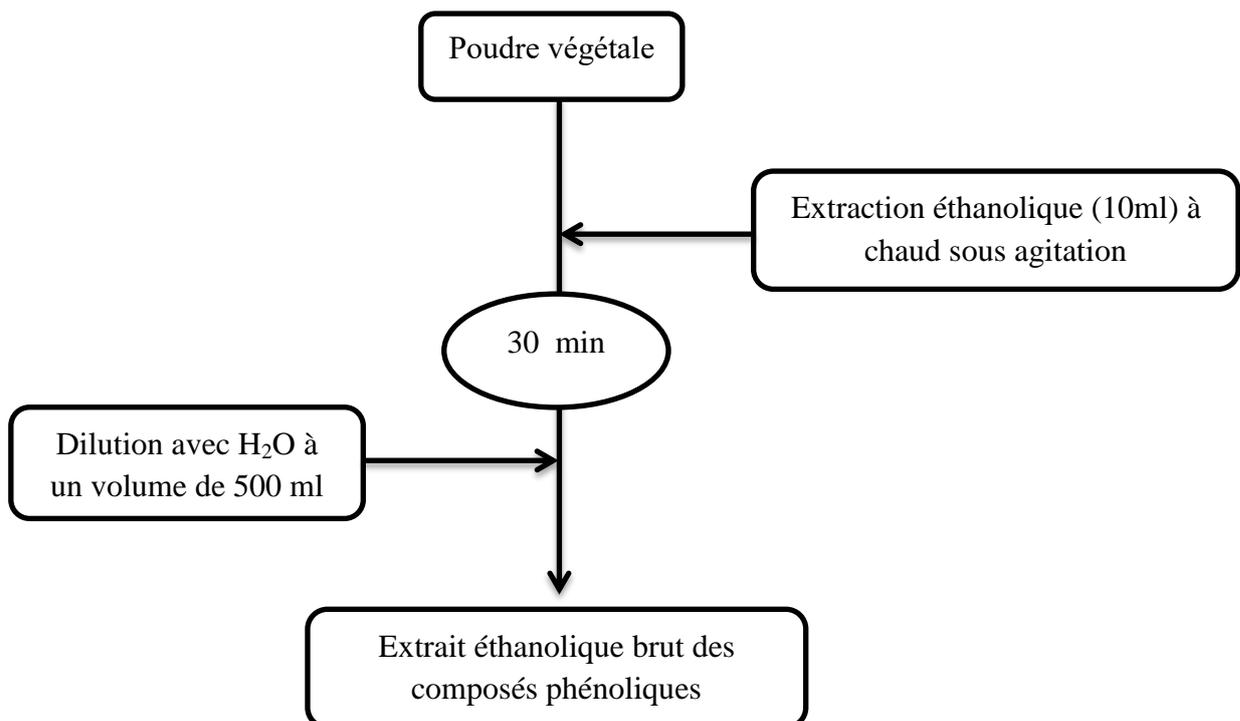
### I-2-2- Extraction des alcaloïdes et des composés phénoliques de *F. agraria*

La méthode d'extraction que nous avons adoptée est l'extraction solide-liquide par soxhlet et macération en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction.

#### I-2-2-1- Extraction des composés phénoliques

##### ➤ Extraction par macération :

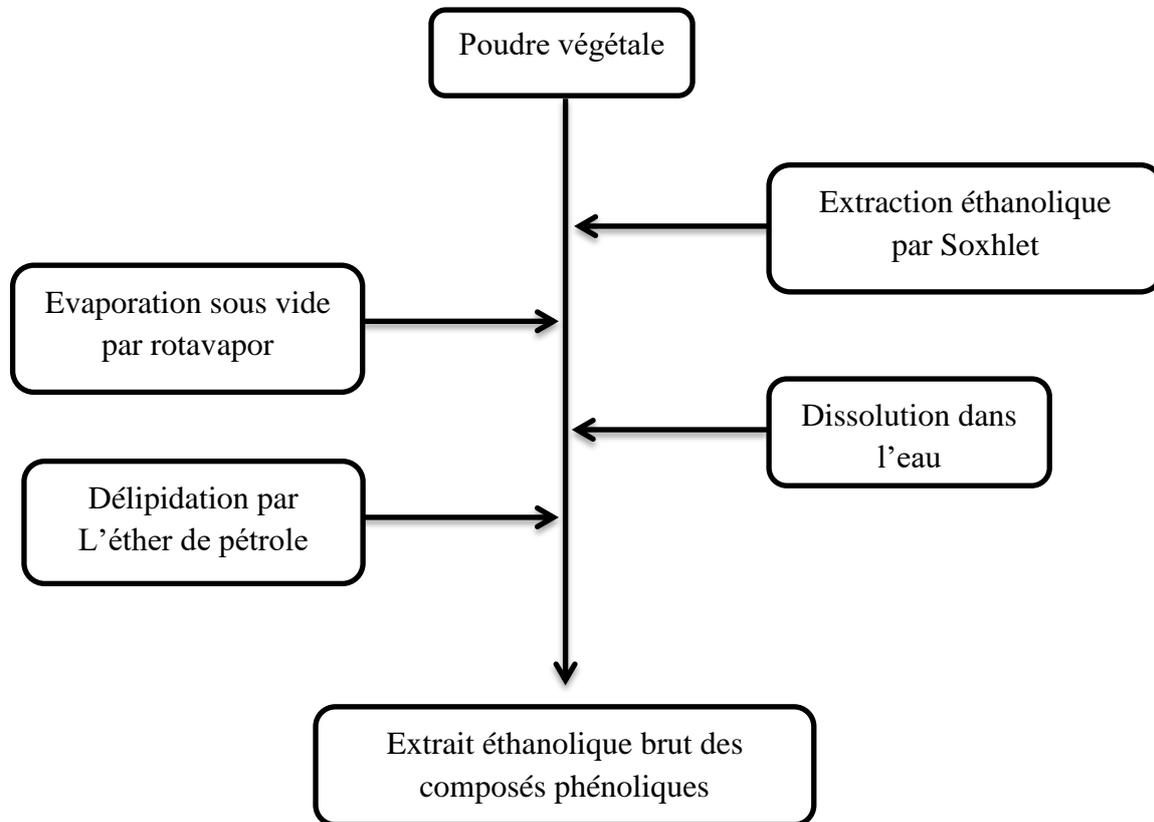
Cette extraction est effectuée selon le protocole mis par **Souseck** et ces collaborateurs (1999) défini sur la figure suivante (**figure 03**).



**Figure 03** : Schéma du protocole d'extraction par macération d'extract brut des composés phénoliques (Sousek et Valesova, 1997).

➤ **Extraction par Soxhlet**

L'extraction des composés phénoliques est réalisée selon le protocole décrit par **Farzana en 1997**, schématisé sur la figure suivante (**Figure 04**).

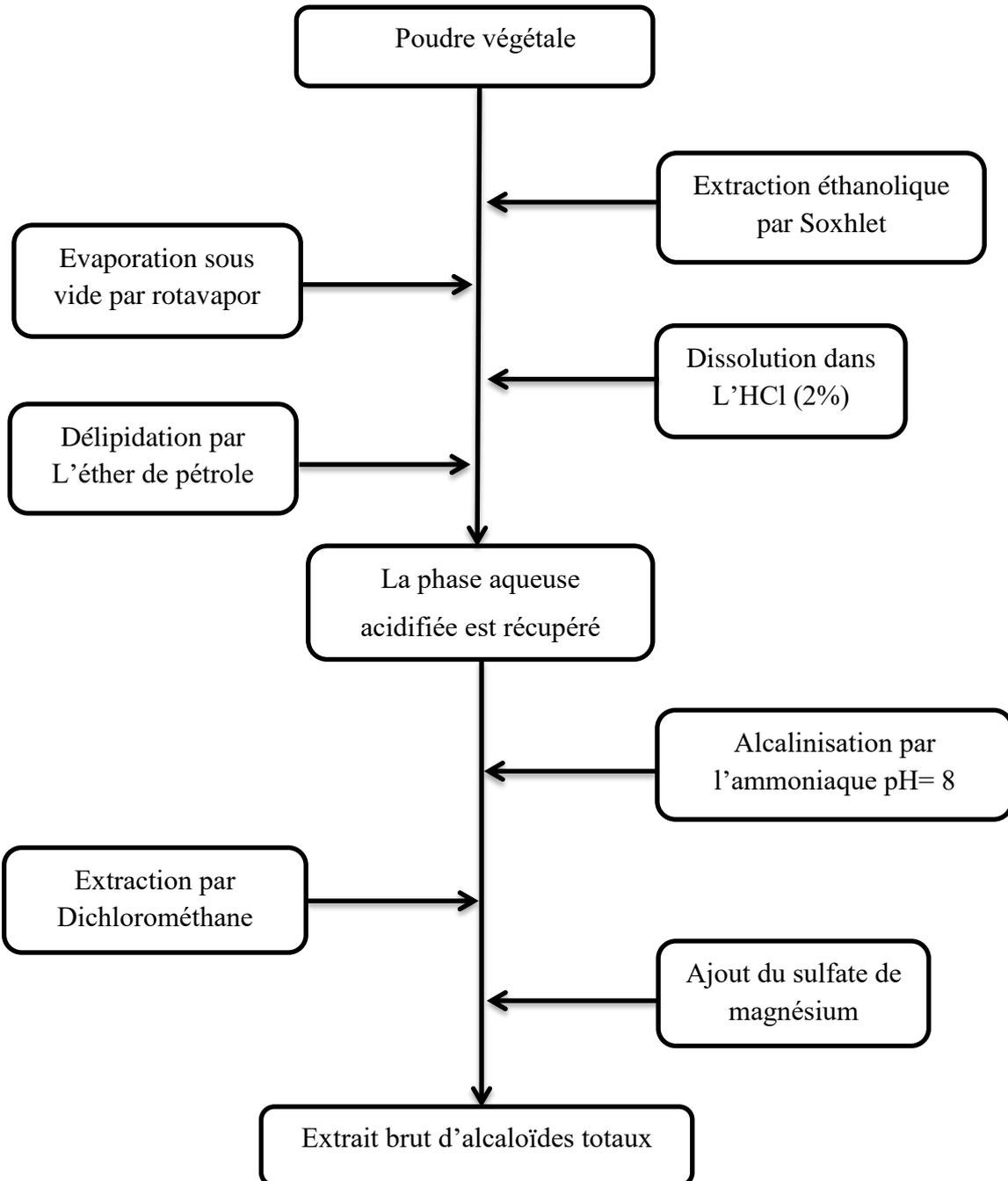


**Figure 04** : Schéma du protocole d'extraction par soxhlet d'extrait brut contenant les composés phénoliques (**Farzana, 1997**).

Les deux types d'extraits éthanolique (par soxhlet et macération) sont soumis à un dosage colorimétrique afin de déterminer le taux des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes dans chaque extrait.

### I-2-2-2-Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction des alcaloïdes de la partie aérienne de *F. agraria* a été réalisée selon le protocole de **Suau et al. 2002**, schématisé sur la figure suivante (**Figure 05**).



**Figure 05** : Schéma du protocole d'extraction des alcaloïdes totaux (Suau et al., 2002).

### I-2-3-Rendement en substances actives

#### ➤ Rendement en alcaloïdes totaux

Le rendement en alcaloïdes totaux est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec en alcaloïdes obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé comme suit (**Harborne, 1998**).

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

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

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

**MV** : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

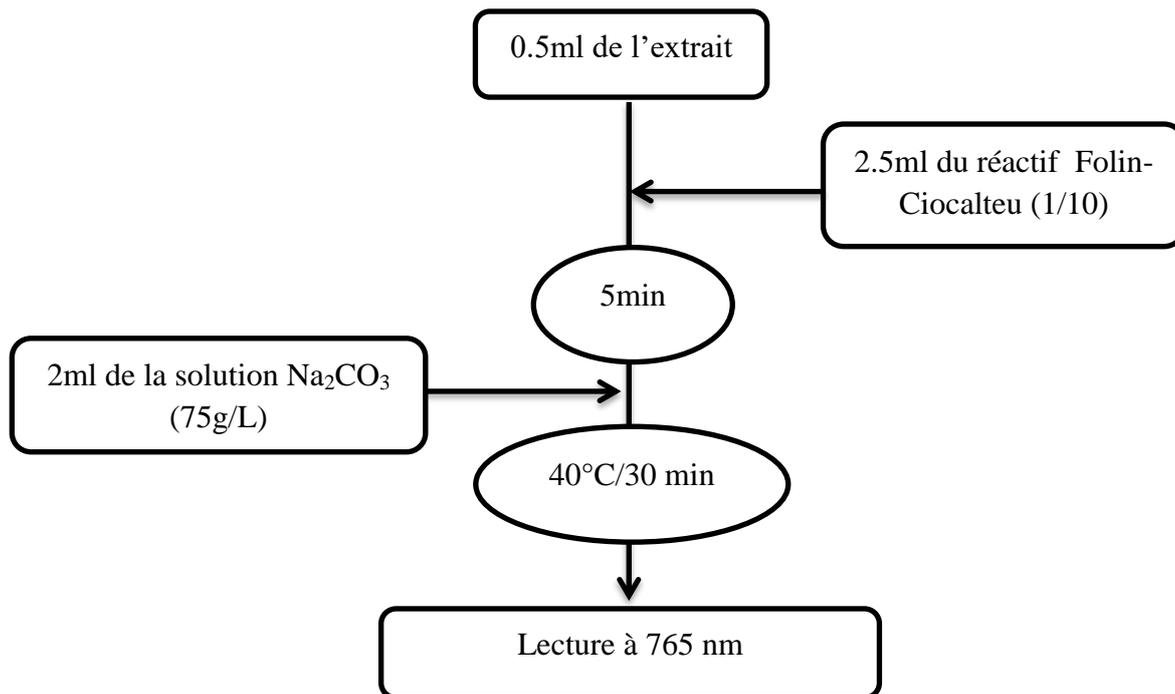
#### ➤ Rendement en polyphénol totaux « Dosage colorimétrique »

##### Principe :

La teneur des composés phénoliques est estimée selon la méthode de Folin Ciocalteu. Le principe est basé sur la réduction en milieu alcalin du réactif Folin Ciocalteu qui est un mélange d'acide de phosphotungstène ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolybdène ( $H_3PMo_{12}O_4$ ) par les groupements oxydables des composés phénoliques qui se traduit par une coloration bleue mesurée à une longueur d'onde de 765 nm (**Singleton et al., 1999**).

