

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministre de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia

Faculté des Science de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Pharmacologie-toxicologie

Thème

**Étude du pouvoir conservateur d'extrait
brut d'acides phénols et des alcaloïdes de
Fumaria agraria ; Caractérisation par
GC-MS des acides phénols**

Présenté par :

BERRAHOU née LADGHAM-CHICOUCHE Khalissa

BOUSSAFI Amirouche

Devant les membres de jury :

M^{me} BEDJOU F.	Professeur , Université de Bejaia	Présidente
M^{elle} REMILA S.	MCB , Université de Bejaia	Examinatrice
M^{me} SADAOUI K.	MCB , Université de Bejaia	Promotrice

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Nos remerciements vont au

Dr BOUGOFFA-SADAoui Khalida,

qui a initié notre étude, son contrat nous a permis d'apprécier son sérieux, sa compétence et aussi sa disponibilité malgré ces obligations professionnelles,.... Ses encouragements ont été à l'origine de nos connaissances acquises. qu'elle soit aussi remerciée pour sa gentillesse et de nous avoir permis de travailler dans un cadre agréable.

Nos remerciements vont aussi aux membres du jury, **Professeur BEDJOU F.** d'avoir accepté de présider le jury et qui représente l'élite de notre université, veuillez trouver nous témoignage et profonde gratitude.

Nos remerciements aussi pour **M^{elle} REMILA S.** d'avoir accepté de juger et d'enrichir notre étude.

Les remerciements à nos chers professeurs de Master I et Master II, pour la transmission de leur savoir, en particulier: **Pr Bedjou, Mr Harfi, Mr Hammoum, Mme Sadaoui, Mme Abderrahim, Mme Amir, Mme Kara, Mr Belkacem, Mme Zemouri, Mme Rahmani et Mme Baazizi**

On tient aussi à remercier le personnel du département de **Biologie Physico-Chimique** pour leur hospitalité: **Melle AIT ALI, Melle Ayouni, Melle Kherraz, Mme Bouabida, Melle Tabti.**

Et enfin nos remerciements et reconnaissance à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à notre étude.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

À la mémoire de mon Père

À ma Mère que dieu lui prête longue vie

À mon mari Fathi et mon fils Rayan

À mes frères: Kamel, Lahcen et Zakaria

À mes sœurs: Nadia, Samira, Latifa et ma petite sœur adoré Salima

À Mme Sadaoui Khalida qui n'a pas ménager ces efforts pour nous aidé

À tous nos camarades de la promotion Pharmacologie-Toxicologie 2017/2018

Berrahou Khalissa
née Ladgham-Chicouche

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Glossaire médical

Introduction01

Partie théorique

Synthèse bibliographique

I. Les substances bioactives.....	03
I .1.Les composées phénoliques	03
I .2. Les alcaloïdes.....	04
II. Les Fumariacées	05
III. Le Brunissement des aliments.....	06
IV .La Peroxydase végétal	07
V. Inhibition du brunissement enzymatique.....	10
VI . Additifs alimentaire et danger.....	10

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel	13
I.1.1. Matériel végétal.....	13
I.2. Méthodes.....	15
I.2.1.Séchage &broyage.....	15
I.2.2.Extraction des substances bioactive.....	15
I.2.3.Taux d'extraction.....	19
I.2.4.caractérisation de l'extrait brut des acides phénols par GCMS	19
I.2.5.Evaluation de l'effet des extraits de <i>F.agrarias</i> sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la peroxydase.....	22

I.2.6. Etude statistique.....	24
-------------------------------	----

II. Résultats & discussion

II.1 Dosage massique des alcaloïdes totaux et des fractions alcaloïdiques de la partie aérienne de <i>F. agraria</i>	25
--	----

II.2. Caractérisation par GCMS des acides phénols de la partie aérienne de <i>F. agraria</i>	26
--	----