##### Mode opératoire :

La quantification des polyphénols est réalisée comme indiqué dans la figure (**figure 06**) (**Souseck et Valesova, 1999**).



**Figure 06** : Protocole de dosage des composés phénoliques (Soušek et Valesová, 1999).

- Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par l'H<sub>2</sub>O(d).
- Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant une gamme de concentrations d'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique.

### ➤ Rendement en Flavonoïdes (dosage colorimétrique).

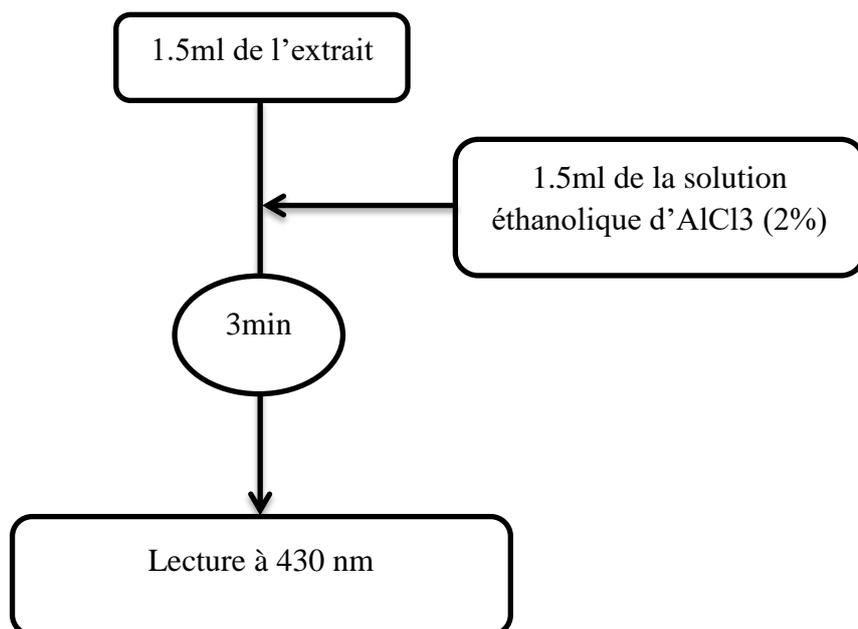
#### Principe :

L'estimation de la teneur en flavonoïdes dans nos extraits est réalisée par la méthode de Djeridane *et al.*, 2006.

Le principe est basé sur l'interaction de groupement hydroxyle des flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium, qui se traduit par un complexe jaunâtre dont l'intensité optique est mesurée à 430 nm.

#### Mode opératoire :

Le dosage des flavonoïdes est adopté selon le protocole décrit par Djeridane *et al.*, (2006) reporté dans la figure suivante (Figure 07).



**Figure 07** : Procédure de dosage des flavonoïdes (Djeridane et al., 2006).

- Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par l'H<sub>2</sub>O(d).
- Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant une gamme de concentrations de la quercétine. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent quercétine.

## II-Détermination de l'activité antioxydante

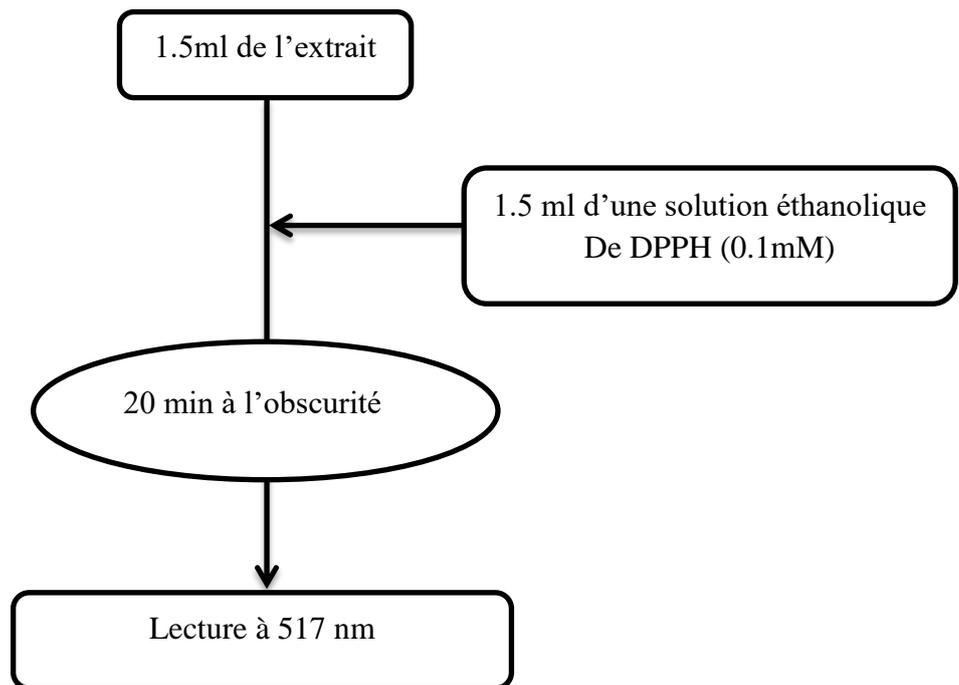
### II-1-Activité scavenging du radical DPPH<sup>•</sup>

#### Principe :

Dans ce test en présence des antioxydants le 2-2-diphényle-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette est réduit en composé jaune. Cette coloration est mesurée à 517 nm (Molyneux, 2004).

#### Mode opératoire :

L'activité scavenging du radical DPPH<sup>•</sup> est adopté selon le protocole de Shirwaikar et al. (2006) reporté dans la figure suivante (Figure 08).



**Figure 08 :** Protocole d'étude de l'effet scavenging du DPPH (Shirwaikar et al., 2006).

- Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par le solvant.

Le pourcentage scavenging est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Scavenging du radical DPPH} = \frac{(Ab - As)}{Ab} \times 100$$

**Ab:** absorbance du blanc.

**As :** absorbance en présence de chaque concentration d'extrait.

**Les IC<sub>50</sub>** sont calculées en utilisant le logiciel origin 9.

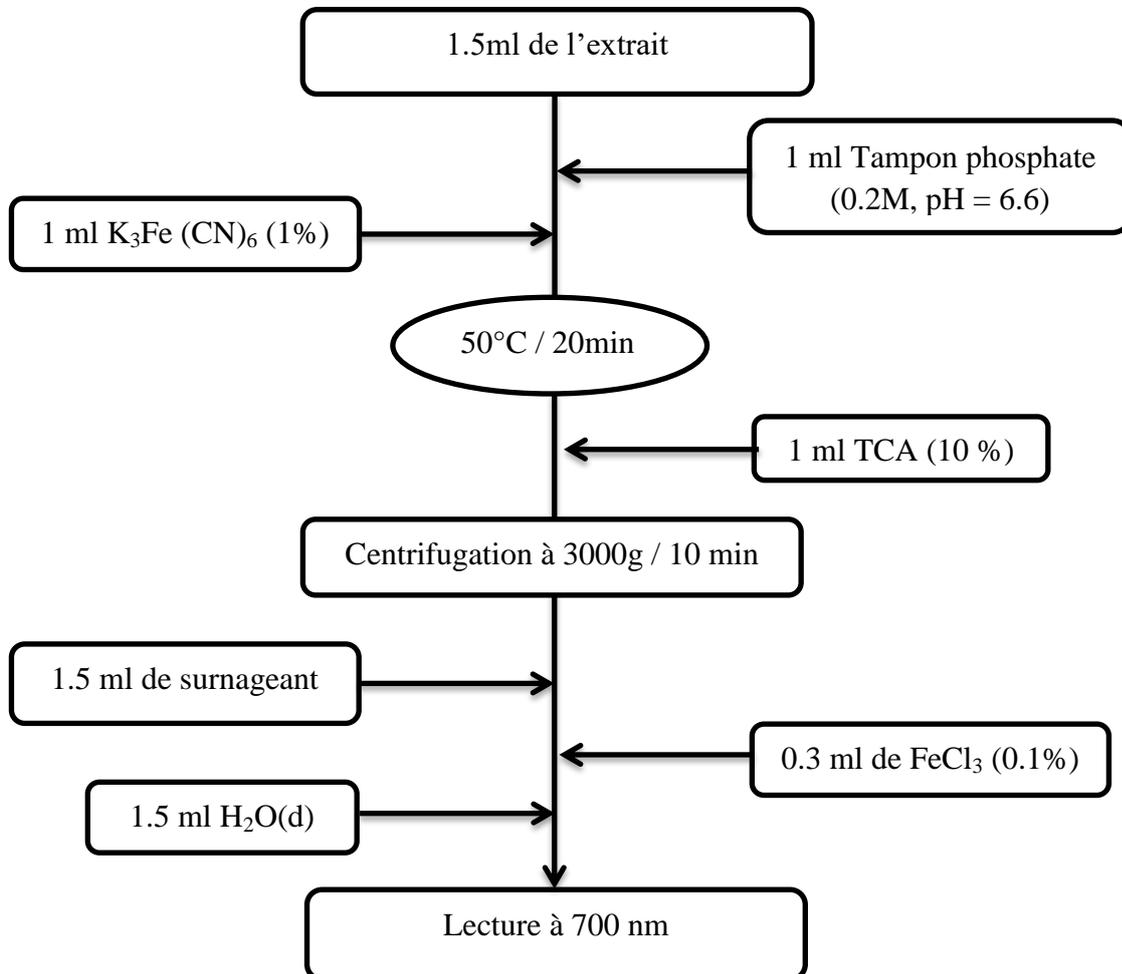
## II-2-Mesure du pouvoir réducteur

### Principe :

Le pouvoir réducteur est étudié pour déterminer la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique « Fe<sup>3+</sup> » du complexe ferricyanure de potassium en fer ferreux « Fe<sup>2+</sup> ». Cette réduction se traduit par une coloration bleue mesuré à 700 nm (Oyaizu, 1986).

**Mode opératoire :**

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode préconisée par **Amarowicz** et ces collaborateurs en **(2004)**, illustré dans la figure suivante (**Figure 09**).



**Figure 09** : 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.

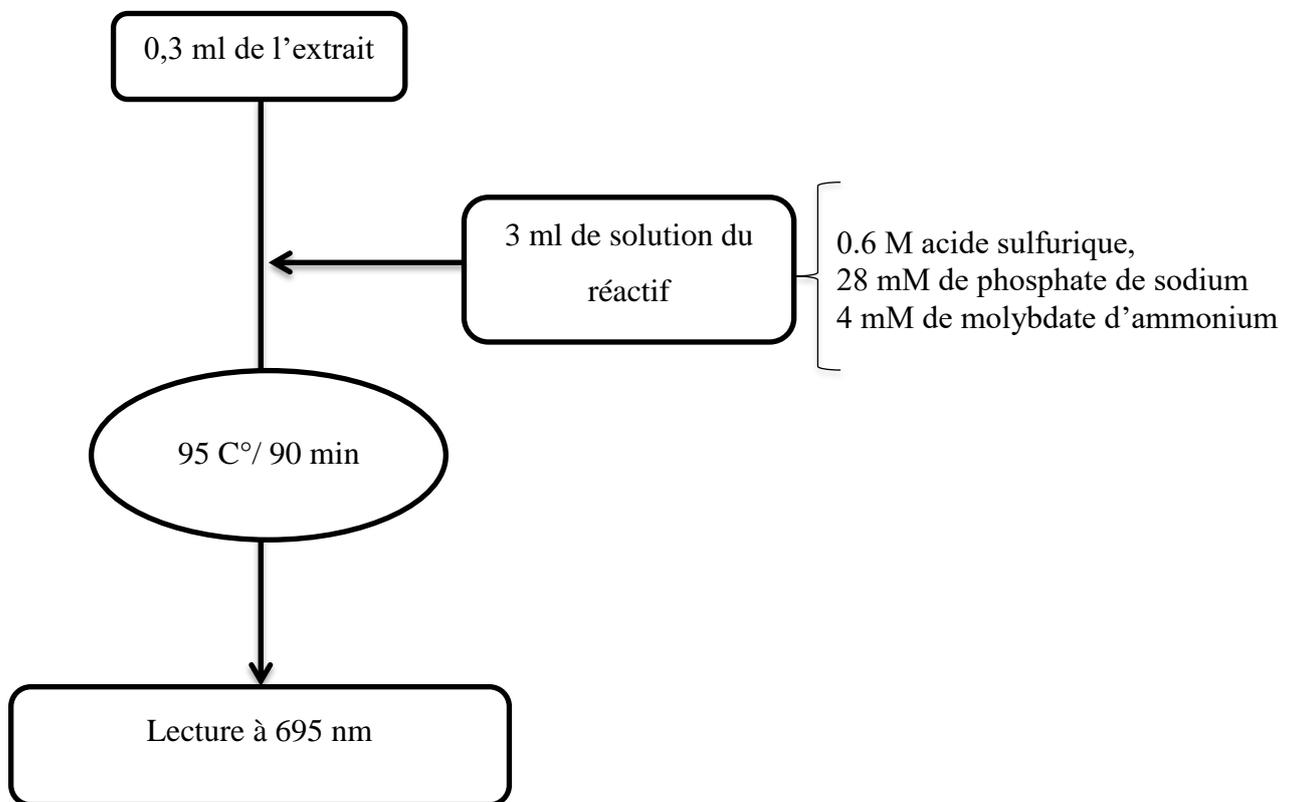
### II-3-Test de molybdate phosphate

#### Principe :

Ce test est basé sur La réduction des molybdates en Molybdène en présence des extraits en donnant une coloration verte détectable par UV à une longueur d'onde de 695nm (Prieto et al., 1999).

#### Mode opératoire :

Le test est adopté selon le protocole reporté par Prieto et al. 1999 (Figure 10).



**Figure 10 :** Protocole du Test de Molybdate Phosphate (Prieto et al., 1999).

- Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par le solvant.

### III-Test de cytotoxicité : effet hémolytique

#### Principe

Ce test permet d'évaluer la cytotoxicité des extraits alcaloïdique et éthanolique de la partie aérienne de *Fumaria agraria*, *in vitro*, sur une suspension érythrocytaire du sang humain. La récolte du sang ainsi que la manipulation sont réalisées aux sains de laboratoire d'analyse médicale de **Dr DJAMA**, Dans la région de Bejaia (**Okoko et Ere, 2012**).

Le principe repose sur une attaque membranaire des extraits a étudiés, via une hémolyse.

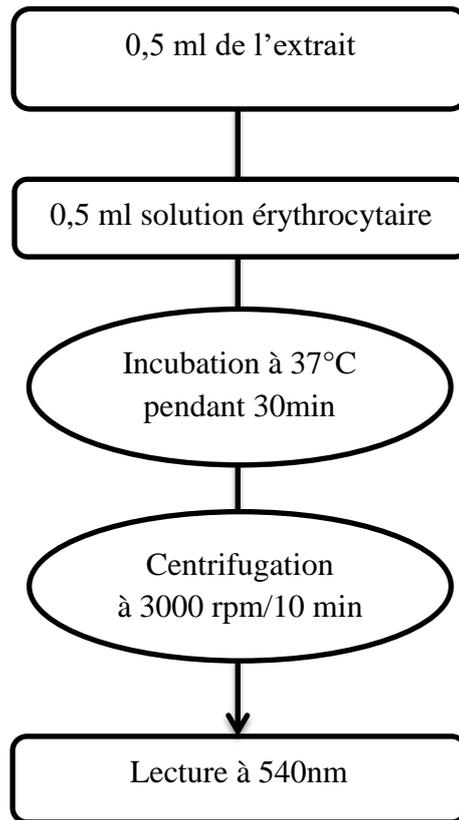
Le pourcentage d'hémolyse est proportionnel à la quantité d'hémoglobine libérée détectable à une longueur d'onde de 540nm.

#### Mode opératoire

La solution PBS a été préparée préalablement et conservé 4°C, tandis que La suspension érythrocytaire est fraîchement préparée avant toute utilisation.

- **Préparation de PBS :** la solution tampon phosphate salin (PBS) a été préparé à pH = 7.4, par l'utilisation des produits suivants : NaCl (137mM), KCl (2,7mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2mM) (**Mohan, 2006**).
- **Préparation de la suspension érythrocytaire :** le sang est collecté chez des patients sains dans des tubes héparines. Le plasma est éliminé par une centrifugation à 3000 rpm /10min. Le culot est lavé trois fois avec le PBS (pH 7.4) et solubilisé à nouveau dans le même volume ainsi que la suspension érythrocytaire obtenue est diluée à 10%.

Le test effet hémolytique des extraits de la partie aérienne de *F.agraria* a été réalisé selon la méthode décrit par **Okoko et Ere, (2012)**.



**Figure 11** : Protocole d'étude de l'effet hémolytique (Okoko et Ere, 2012).

- Témoin positive est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par H<sub>2</sub>O.
- Témoin négative est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par le PBS.

Le pourcentage d'hémolyse a été déterminé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{(DO \text{ extrait} - DO \text{ témoin négative})}{D.O \text{ témoin positive}} \times 100.$$

#### IV- Etude statistique

L'analyse statistique des résultats a été effectuée avec l'application du test de student (LOGICIEL R 3.2.5). La comparaison des résultats est prise à la probabilité  $p < 0,05$ , tous les tests in vitro représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  écartype. La corrélation entre les différents paramètres est définie par le coefficient de corrélation de Pearson.

Chapitre II :

Résultats et discussions

---

## **I-Taux d'extraction des alcaloïdes totaux : Dosage pondéral**

Le taux d'extraction des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de *Fumaria agraria* enregistré après extraction éthanolique par « Soxhlet » est de **0,65%**. Ce rendement se rapproche à celui trouvé chez la même espèce qui est de **0,7%** (**Bougoffa-Sadaoui, 2015**), et reste inférieur à celui trouvé chez la même espèce espagnole (**0,83%**) (**Suau et al., 2002**).

Cette différence quantitative peut être due à divers facteurs tels que la composition du sol, la saison végétative ainsi que la période de récolte (**Grycova et al., 2007**).

L'utilisation de l'éthanol comme solvant d'extraction de départ présente plusieurs avantages : il permet d'extraire le maximum de composés (alcaloïdes, composés phénoliques, ...etc), d'autre part il est moins altérant que le méthanol (moins toxique), il est aussi facile à éliminer (volatile) (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Notons aussi que le volume du solvant, le nombre de cycles d'extraction et le poids initial de la poudre influencent l'extraction (**Mompou et al., 1998 ; Hadj Salem, 2009**).

Afin de confirmer la fiabilité de la méthode d'extraction des alcaloïdes totaux, un échantillon a été soumis à une analyse GC-MS, par notre encadreur **M<sup>me</sup> SADAoui K.** lors d'un séjour scientifique.

Le chromatogramme ainsi que la composition de l'extrait d'alcaloïdes totaux sont reportés dans l'annexe (**Annexe II**).

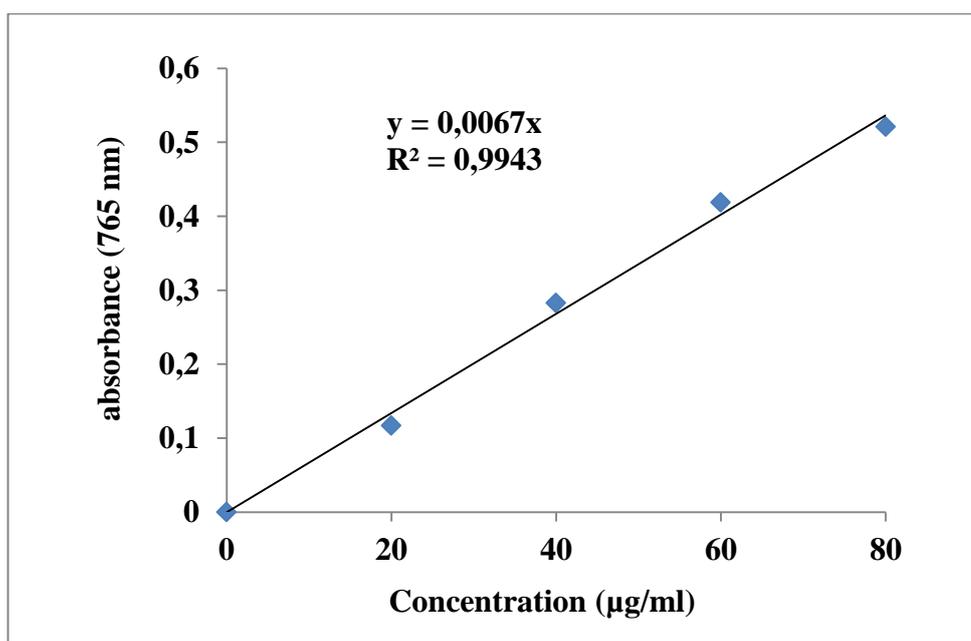
## **II-Dosage des composés phénoliques**

### **➤ Dosage polyphénols totaux**

Etant donné que dans un extrait de plante, il existe un mélange de substance absorbante 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.

Le dosage des polyphénols de la partie aérienne de notre espèce végétale estimé dans deux types d'extraction éthanolique, par « Soxhlet » et par macération, est déterminé par la méthode de Folin Ciocalteu.

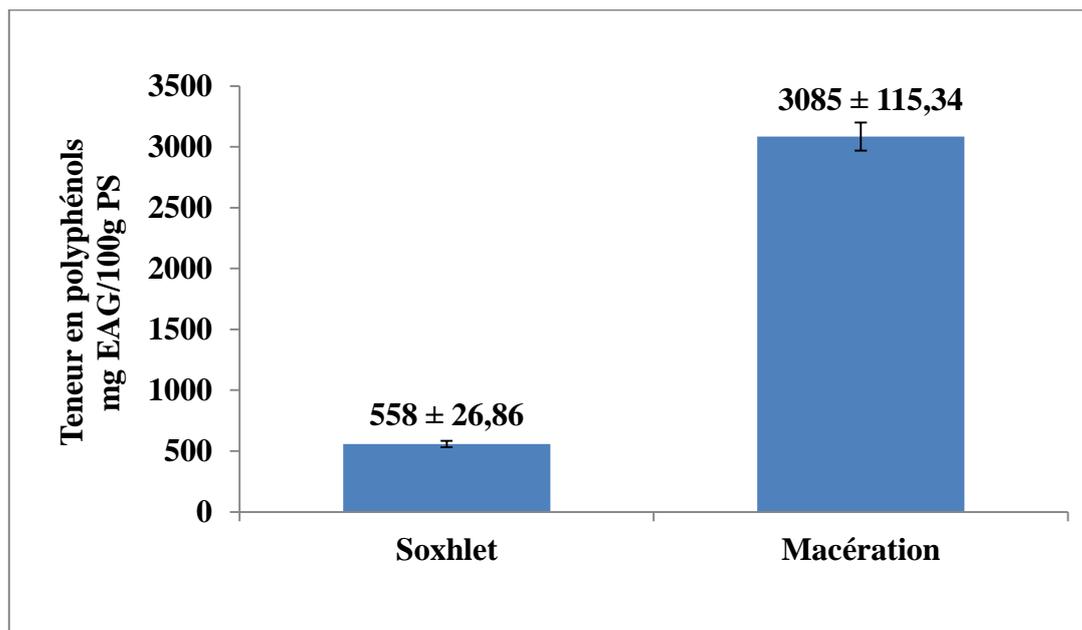
Le dosage de ces composés a été fait en se référant à une courbe d'étalonnage linéaire, utilisant l'acide gallique comme standard (**Figure 12**). La quantité de polyphénols est exprimée en « mg » équivalent d'acide gallique par « 100 g » du poudre sèche (**mg EAG/100g PS**).



**Figure 12** : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Les résultats des dosages des polyphénols sont représentés dans la figure ci-dessous (**Figure 13**). Nous constatons, que la teneur en polyphénols dans le cas de la macération est largement supérieure à celle obtenue par « Soxhlet ». Les valeurs enregistrées sont respectivement de  $3085 \pm 115,34$  (mg EAG/100g PS) et  $558 \pm 26,86$  (mg EAG /100 g PS). Ces résultats exprimant des différences statistiquement significatifs ( $p < 0,05$ ).

Cette variation peut être attribuée au phénomène de dégradation thermique, les composés phénoliques étant thermosensible, les températures élevées et les temps d'exposition plus long dans le cas d'extraction par « Soxhlet » comparant à la macération expliquent cette différence (**Vergara-Salinas et al., 2012**).



**Figure 13** : Teneur en polyphénols totaux (exprimée en mg EAG/100g PS).

Nos résultats restent meilleurs à ceux trouvés chez d'autres espèces du même genre de *Fumaria*, récoltées à la même période (mois de Mars) mais dans une région espagnole (Malaga) (Soušek et Valesova, 1999), les taux sont pour, *F.agraria* de « 2095 mg / 100g », *F.capreolata* de « 2533 mg / 100g », *F.officinalis* de « 2938 mg / 100g », *F.parviflora* de « 2037 mg / 100g » et *F.densiflora* de « 2425 mg / 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 Bhanger, 2006).

Chez le genre *Fumaria*, des études sur des échantillons récoltés pendant les mois d'Avril, Mai et Juin ont permis de confirmer l'influence de la saison sur la teneur en polyphénols (Soušek et Valesova, 1999).

Le tableau suivant (Tableau IV) nous a permis de comparer les taux en polyphénols de quelques espèces de *Fumaria* récoltées à des périodes variables (Soušek et Valesova, 1999).

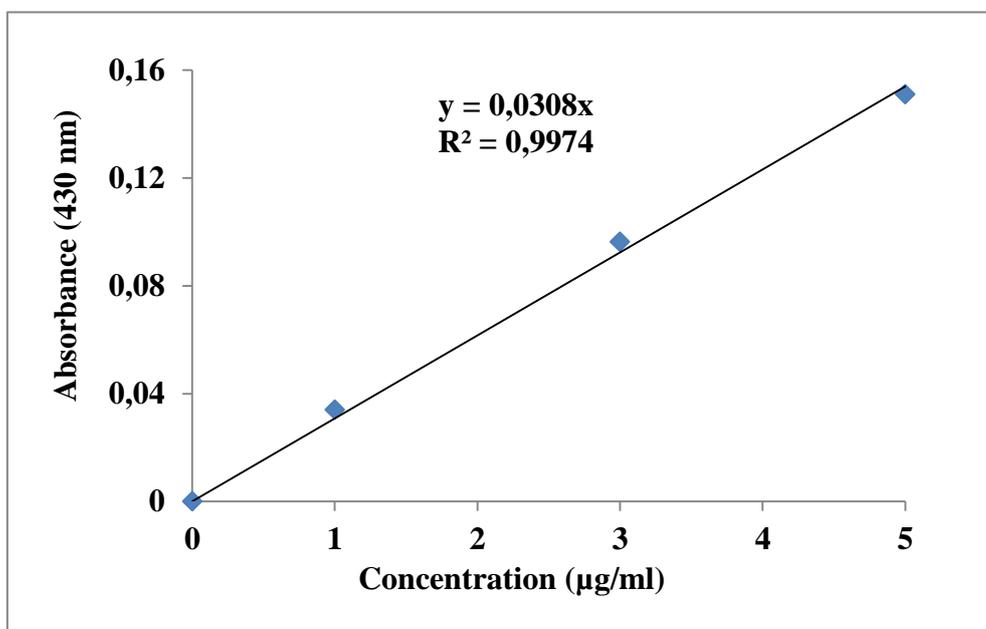
**Tableau IV** : Les taux en composés phénoliques de *Fumaria agraria* (Souseck et Valesova, 1999).