II.3. Mesure de l'activité peroxydasique du chou.....	30
---	----

II.4. Teste d'inhibition	31
--------------------------------	----

Conclusion et perspectives	37
---	----

Références bibliographiques	39
--	----

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : La structure monomérique de la peroxydase de raifort.....	07
Figure 2 : Mécanisme catalytique de la peroxydase.....	08
Figure 3 : La réaction catalysée par la peroxydase.....	09
Figure 4 : Effet de la température des peroxydases végétales	09
Figure 5 : Photographie de <i>F. agraria</i> dans son champ.....	13
Figure 6 : Schéma du protocole d'extraction des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de <i>F. agraria</i>	16
Figure 7 : Schéma d'extraction des alcaloïdes par fractionnement	17
Figure 8 : Schéma du protocole d'extraction des acides organiques de la partie aérienne de <i>F. agraria</i>	18
Figure 9 : Schéma de préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase.....	22
Figure 10 : Mode opératoire de l'étude cinétique de l'activité peroxydasique	24
Figure 11 : Chromatogramme GC-MS de l'extrait d'acides phénols de la partie aérienne de <i>F. agraria</i>	27
Figure 12 : Structure chimique de quelques acides phénoliques identifiés dans la partie aérienne de <i>F. agraria</i>	29
Figure 13 : La cinétique de la peroxydase	30
Figure 14 : Représentation de Lineweaver – Burk de la peroxydase.....	31
Figure 15 : Représentation de Lineweaver – Burk de la peroxydase.....	33

LISTE ES TABLEAUX

Liste des tableaux

Tableau I : Composition en alcaloïdes et acides organiques de la partie aérienne de <i>F. agraria</i>	05
Tableau II : Description de la plante du genre <i>Fumaria</i>	11
Tableau III : Les acides phénols identifiés dans l'extrait brut de la partie aérienne de <i>F. agraria</i>	28
Tableau VI : Taux d'inhibition de nos extraits et de l'acide caféique	31
Tableau V : Type d'inhibition de la peroxydase par les extraits de <i>F. agraria</i> et standard	34

- **L'idiosyncrasie**: est le comportement particulier, propre à celui-ci, d'un individu face aux influences de divers agents extérieurs. Le concept général est parfois nommé « idiosyncrasisme »
- **hypersensibilité non allergique**: l'hypersensibilité est non allergique quand le mécanisme immunologique n'est pas prouvé. C'est le cas des réactions à l'aspirine, des fausses allergies alimentaires par excès de consommation de produits riches en amines vasoactives, de l'intolérance au lactose. Pour l'allergie alimentaire ou médicamenteuse, cette hypersensibilité non allergique était appelée intolérance.
- **La dermatite atopique** (ou eczéma atopique, ou dermite du nourrisson, anciennement eczéma constitutionnel) est une pathologie allergique touchant la peau et atteignant préférentiellement les enfants, évoluant par poussée, de diagnostic clinique et dont le traitement est symptomatique;
- **Régime oligoantigénique**, un régime hypoallergène, qui élimine les allergènes communs comme les noix, les produits laitiers, le chocolat et les agrumes, "les études ont fourni des opinions mitigées sur son efficacité".
- **urticaire**, (nom féminin, latin : *urticaria*, dérivé de *urtica*, ortie) est une dermatose inflammatoire marquée par un œdème dermique (urticaire superficielle) ou dermo-hypodermique (urticaire profonde). La forme superficielle est la plus fréquente. Elle s'exprime par une éruption cutanée érythémateuse et papuleuse dont les lésions sont typiquement fugaces, migratrices et prurigineuses. Le diagnostic est clinique.
- **Orthorexie nerveuse**: (du grec *orthos*, « correct », et *orexis*, « appétit ») est un ensemble de pratiques alimentaires, caractérisé par la volonté obsessionnelle d'ingérer une nourriture saine et le rejet systématique des aliments perçus comme malsains

Introduction

Introduction

L'homme a toujours utilisé le végétal pour s'alimenter et se soigner. De nos jours, de nombreux aliments sont consommés même hors saison grâce à leurs conservations par les additifs alimentaires ; néanmoins, ces molécules chimiques le rendent de plus en plus moins naturel et par conséquent une nouvelle source de molécules oxydantes nuisible à la santé humaine.

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

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

Allant dans ce sens, le présent travail s'inscrit donc dans cette recherche de nouveaux composés qui peuvent trouver une utilisation en biotechnologie agroalimentaire. Pour cela, une plante de la famille des Fumariacées, « *Fumaria agraria* », originaire de Bejaia-Algérie, a fait l'objet d'une investigation approfondie. La sélection de cette espèce s'est basée sur des considérations chimiotaxonomiques (sa richesse en substances bioactives notamment en alcaloïdes isoquinoléines) et sur son utilisation en médecine traditionnelle (la régulation des fonctions hépatobiliaires notamment).

Des études préliminaires sur cette plante et d'autres espèces du même genre ont montré son effet antioxydant (**Maiza-Benabdesselam et al., 2007b**), ce qui nous a poussés à apporter des éléments de connaissances chimiques et biologiques relatifs à cette plante.