Moi de récolte	La teneur (mg E.AG/100g PS)
<i>F.agraria</i>	1884 <sup>e</sup> , 1962 <sup>f</sup>
<i>F.capreolata</i>	2143 <sup>e</sup> , 2102 <sup>f</sup>
<i>F.densiflora</i>	2539 <sup>f</sup>
<i>F.muralis</i>	5171 <sup>g</sup>
<i>F.officinalis</i>	2820 <sup>e</sup> , 2616 <sup>f</sup>
<i>F.parviflora</i>	2275 <sup>e</sup> , 2180 <sup>f</sup>
<i>F.spicata</i>	1672 <sup>g</sup>
<i>F.vaillanii</i>	2041 <sup>g</sup>

<sup>e</sup> : mois d'Avril, <sup>f</sup> : mois de Mai, <sup>g</sup> : mois de Juin.

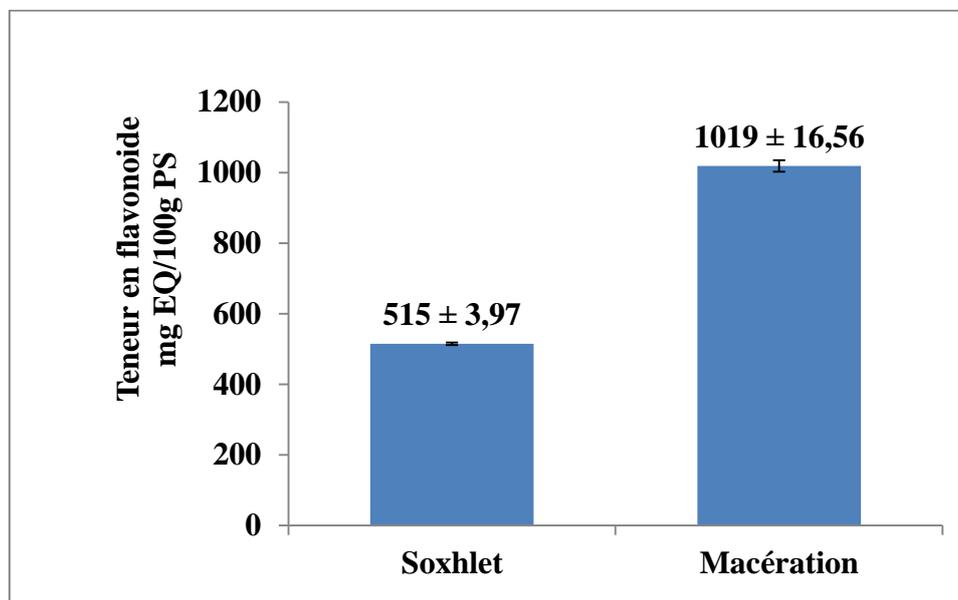
### ➤ Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été calculée en se référant à une courbe d'étalonnage linéaire, utilisant la quercétine comme standard (**Figure 14**). Cette teneur est exprimée en « mg » équivalent en quercétine par « 100 g » du poudre sèche (**mg EQ/100g PS**).



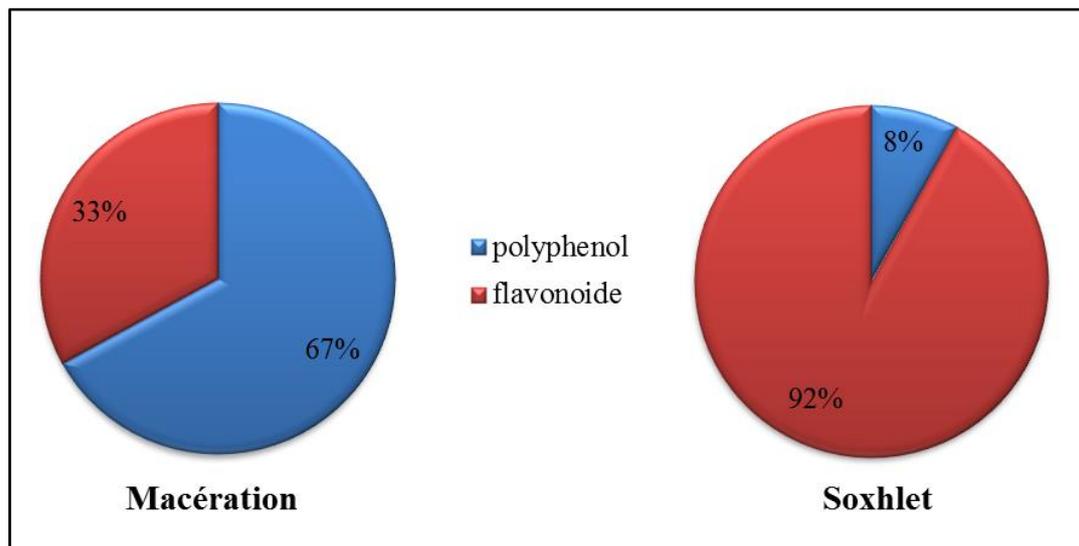
**Figure 14** : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats obtenus indiquent l'efficacité de la « macération » dans l'extraction de cette classe de métabolites secondaires comparant à l'extraction par « Soxhlet ». Les taux des flavonoïdes obtenus sont respectivement, de  $1019 \pm 16,56$  (mg EQ/100g PS) et  $515 \pm 3,97$  (mg EQ/100g PS). Cette différence est statistiquement significative ( $p < 0,05$ ).



**Figure 15 :** Teneur en flavonoïdes (exprimée en mg EQ/100g PS).

Les résultats obtenus montrent que la grande majorité des polyphénols de *F. agraria* sont des flavonoïdes, ceci dans le cas d'extraction par « Soxhlet » ( $515\text{mg}/558\text{mg}$  polyphénols totaux  $92\%$ ). Pour la macération, les flavonoïdes constituent presque  $33\%$  des composés phénoliques ( $1019\text{mg}/3085\text{mg}$  polyphénols totaux) (Figure 16). Les flavonoïdes étant une classe des polyphénols plus complexe structuralement que les phénols simple ainsi que les acides phénols, par conséquent et probablement, ces substances peuvent mieux résister aux différents facteurs thermiques (Vergara-Salinas et al., 2012).



**Figure 16 :** Teneur en flavonoïdes par rapport au taux des polyphénols.

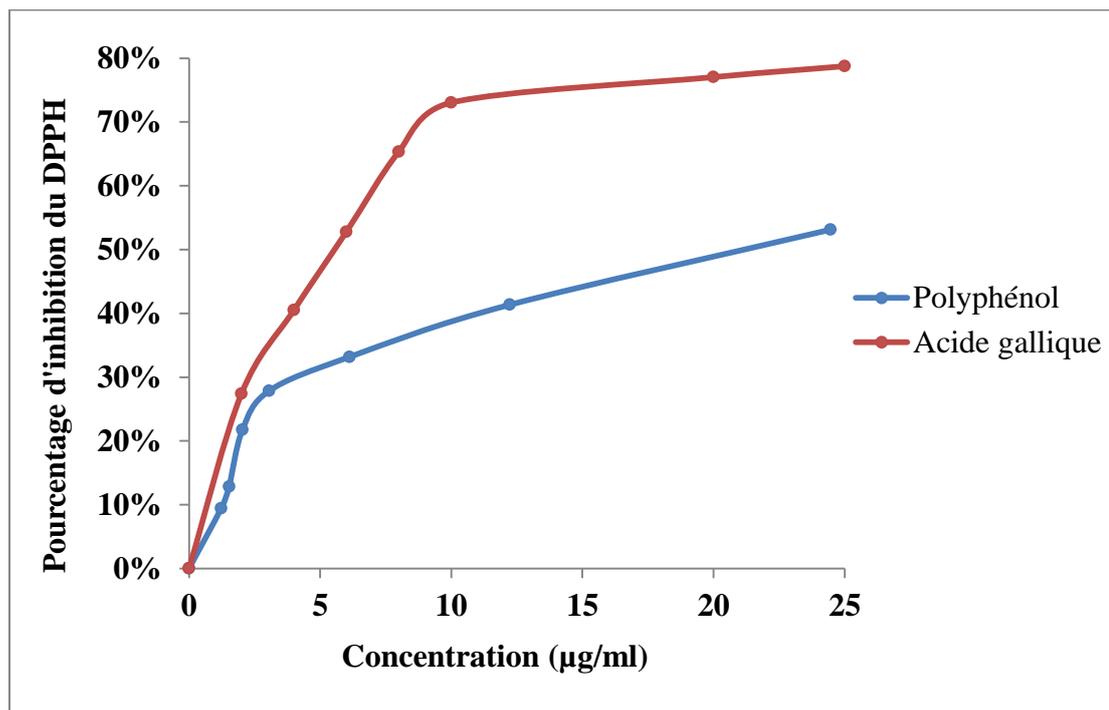
A partir de ces résultats (dosages des polyphénols et des flavonoïdes dans les deux types d'extractions notamment), seuls les extraits éthanolique issus de la macération en plus des alcaloïdes totaux seront utilisés pour l'évaluation des différentes activités étudiées.

### III-Activité antioxydante

#### III-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 (Milardovié *et al.*, 2006). La capacité à piéger ces radicaux libres est proportionnelle à la concentration de la substance antioxydante (Luis *et al.*, 2006).

Les pourcentages « scavenging » du radical DPPH de l'extrait éthanolique de *F.agraria* et de l'acide gallique (antioxydant de référence) sont représentés sur la Figures 17, tandis que ceux des alcaloïdiques totaux et de la Boldine (alcaloïde isoquinoléiques de référence) sont mentionnés sur la figure 20.



**Figure 17 :** Activité scavenging du DPPH de l'extrait éthanolique et de l'acide gallique.

L'activité anti-radicalaire de notre extrait éthanolique augmente avec la concentration de l'extrait de la partie aérienne de notre plante, dans la gamme allant de **0-25 µg/ml**.

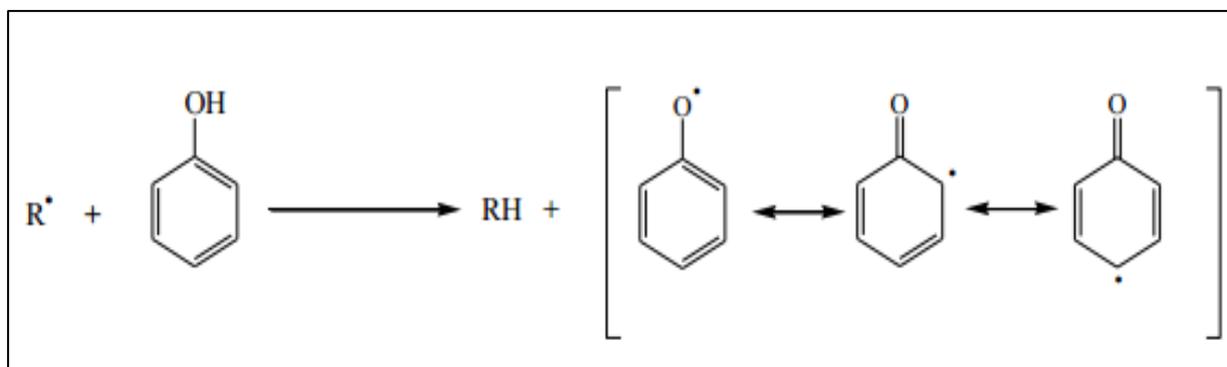
Notre extrait éthanolique contenant les composés phénoliques présente une bonne activité anti-radicalaire avec un pourcentage scavenging **53,12%** à une concentration de **25 µg/ml** ( $IC_{50} = 21 \mu\text{g/ml}$ ). Cette activité reste inférieure à celle exercée par la même concentration de l'acide gallique qui est de **83,66 %** ( $IC_{50} = 5,5 \mu\text{g/ml}$ ). Notre résultat reste supérieur à ceux trouvés par **Orhan et al. (2010)** chez les espèces *F. cilicica* (**11,99%**), *F. densiflora* (**13,27%**), *F. kralikii* (**11,25%**), et *F. parviflora* (**11,14%**).

L'activité anti radicalaire de l'extrait éthanolique peut s'expliquer par la présence et la richesse en substances actives. Selon **Dawidowicz et ses collaborateurs (2006)**, cette activité peut être attribuée à la présence d'un groupement hydroxyle, à la structure moléculaire du composé.

**Lessage Messen et al. (2001)** et **Visioli et al. (2003)** ont montré que les O-diphénols exercent une importante activité antioxydante. Selon **Mc Donald et al. (2001)** les acides hydroxycinnamique et leurs esters sont à l'origine des activités antioxydantes.

Selon **Sousek et ses collaborateurs (1999)**, *Fumaria agraria* renferme dans sa composition en acides phénoliques : l'acide caféique, l'acide commarique, l'acide ferulique, l'acide fumarique, l'acide malique et l'acide protocatechique.

Les composés phénoliques présentent une structure chimique idéale pour piéger des radicaux libres, grâce à leurs groupement « phénoliques hydroxyles » qui sont donateur d'hydrogène ou d'électron (**Figure 18**) **Boubekri (2014)**.



**Figure 18** : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques (**Boubekri, 2014**).

Les radicaux intermédiaires phénoxy produit ( $PO^\bullet$ ) sont relativement stables en raison de leur système aromatique stabilisé par la résonance. Par ailleurs, ils peuvent agir avec d'autres radicaux libres ( $R^\bullet$ ) comme des chélateurs selon la réaction suivante (**Figure 19**) (**Dai et Mumper, 2010**).

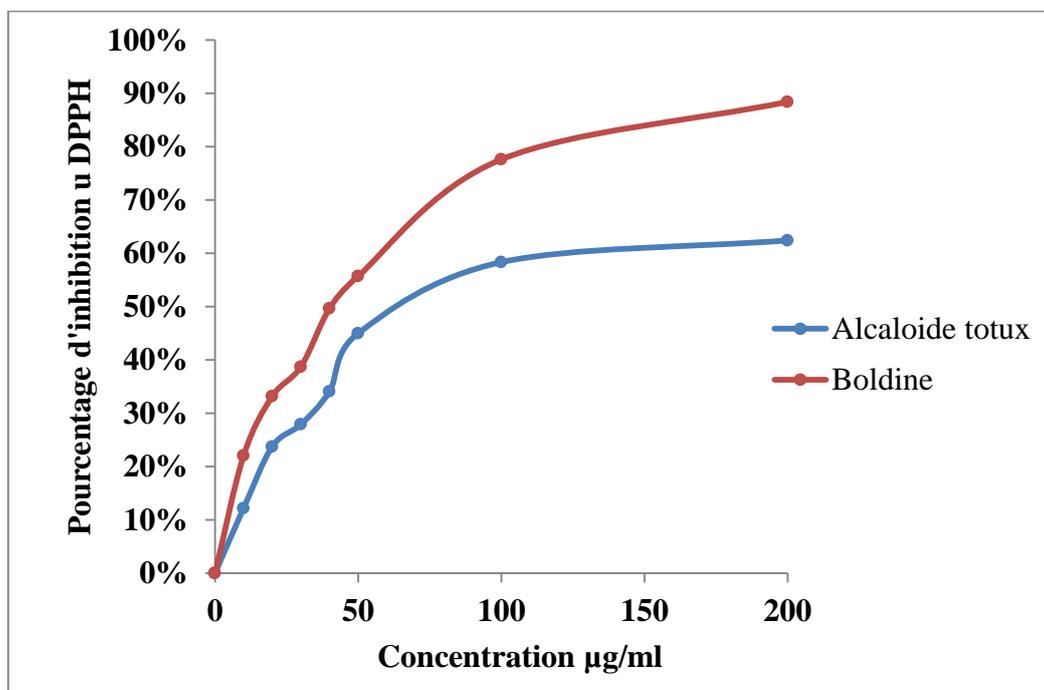


**Figure 19** : Mode d'action d'un radicaux phénoxy.

Il est important de noter qu'un extrait éthanolique des plantes ne contient pas que des polyphénols. On trouve en plus des composés phénoliques, des lipides, de la chlorophylle,...qui peuvent, peut-être, influencé négativement sur l'activité des substances antioxydantes (**Garcia Alonso et al., 2004**).

L'encombrement stérique instauré par les sucres au niveau des flavonoïdes glycosylés réduit par contre cette activité (Son et Lewis, 2002 ; Abdille et al., 2005),

Les alcaloïdes totaux de notre plante ont montré une bonne capacité à piéger le radical DPPH pour une gamme de concentration allant de 0 µg/ml à 200 µg/ml (Figure 20).



**Figure 20 :** Activité scavenging du DPPH des alcaloïdes totaux et de la boldine.

L'analyse de la figure 20 indique que les alcaloïdes de *F. agraria* présentent des pourcentages moins élevés à une concentration de 200 µg/ml (62% ± 0,02) que la boldine (88% ± 0,02). Cette différence est statistiquement comparable ( $p > 0,05$ ).

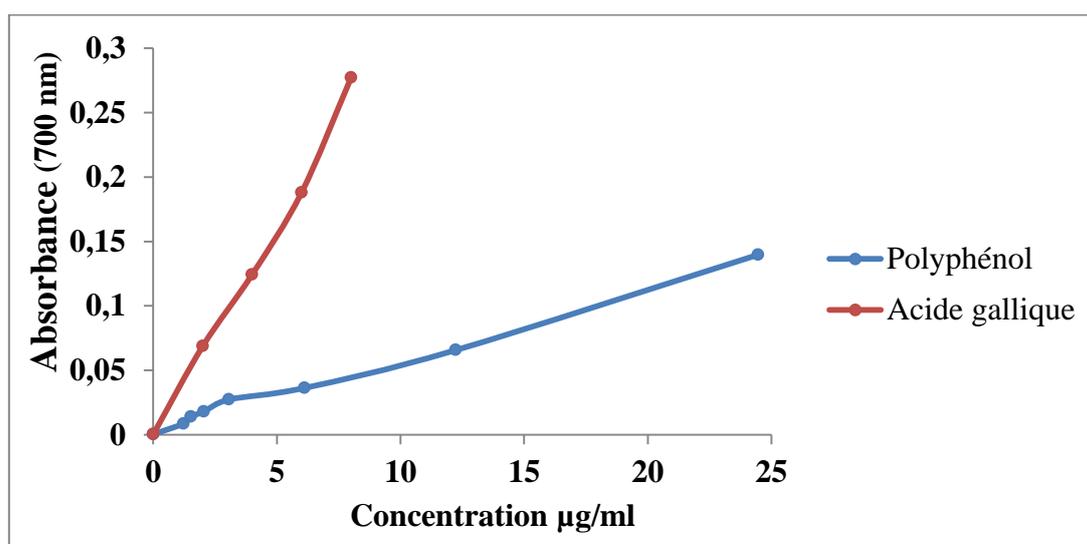
Nos résultats sont en accord avec une étude menée par Iwasa et ses collaborateurs (2001), qui ont démontré que la capacité à réduire le radical DPPH par trois groupes d'alcaloïdes isoquinoléiques (une capacité de 98% dans le cas de la N-méthyltetrahydropapaveroline qui est un alcaloïde 1-benzylisoquinoléine) est supérieure à celle de l'α-tocopherol (vitamine E) (70%) à une concentration de 250µg/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 (protopine) et spirobenzylisoquinoléines (fumariline), 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 anti-radicalaire. 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 anti-radicalaire de la molécule (**Racková et al., 2004**).

Les IC<sub>50</sub> de l'extrait éthanolique, de l'extrait des alcaloïdes totaux, de l'acide gallique et de la boldine sont respectivement de **21 µg/ml**, de **69 µg/ml** et de **5.5 µg/ml** et de **41 µg/ml**, ce qui démontre et confirme l'efficacité de L'extrait éthanolique comparant aux alcaloïdes totaux dans la neutralisation du radical DPPH.

### III-2-Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est un indicateur significatif du potentiel antioxydant d'une substance (**Wang et al., 2008**). Les résultats du pouvoir réducteur de nos extraits présentent un profil comparable à celui de l'effet anti-radicalaire. La figure 21 montre que l'extrait brut des composés phénoliques de la partie aérienne de *Fumaria agraria* exerce une bonne activité réductrice, inférieure à celle de standards, mais supérieure à celle de l'extrait alcaloïdique total (**Figure 23**). Ces résultats indiquent que le pouvoir réducteur est proportionnel aux concentrations des extraits et standards. Les coefficients de corrélation entre les absorbances des différents extraits et des standards avec leurs concentrations sont statistiquement significatifs (**p < 0,05**), ils sont d'ordre de **99,64%**, **95,77%**, **99,95%** et **99,65%** pour l'acide gallique, la boldine, les alcaloïdes totaux et l'extrait éthanolique, respectivement.

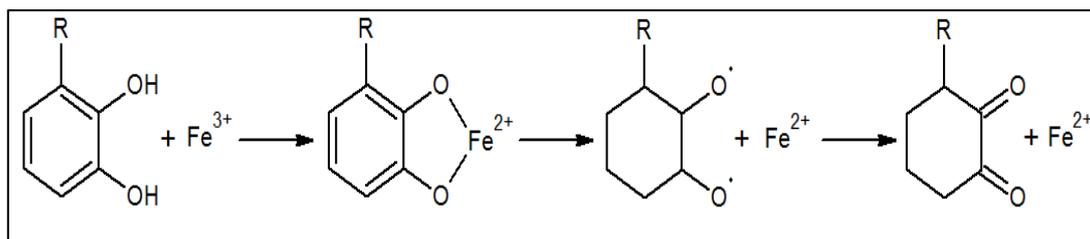


**Figure 21** : Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique et de l'acide gallique.

Les résultats obtenus confirment le potentiel antioxydant via le pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique exprimé en absorbance, à titre d'exemple, une concentration de **6µg/ml** d'extrait brut de polyphénols enregistre une activité réductrice avec une absorbance de **0,036 ± 0,02** restant inférieure à celle exercé par la même concentration en acide gallique (l'absorbance est de **0,188 ± 0,02**).

Nos résultats restent supérieurs à ceux rapportés par **Orhan et al. (2010)** employant un extrait éthanolique brut des composés phénoliques chez quatre espèces du genre *Fumaria* à savoir *F. cilicica* (**0,246 ± 0,01**), *F. densiflora* (**0,215 ± 0,01**), *F. kraklii* (**0,265 ± 0,01**), *F. parviflora* (**0,274 ± 0,02**) à une concentration de **500µg/ml**.

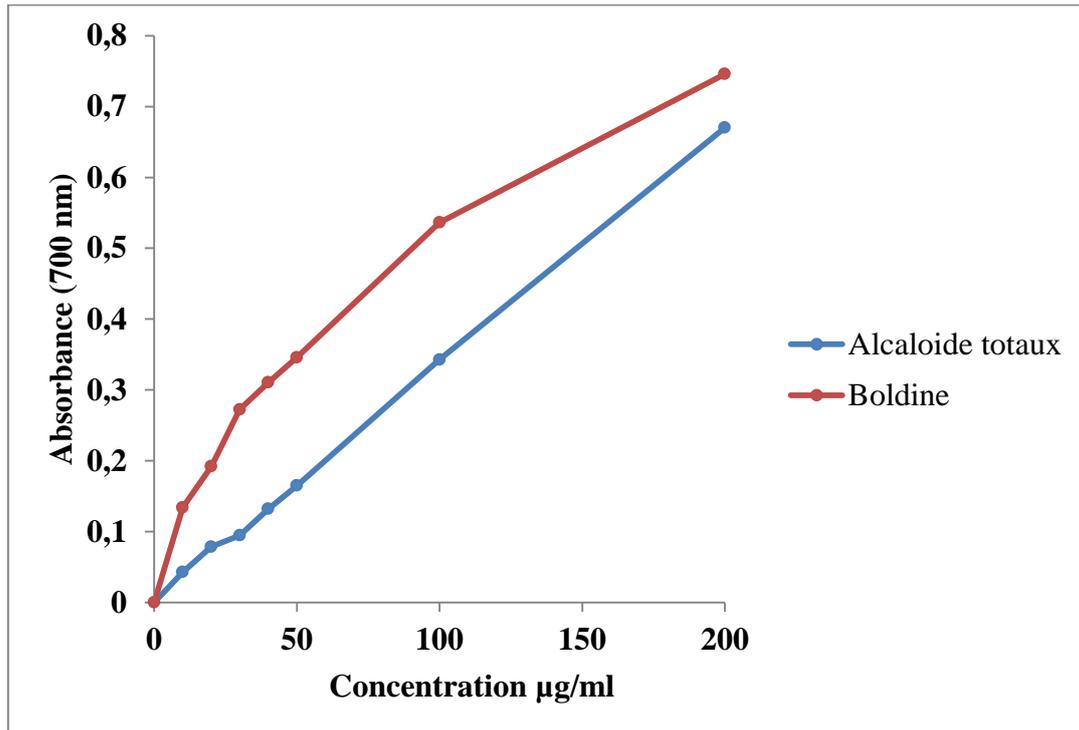
La présence des composés réducteurs dans les extraits de notre plante induit la réduction du complexe ferricyanure ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) qui réagissent comme donneurs d'électrons. L'absorbance reflétant la quantité des composés antioxydants présents dans l'échantillon testé, cette mesure permet une évaluation semi-quantitative des composés participant à la réaction réductrice (**Figure 20**) (**Tepe et al., 2007 ; Rice-Evans et al., 1995**).



**Figure 22 : Mécanisme de réduction du Fer par les polyphénols (Perron Brumaghim, 2009).**

La nature et la concentration des antioxydants contrôlent l'intensité du pouvoir réducteur, la position et le nombre de hydroxylations interviennent dans cette propriété. Selon **Mc Donald et al. (2001)**, La présence de composés *O*-diphénols (acide gallique, acide caféïque) augmente la capacité antioxydant en améliorant la stabilité du radical phenoxy.

Les résultats présentés sur la figure 23 montrent que L'extrait des alcaloïdes totaux (AT), à une concentration de **200µg/ml** exerce une bonne activité réductrice avec une absorbance de **0,67 ± 0,02**, qui reste inférieure à celle exercé par la même concentration du standard employé « la boldine » (l'absorbance = **0,75 ± 0,019**). Cette différence est statistiquement comparable (**p > 0,05**).

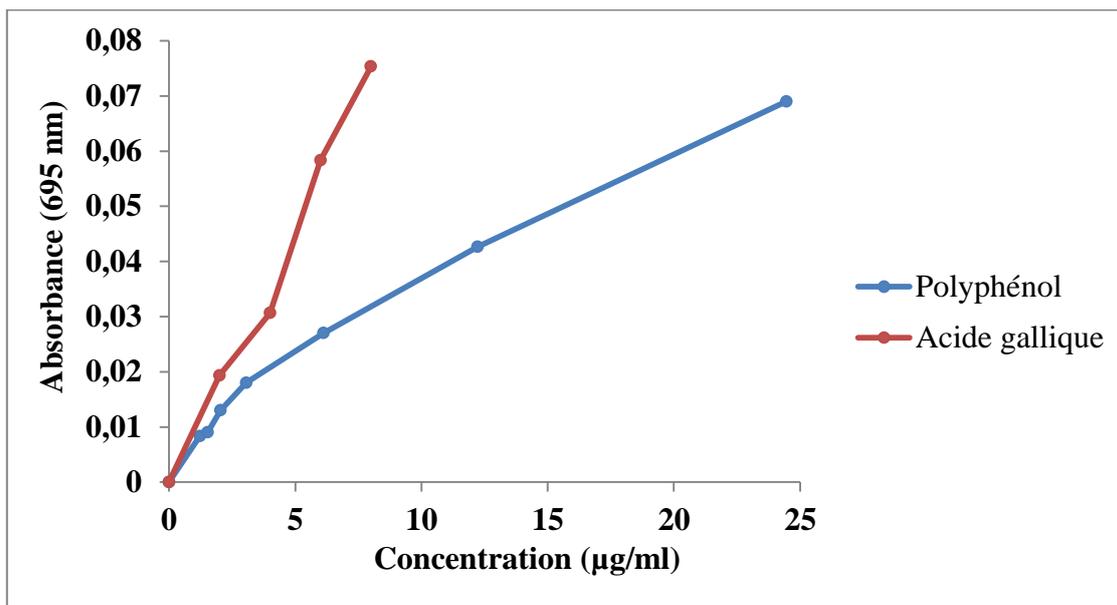


**Figure 23 :** Pouvoir réducteur des alcaloïdes totaux et de la boldine.

Les potentiels réducteurs, exprimés en absorbance, observés pour les extraits ici testés ainsi que les standards à une concentration de **10 µg/ml** se classent dans l'ordre décroissant suivant : l'acide gallique > la boldine > l'extrait éthanolique > les alcaloïdes totaux.

### III-3-Activité antioxydant totale

La capacité antioxydante totale (TAC) de nos extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène, illustrée dans les figures 24 et 25 pour les couples extrait phénolique brut / acide gallique et AT/boldine respectivement.



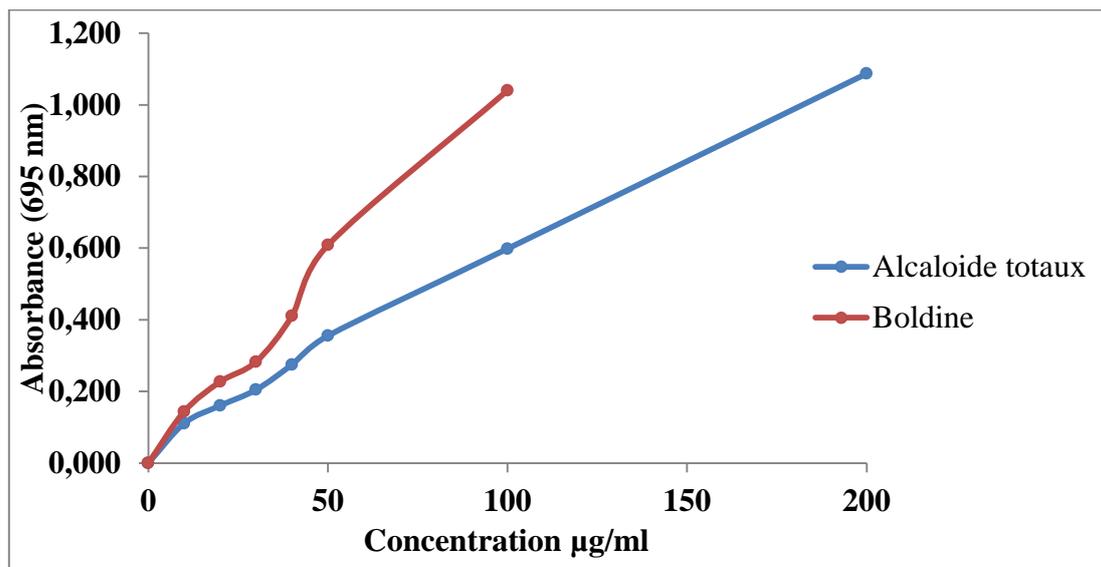
**Figure 24 :** Activité antioxydant totale de l'extrait éthanolique et de l'acide gallique.

Les résultats montrent que l'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à la concentration de standard et d'extrait éthanolique qui indique une réaction de réduction, ceci confirme que notre extrait renferme des molécules ayant une capacité réductrice donateur d'électron.

L'activité antioxydante totale de notre extrait brut contenant les polyphénols est clairement inférieure à celle du standard, pour une concentration de **6µg/ml** les absorbances enregistrées sont d'ordre **0,027 ± 0,001** et **0,058 ± 0,001** respectivement pour l'extrait et le standard.

Le coefficient de corrélation entre la teneur en polyphénols de l'extrait éthanolique et l'activité anti-oxydante (**98,60%**) est significatif (**p<0,05**), indiquant que la capacité anti-oxydante d'extrait, sont due à la contribution des composés phénoliques comme antioxydants dominants dans l'extraits. (**Tawaha et al., 2007**).

Les résultats reportés sur la figure 25 montrent que L'extrait des alcaloïdes totaux (AT), à une concentration de **100µg/ml** exerce une bonne activité avec une absorbance de **0,59 ± 0,01**, qui est nettement inférieure à celle exercé par la même concentration du standard (l'absorbance = **1,04 ± 0,09**). Cette différence est statistiquement comparable (**p > 0,05**).



**Figure 25** : Activité antioxydant totale des alcaloïdes totaux et de la boldine.

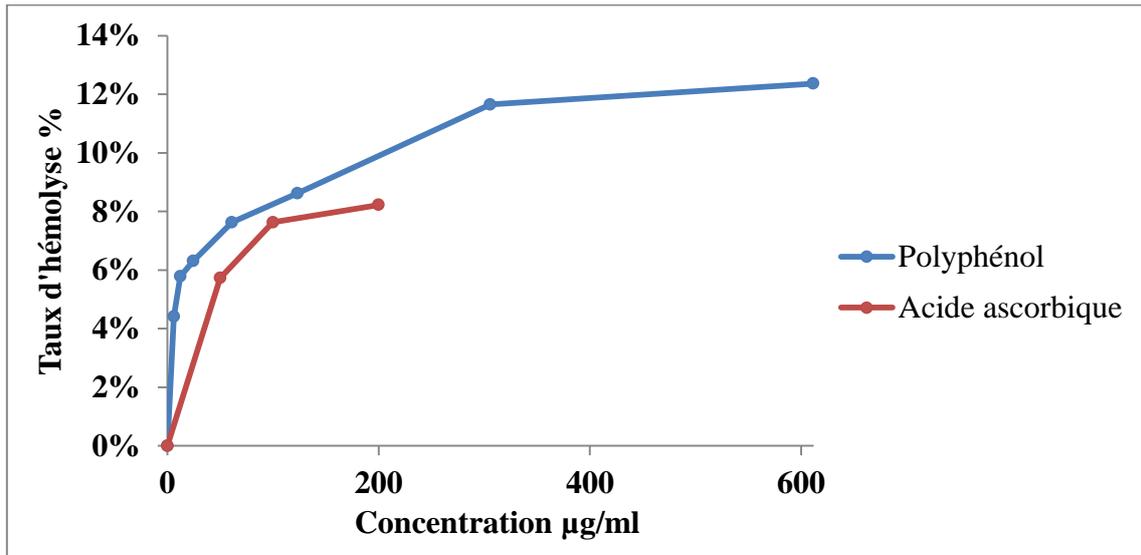
L'activité antioxydante des alcaloïdes totaux est en corrélation significative avec leur concentration, par un coefficient de **99,69%** ( $p < 0,05$ ).

L'activité antioxydante totale de notre extrait ainsi que les standards exprimé en absorbance pour une concentration de **10 µg/ml** se classent dans l'ordre décroissant comme suite : la boldine > les alcaloïdes totaux > acide gallique > l'extrait éthanolique.

#### **IV-Cytotoxicité : effet hémolytique**

Toute substance biologiquement active est susceptible, à forte ou à faible dose pour une administration prolongée, de produire des effets indésirables, voire nocifs. Les essais de toxicité comme de cytotoxicité accompagnent donc les essais d'activités biologiques.

Dans ce travail, la cytotoxicité est évaluée *in vitro*, en utilisant les érythrocytes comme modèle cellulaire, afin d'évaluer l'effet hémolytique en présence et en absence de nos extraits et standards. Les résultats enregistrés sont reportés sur les figures 26 et 27.



**Figure 26** : Effet hémolytique de l'extrait éthanolique et l'acide gallique.

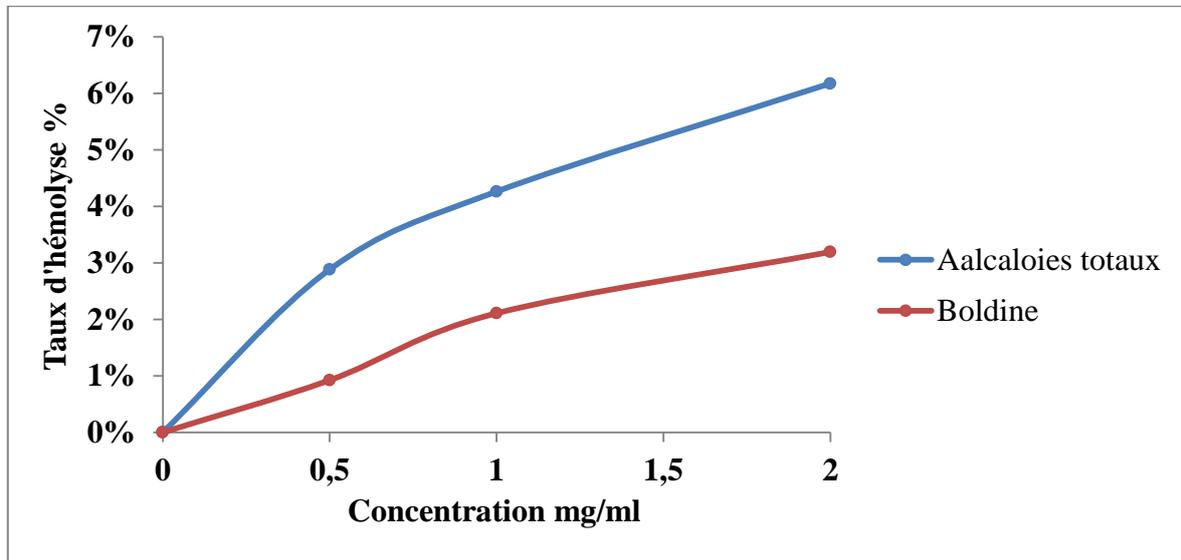
Pour une concentration de **6µg/ml** (la plus faible concentration employée) de l'extrait éthanolique contenant les polyphénols, le taux d'hémolyse provoqué est comparable à celui du témoin négatif (présence de PBS) ils sont respectivement de **4,41%** et **4,21%**. On peut conclure en premier lieu, à des concentrations allant à 6µg/ml de l'extrait éthanolique, l'effet hémolytique et donc cytotoxique est négligeable.

Pour le même extrait, une gamme de concentrations plus importante comprise entre **25µg/ml** et **600µg/ml** a été employée, les taux d'hémolyse enregistrés sont compris entre **5%** et **12%**. Cette différence est statistiquement significative (**p < 0,05**).

On comparant aux résultats obtenus avec l'acide ascorbique, à titre d'exemple une concentration de **50µg/ml** correspond à un taux hémolytique de **5,73%** (**p < 0,05**), on constate que la vitamine C reste moins néfaste que l'extrait éthanolique de notre plante.

Cet effet hémolytique de l'extrait éthanolique est probablement dû à une attaque membranaire via les protéines membranaires excré par notre extrait éthanolique, ceci a de fortes doses (**> 600µg/ml**).

Les résultats de la figure 25 montrent qu'à la plus grande concentration en alcaloïdes totaux (**2mg/ml**) le taux d'hémolyse étant faible de **6%**, et deux fois plus important que le taux hémolytique observé avec la même concentration de la boldine (**3%**). Cette différence est statistiquement comparable ( $p > 0,05$ ).



**Figure 27** : Effet hémolytique des alcaloïdes totaux et de la boldine.

Pour une gamme de concentration allant à **2mg/ml**, les alcaloïdes totaux et la boldine présentent un effet hémolytique négligeable. Ces résultats sont statistiquement significatifs ( $p < 0,05$ ).

On comparant nos résultats, l'effet hémolytique de nos extrait ainsi que les standards se classent d'ordre décroissant suivant : extrait éthanolique > l'acide ascorbique > les alcaloïdes totaux > la boldine.

## Conclusion et perspectives

---

## Conclusion et perspectives

Les métabolites secondaires, notamment les alcaloïdes et les polyphénols forment un système de défense très efficace contre les différentes agressions causées par le stress oxydant.

*Fumaria agraria*, une espèce végétale de la famille des Fumariacées a fait l'objet de notre étude afin d'évaluer son potentielle antioxydant et sa cytotoxicité.

L'extraction des composés phénoliques bruts (par macération et par Soxhlet) et des alcaloïdes totaux « AT » de la partie aérienne de notre plante, a révélé une richesse en ces métabolites. Le taux des AT enregistrés est de **0,67%**, comparable à celui trouvé chez la même espèce récoltée en 2009 (**0.7%**) (**Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**)

L'extraction par macération a montré une meilleur teneur en polyphénols et flavonoïdes avec des taux de **3085mg (EAG/100g PS)** et **1019mg (EQ/100g PS)** respectivement. Que les taux obtenus avec l'extrait du Soxhlet **558mg (EAG/100g PS)** et **515mg (EQ/100g PS)**.

L'activité antioxydante des différents extraits du *F.agraria* a été évaluée *in vitro*, par trois méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur et le Molybdate.

Pour la première méthode, les résultats révèlent que l'extrait éthanolique de *F.Agraria*, présente une activité la plus élevée avec une IC<sub>50</sub> de **21µg/ml** suivie de l'extrait alcaloïdique totaux avec une IC<sub>50</sub> de **69µg/ml**.

Le pouvoir réducteur montre aussi que l'extrait éthanolique exerce une activité réductrice plus élevées que l'extrait des AT, avec une absorbance de **0,065** et **0,042** respectivement, a une concentration de **10µg/ml**. Alors que l'activité antioxydante totale est plus importante pour les AT (l'absorbance enregistrés est de **0,111** pour une concentration de **10µg/ml**).

Le test de cytotoxicité (effet hémolytiques), réalisé *in vitro*, sur des érythrocytes isolés du sang humain incubé dans un milieu tampon PBS, en présence des différentes concentrations d'extraits AT et d'extrait éthanolique révèle que les AT sont faiblement cytotoxique avec un pourcentage de **6%** à une concentration de **2mg /ml**, comparant à

l'extrait éthanolique (une concentration de **0.61mg/ml** présente un taux d'hémolyse de **12,37%**).

La détermination de nouvelles substances bioactives naturelles peut répondre à différents problèmes de la santé et constitue une alternative ou un complément des médicaments synthétique à effet secondaire indésirable.

Une étude sur la toxicité, notamment la détermination de la  $DL_{50}$  est souhaitable avant d'entamer l'étude *in vivo*. Il est primordial de procéder à l'évaluation de la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces extraits avant l'étude de tout effet thérapeutique.

Pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant des extraits, Il serait intéressant d'approfondir cette approche sur des modèles enzymatiques et sur l'échelle *in vivo*

## Références bibliographiques

---

**Abdille, M.D.H., Singh, R.P., Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S. (2005).** Antioxidant activity of extract from *Dellenia indica* fruits. *Food chem*, (90):891-896.

**Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weill, J.A. (2004).** Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, (84): 551–562.

**Avissar, N., Whitin, J.C., Allen, P.Z. (1989).** Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem*, 2:15850-15855.

**Boissier, E. (1845).** Voyage botanique dans le midi de l'Espagne pendant l'année 1837, Enumération des plantes du royaume de Grenade. Edit Gide ET Cie, Madrid. p:18-21.

**Boubekri, C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse Doctorat. Université de Biskra. p:57-58.

**Bougoffa, K., Gontier, K., Lequart-Pillon, M., Ouadid-Ahidouch, H., Benabdesselam, F. (2015).** Characterization of isoquinolin alkaloids from *Fumaria agraria* and evaluation of their antiproliferative activity against human breast cancer cell lines. *Phytothérapie*, 14:188-195.

**Chazel, M., Chazel, L. (2012).** Découverte naturaliste des garrigues, Guide pratique. Edit Quae France. p:82.

**Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., and Lagana, A. (2011).** Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, 25:469-495.

**Dai, J., Mumper, R. J. (2010).** Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10):7313-52.

**Dausset, J. (1976).** Le complexe HLA les associations entre HLA et maladies. *Now presse med*, 5:1477-1482.

**Dawidowicz, A., Wianwoska, D., Baraniak, B. (2006).** The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT*, (39): 308-315.

**Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stoker, P., Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, (79):654-660.

**Fang, R., Houghton, P.J., Hylands, P.J. (2008).** Cytotoxic effects of compounds from *Iris tectorum* on human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 118:257-263.

**Farzana, A. (1997).** Isolation and structural studies on the chemical constituents of *Withania somnifera*, *Fumaria flabellata* and X-ray diffraction studies. Internationnels centers for chemicals science H. E. J. Research institute of chemistry, university of Karachi.

**Favier, A., (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, p:108-111.

**Finte, I.V., Weiss, F.R. (2004).** Manuel pratique de phytothérapie. Edit Vigot, Paris. p:229-230.

**Fourasté, I. (2000).** Rappel de la toxicité de quelques plantes. Revue française des laboratoires, vol 2000, Issue 323. p51-55.

**Garcia-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C et Pivas-Gonzalo, J.C. (2004).** Evaluation of antioxidant properties of fruits. *Food chem*, (84):13-18.

**Gausсен, H., Leryo, J.F., Ozendo, P. (1982).** Précis de botanique, végétaux supérieurs. 2<sup>ème</sup> Edit Masson, Paris. p:243-244.

**Gilani, A.H., Bashir, S., Janbaz, K.H., khan, A. (2005).** Pharmacological basis for the use of Fumaria indica in constipation and diarrhea. *Journal of ethnopharmacology*, (96):585-589.

**Goetz, P., Ghedira, K., Legeune, L. (2009).** Fumaria officinalis L (Fumariacées), matière médicinale pratique. *Phytothérapie*, 7:221-225.

**Grycova, L., Dostal, J., Marek, R. (2007).** Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, (68):150-175.

**Hadj Salem, J. (2009).** Extraction identification caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de Nitraria Retusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine.

**Harborne, J.B. (1998).** Phytochemical Methods : A guide to moderne techniques of plant analysis. Ed 3. Chapman & Hall. p:202-209.

**Idres, A., Madi, R. (2009).** Dictionnaire Universel Bilingue Français. Tamazight. Edition Jazz, Alger.

**Iwasa, K., Moriyasu, M., Tachibana, Y., Kim, H.S., Wataya, Y., Wiegrede, W., Bastow, F.K., Cosentino, M., Kozuka, M., Lee, H.K. (2001).** Simple isoquinoline and benzyloisoquinoline alkaloids as potential Antimicrobial, Antimalarial, Cytotoxic and Anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (9):2871-2884.

**Jolyclerc, N. (1799).** Phytologie universelle : ou Histoire naturelle et méthodique des plantes. Édit D'Hacquart, Belgique. p:81-545.

**Khartal, N ., Sokmen, M ., Tepe, B ., Daferera, D ., Polissiou, M ., Sokmen. (2007).** Investigation of the antioxidant properties of Ferula orientalis L.using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100:584-589.

**Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines: Bilan et perspectives préventives. *La Presse médicale*, 30(21):1076-1081.

**Lessage-Messen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J.C., Lorqum, J., Delattre, M., Simon, J.L., Asther, M., Labat, M. (2001).** Simple phenolic content in olive oil residue as function of extraction systems. *Food chem*, (75):501-507.

**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):411-420.

**Luis, C.J, Valdés, F, Martin, R, Carmona, A.J, Diaz, G.J. (2006).** DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Acnitem napellus sp.lusitanicum*. *Fitoterapia*, (77):469-471.

**Maiza-Benabdesselam,, F., Khamtache, S., Bougoffa, K. (2007).** Antioxidant activities of alkaloid extracts of two Algerian species of *Fumaria*: *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardi*. *Rec.Nat.Prod*, 1(2-3):28-35.

**Marles, R., Fransworth, N. (1996).** Antidiabetic plants and their active constituents. *Prot. J Bot Med*, 1(3):85-135.

**Martinez-Cayuela, M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*, 77:147-161.

**McDonald, S., Prenzler. P.D., Antolovich, M., Robards, K. (2001).** Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chem*, (73):73-84.

**Mohan, C., (2006).** Buffers A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. *EMD, San Diego, California, Calbiochem*, p:22.

**Milardovic, S., Ivekovic, D., Grabaric, B.S. (2006).** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, (68):175-180.

**Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarim. *J.Sci.Technol*, 26 (2):211-219.

**Mompou, B., Lemanie, B., Surbled, M. (1998).** Extraction des polyphénols du laboratoire à la production industrielle .In : Polyphénols 96. Edition INRA, p:31-43.

**Okoko, T., Ere, D. (2012).** Antioxydant activities of *Solenostemon monostachyus* leaf extract using in vitro methods. *Scientific research and essays*, 7(6):621-626.

**Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M.I., Khaldi, A. (2004).** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Jornal of Ethnopharmacology*, (91):57-60.

**Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine,. 44:307-315.

**Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009).** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine Cell Longevity*, 2:270-278.

**Pérez-Gutiérrez, M.A., Romero-García, A.T., Salinas, M.J., Blanca, G., Fernández, M.C., Suárez-Santiago, V.N. (2012).** Phylogeny of the tribe fumarieae (papaveraceae s.l.) based on chloroplast and nuclear dna sequences: evolutionary and biogeographic implications. *American Journal of Botany*, 99(3):517–528.

**Perron, N. R., Brumaghim, J. L. (2009).** A Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell. Biochem. Biophys*, 53:75–100.

**Pincemail, J. (1998).** Espèces oxygénées en médecine humaine: une approche didactique. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*, 3:133–8.

**Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme.*, 16:233-239.

**Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, (269):337-341.

**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):4709-4715.

**Rate, S.M.K. (2001).** Plants as source of drugs. *Toxicon*. 39:603-13.

**Ribereau-Gayon, P. (1968).** Notion générales sur les composés phénoliques .In «Les composés phénoliques des végétaux » .Ed : Dunod. 1-27.

**Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4):375-383.

**Robak, J., Gryglewski, R.J. (1988).** Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemistry and Pharmacology*, 37:837-841.

**Sener, B. (2002).** Molecular diversity in the alkaloids of Turkish Fumaria L. species. *Acta Pharm Turc*, 44:205–12.

**Shahid I, Bhangar M.I. (2006).** Effect of seaso and production location on antioxidant activity if Moringa oleifera leveaes growing in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis*, (19):544-551.

**Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K., I.S., Punitha, R. (2006).** In vitro antioxidant studies on the Benzyl tetra isoquinoline alkaloids. *Biol.Pharm.Bull*, 29 (9):1906-1910.

**Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152-178.

**Son, S., Lewis, B.A. (2002).** Free radical scavenging and antioxydative activity of caffeic acid amide and ester analogues Structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (50):408-472.

**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):263-265.

**Souseck, K.J., Valesova, M. (1999).** Chemical components of genus *Fumaria*. *Phytochemical Analysis*, (89): 489-500.

**Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., Elimat, T. (2007).** Antioxidant activity and totalphenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104: 1372–1378.

**Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H. A., Aydin, E. (2007).** Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.). *Bornm. Food Chemistry*, 100(3): 985-989.

**Touami, C. (2017).** Examen phytochimique et Pouvoirantimicrobien et anti-radicalaire des extraits de *Nepeta amethystina* (Gouzia)de la région d'Aïn Sefra (Algérie). Thèse de doctorat. Université Tlemcen.

**Valko, M., Rhodes, B., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160:1-40.

**Vergara-Salinas, J.R., Jara Pérez, J., Josep lluis, T., Agosin, E., José Pérez-Correa, R. (2012).** Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). *Agricultural and Food Chemistry*, 60:10920–10929.

**Viala, A., botta, A. (2007).** Toxicologie. Lavoisier. 2<sup>eme</sup> Ed. Tec & Doc, France p:54.

**Visioli, F., Garuso, D ., Galli, C.,Viappiani, S ., Galli, G .,Sala, A.(2003).** Olive oils rich in Natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem.biophys.Res.commun*, 278(3):779-799.

**Wang, H., Zhoo, M., Yang, B., Jiang, Y., Rao, G. (2008).** Identification of polyphenols in Labacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food chemistry*, (107):1399-1406.

**Xu, J.J., Diaz, D., O'brien, P.J. (2004).** Appilication of cytotoxicité assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of humain hepatotoxicity potential. *Chimico-biological interaction*, 150(1):115-128.

**Zerargui, F. (2015).** Activité antioxydant des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif. p:77.

## **Annexe I : Appareils et réactifs**

### **Appareils**

Ampoule a décanté

Balance de précision RADWAG(AS 220/C/2)

Barreaux magnétiques

Bain-marie MEMMERT

Béchers.

Broyeur KILA Labortechnik M20

Centrifugation

Eprouvettes graduées.

Etuve BINDER

Fioles.

Micropipette

PH metre WTWPH 422

Rotavapore HEIDOLP

Soxhlet

Spatule méttalique

Spectrophotométrie

Tamiseur Retsch

Tubes à essai.

Vortex VELP

### **Produit**

Ethanol ( $C_2H_6O$ )

Ether de pétrole

Eau distillé ( $H_2O$ )

Acide chlorhydrique ( $HCL$ )

Ammoniaque ( $NH_4OH$ )

Dichlorométhane ( $CH_2Cl_2$ )

Di-methyl sulf-oxyde  $C_2H_6OS$

DppH ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ )

Follin ciocalteu

Carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ )

Acide gallique (**C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>**)

Chlorure d'aluminium (**AlCl<sub>3</sub>**)

Quercetine (**C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>**)

Tampon phosphate (**pH = 6.6, M = 0.2**)

Ferricyanure de potassium (**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>**)

Acide chloroacétique (**C<sub>2</sub>HClO<sub>2</sub>**)

Chlorure ferrique (**FeCl<sub>3</sub>**)

Molybdate d'aluminium (**Al<sub>2</sub>(MoO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>**)

Phosphate de sodium (**Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**)

Acide sulfurique (**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**)

Acide ascorbique (**C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>**)

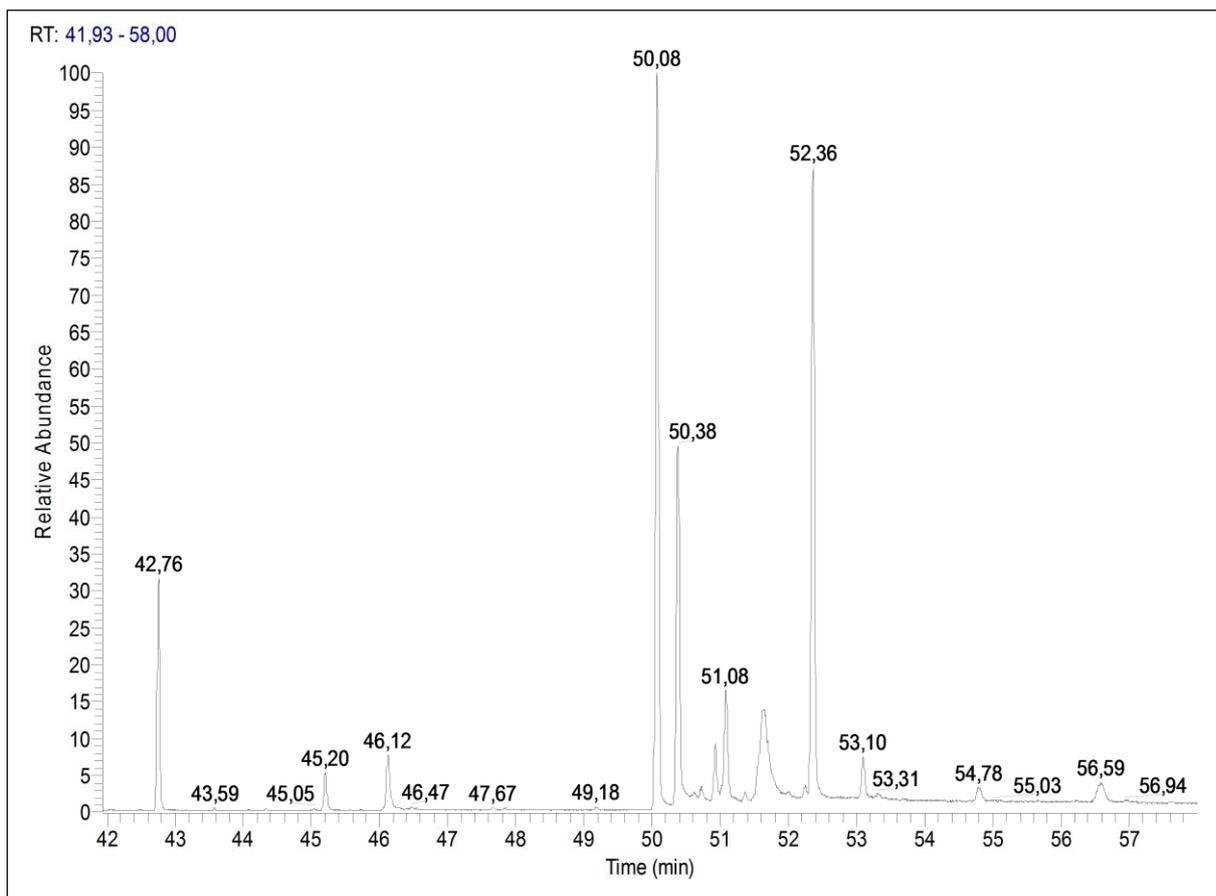
Chlorure de sodium (**NaCl**)

Chlorure de potassium (**KCl**)

hydrogénophosphate de sodium (**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**)

Di hydrogéphosphate de potassium (**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**)

## Annexe II : Résultat d'analyse par GC-MS



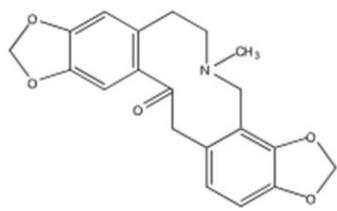
**Figure 1** : Chromatogramme GC-MS de l'extrait alcaloïdique total de la partie aérienne de *Fumaria agraria*

**Tableau I** : Les alcaloïdes isoquinoléiques identifiés dans l'extrait alcaloïdique total de la partie aérienne de *F. agraria*

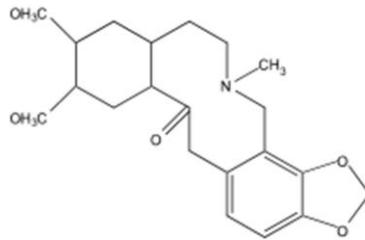
Alcaloïde ( <i>tR</i> min)	Ei-MS m/z (Intensité relative %)	Formule chimique	Abondance relative (% en protopine)*
<b>Salutaridinol (45.2)</b>	329 (100), 314 (70)	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	5.75
<b>Salutaridine (46.12)</b>	327 (100), 312 (80)	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	20.72
<b>Stylopine (50.07)</b>	148(100), 323(20), 322(15)	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	201.53
<b>Protopine (50.38)</b>	148(100)	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	100
<b>Cryptopine (50.83)</b>	148 (100), 369(20)	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	0.07
<b>Cheilanthifoline (50.93)</b>	148 (100), 325 (50)	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	24.86
<b>NI (51.00)</b>	327 (100), 310(40)	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	0.07
<b>Bulbocapnine (51.08)</b>	325 (100), 310 (85)	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	6.77
<b>Dihydrofumariline (51.25)</b>	190(100), 338(40), 353(20)	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	51.95
<b>Adlumine (51.36)</b>	206(100)	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>6</sub>	3.22
<b>Parfumidine (51.53)</b>	338(100), 367(70)	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub>	3.4
<b>Fumaritine (51.77)</b>	192(100), 340(25)	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub>	4.37
<b>Dihydrosanguinarine (52.23)</b>	332(100), 333(80)	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	2.14
<b>Fumariline (52.36)</b>	322(100)	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	161.16
<b>NI (53.09)</b>	324(100), 353(35)	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	30.23
<b>Bicuculine (53.29)</b>	190(100)	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub>	0.3
<b>Parfumine (53.83)</b>	324(100), 353(45), 338(30)	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	0.3
<b>Fumarophycine (56.82)</b>	322(100), 337(100)	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	0.2

*NI* : non identifié ; *tR* : temps de rétention

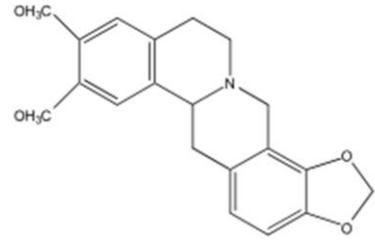
\* : Abondance relative calculée à partir des surfaces des pics dans le chromatogramme obtenu en courant ionique total par rapport à 100% de protopine.



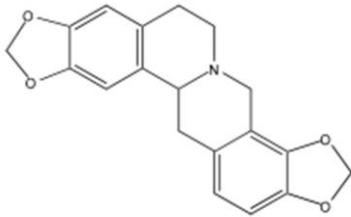
Protopine



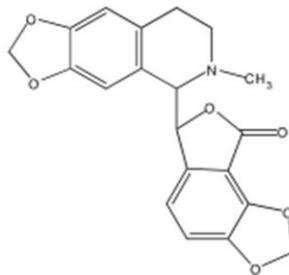
Bicuculline



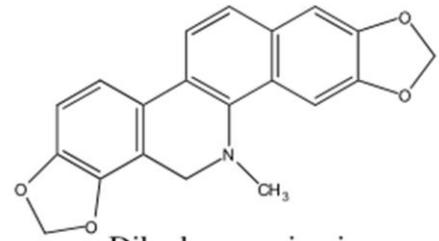
Adlumine



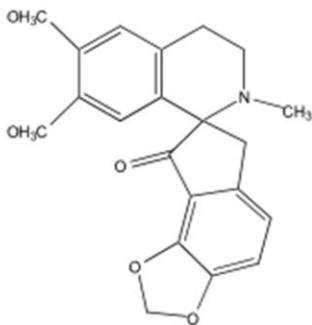
Stylophine



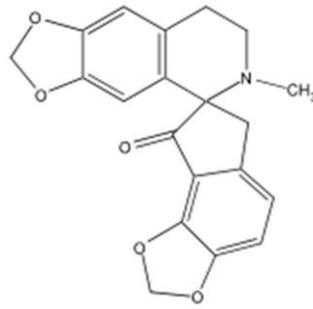
Cryptopine



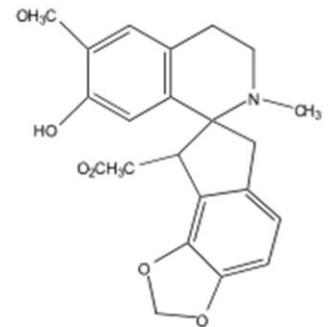
Dihydrosanguinarine



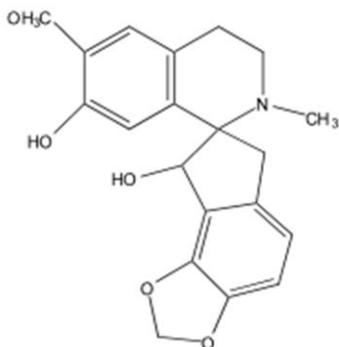
Parfumine



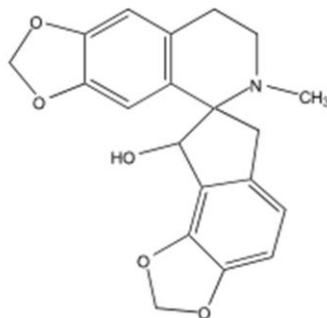
Fumariline



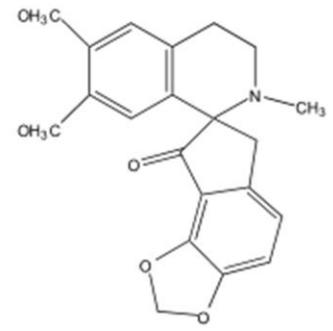
Fumarophycine



Fumaritine



Dihydrofumariline



Parfumidine

**Figure 2** : Structure chimique de quelques alcaloïdes isoquinoléines identifiés dans la partie aérienne d *Fumaria agraria*

## Glossaire médicale

**Anti hypertensive** : médicament utilisé pour traiter hypertension artérielle

**Laxative** : des médicaments ou des préparations purgatives douces qui agissent sans irriter l'intestin.

**Diurétique** : terme caractérisant de façon générale ce qui augmente la sécrétion urinaire.

**Anti-malarial** : médicament utilisé pour lutter contre le malaria (paludisme).

**Antimicrobiens** : médicament utilisé pour traiter des maladies microbiennes.

**Diurétique** : terme caractérisant de façon générale ce qui augmente la sécrétion urinaire.

**Cancer** : une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire (tumeur) anormalement importante au sein d'un tissu normal

**Cataracte** : un trouble de la vision qui survient lorsque le cristallin d'œil perd de sa transparence

**Sclérose latérale amyotrophique** : maladie neurodégénérative motoneurones du cortex cérébral caractérisée par une paralysie musculaire progressive

**Œdème pulmonaire** : une accumulation de liquide dans les alvéoles pulmonaires

**Antifongique** : médicament actif contre les champignons.

**Anticancéreuse** : médicament utilisé pour traiter le cancer

**Antipyrétique** : médicament utilisé pour traiter la fièvre

## Résumé

*Fumaria agraria* est une plante de la famille des Fumariacées, largement rependue en Algérie. Leurs multiples effets pharmacologiques sont dus à leur richesse en substances actives notamment en alcaloïdes isoquinoléique. Nous nous sommes intéressés d'une part au dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes), ainsi qu'à l'extraction des alcaloïdes totaux. D'autre part une étude de l'activité antioxydante (effet scavenger du radical DPPH, le pouvoir réducteur, effet et l'activité antioxydante totale) et de la cytotoxicité de ces extraits ont été évaluées. L'extrait éthanolique de la macération semble être plus riche en polyphénols/flavonoïdes que son synonyme reçu d'une extraction par Soxhlet (**3085mg/558mg** et **1019mg/515mg** respectivement). Les alcaloïdes présentaient un taux pondéral de **0,67%**. Suite à cette richesse, l'extrait éthanolique de la macération (**EEM**) présente les plus grandes activités que l'extrait alcaloïdique total (**AT**). L'EEM présente un effet scavenger du radical DPPH (**IC<sub>50</sub>=21µg/ml**), plus important que celui des AT (**IC<sub>50</sub>=70µg/ml**). De même pour les tests du pouvoir réducteur. Le test d'hémolyse réalisé par la méthode spectrophotométrique a montré que l'extrait éthanolique est plus cytotoxique que les alcaloïdes totaux avec un taux hémolyse **12%** à une concentration de **600µg/ml** et **6%** pour une concentration de **2mg** respectivement.

**Mots clés :** *Fumaria agraria*, activité antioxydante, alcaloïdes isoquinoléines, composés phénoliques, cytotoxicité.

### Abstract :

*Fumaria agraria* is a plant of the Fumariaceae family, widely spread in Algeria. Their multiple pharmacological effects are due to their richness in active substances, in particular isoquinoline alkaloids. We focused on the determination of phenolic compounds (total polyphenols and flavonoids) and the extraction of total alkaloids. On the other hand, a study of the antioxidant activity (scavenger effect of the DPPH radical, reducing power, effect and total antioxidant activity) and the cytotoxicity of these extracts were evaluated. The ethanolic extract of maceration appears to be richer with polyphenols / flavonoids than its synonym received from soxhlet extraction (**3085mg / 558mg and 1019mg / 515mg** respectively). The alkaloids had a weight ratio of **0.67%**. Following this richness, the ethanolic extract of the maceration (**EEM**) presents the greatest activities that the total alkaloid extract (**AT**). The **EEM** showed a scavenger effect of the DPPH radical (**IC<sub>50</sub> = 21 µg / ml**), which is greater than that of the **AT** (**IC<sub>50</sub> = 70 µg / ml**). The same applies to the tests of reducing power. The hemolysis test carried out by the spectrophotometric method showed that the ethanolic extract is more cytotoxic than the total alkaloids with a hemolysis rate of **12%** at a concentration of **600 µg / ml** and **6%** at a concentration of **2 mg**.

**Keywords :** *Fumaria agraria*, antioxidant activity, isoquinoline alkaloids, phenolic compounds, cytotoxicity.

### ملخص:

فوماريا أغراريا من فصيلة فومارياسية، واسعة الانتشار في الجزائر. تتميز بخصائص صيدلانية معتبرة نظرا لغناها بالمركبات النشطة خاصة المركبات العضوية الإلكيدية الإيزوكلينيكية. تطرقنا من خلال دراستنا هذه إلى التقدير الكمي و النوعي (المتعدد الفينول، فلافونويد) من جهة و إلى استخلاص و تعيين المادة الألكيدية الكلية، و من جهة أخرى إلى تقييم نشاط هذه المركبات المضادة للأكسدة (قوة تثبيط الجذر الحر DPPH، قوة إرجاع الحديد و قوة إرجاع الموليبيدات) إضافة إلى السُمومية التي تمت دراستها. يظهر مستخلص الفينول من النقع أكثر في مادة البوليفينول / فلافونيدات مرادف تلقي استخراج سوكليت (**3085mg/558mg, 1019/515mg** على التوالي)، المواد الألكيدية الكلية له نسبة وزن **0,67%**، بعد هذه الثروة، واستخراج الإيثانول من النقع (**EMM**) لديه أكبر الأنشطة من استخراج لألكيدية الكلية، و **EMM** له قوة تثبيط الجذر الحر (**IC<sub>50</sub>=21µg/ml**) أكبر من الألكيدية الكلية (**IC<sub>50</sub>=70µg/ml**) و بالمثل لاختبار قوة إرجاع الحديد. أظهر اختبار انحلال الدم الذي يؤدي بطريقة الطيف أن مستخلص الإيثانول هو الأكثر سُمومية للخلايا من الألكيدية الكلية مع نسبة انحلال الدم بنسبة **12%** بتركيز **600µg/ml** و **6%** في تركيز **2mg** على التوالي.

**الكلمات المفتاحية:** فوماريا أغراريا، النشاط المضاد للأكسدة، الألكيدية الإيزوكلينيكية، متعدد الفينول، سمية الخلايا (السُمومية)