Ainsi, l'extrait d'alcaloïdes totaux, une fraction alcaloïdique contenant plus de 60% de protopine (**Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**) et l'extrait brut des acides phénols de la partie aérienne de cette plante furent soumis à une série de tests sur la cinétique inhibitrice de l'activité de la peroxydase végétale afin d'investiguer son potentiel vis-à-vis le brunissement enzymatique des aliments.

Introduction

La méthode de travail, que nous avons adoptée, est basée sur une action pluridisciplinaire, visant la valorisation de la matière végétale ; autrement dit, (i) une extraction des alcaloïdes totaux, une extraction par fractionnement des alcaloïdes et l'extraction brut des acides phénols à partir de la partie aérienne de la plante ;(ii) ainsi que l'évaluation de leur degré inhibiteur vis-à-vis d'un extrait brut de la peroxydase du chou afin de lutter contre le brunissement enzymatique des fruits et légumes. (iii) Par ailleurs, une technique analytique couplée, la GC/MS, est aussi utilisée dans le présent travail, afin d'effectuer une caractérisation des acides phénols de l'extrait brut d'acide phénolique.

Partie I :

Synthèse Bibliographique

Synthèse bibliographique

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet à côté des métabolites primaires classiques, ils accumulent fréquemment des métabolites secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente, mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Ces substances actives sont principalement les composés phénoliques, les alcaloïdes, les huiles essentielles, ...etc.

Dans notre partie bibliographique, en complément à la partie pratique, nous évoquerons les composés phénoliques ainsi que les alcaloïdes.

I. Les substances bioactives

I.1. Les composés phénoliques

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

Ces métabolites secondaires exercent un rôle essentiel dans le développement et la reproduction de la plante. Ils sont des molécules anti-oxydantes à caractère souvent hydrophile. Ils ont un rôle protecteur contre les différents prédateurs et pathologies et contre les radiations ultraviolettes (**Lee *et al.*, 2004**).

Plusieurs classifications ont été proposées, la plus employée est celle préconisée par **Ribereau-Gayon (1968)** qui les classe selon leurs propriétés chimiques en trois classes : Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

Les polyphénols, groupe de molécules de structures variées, ils suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en terme de prévention des maladies liées au vieillissement : infarctus du myocarde, cancer, maladies neurodégénératives...etc (**Leong & Shui, 2002**).

Synthèse bibliographique

I.2. Les alcaloïdes :

Le terme alcaloïde ou « alkaly-like » (al kaly= la soude ; like= qui a l'apparence) a été proposé pour la première fois par le pharmacien **Meissner, 1818** comme étant des substances naturelles alcalines. Ce n'est que récemment, que **Pelleter** les a présentés comme des molécules organiques de structures cycliques contenant un atome d'azote intracyclique «N» (**Santavy, 1970**).

Les alcaloïdes ont un rôle très important dans le végétal comme l'odeur, la couleur le goût et surtout la protection et la défense contre les agressions externes, ils sont aussi considérés comme une forme de réserve d'azote (**Santavy, 1970**).

Les alcaloïdes sont formés principalement à partir de divers acides aminés ; la lysine, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ces acides sont le point de départ de la synthèse de plusieurs molécules alcaloïdiques (**Shakil, 1998**).

Les alcaloïdes ne constituent pas une catégorie définie de composés chimiques en raison de la variété de leurs structures moléculaires. Les scientifiques classent les alcaloïdes selon plusieurs critères à savoir le rôle biologique, la voie de biosynthèse, la structure moléculaire (**Hopkins, 2003**). Celle qui prend en considération en plus de la structure, l'origine biosynthétique du composé, les mis en trois classes: Les Proto-alcaloïdes, les pseudo-alcaloïdes et les vrais alcaloïdes. Ces derniers dérivent d'acides aminés, et possède un noyau hétérocyclique, parmi eux « **les isoquinoléines** », très abondant dans les espèces du genre *Fumaria* qui font l'objet de notre étude (**Shakil, 1998**).

Ce groupe de composés est considéré comme étant le plus important groupe des alcaloïdes hétérocycliques, il est de structure complexe et donc très vaste, ce qui donne lieu à une large gamme d'activités biologiques dans les plantes des familles suivantes: les *Fumariaceae*, les *Papavariaceae*...etc.

Synthèse bibliographique

II. Les Fumariacées

Les Fumariacées sont une petite famille de plante dicotylédone de **15** genres réparties en **400** espèces. Le genre *Fumaria*, à lui seul, comprend une cinquantaine d'espèces (**Sousek et al., 1999**).

Comme toute plante, la famille des Fumariacées renferme en plus des sels minéraux (sels potassiques) des métabolites primaires qui sont indispensables pour la vitalité de la plante. La transformation de ces composants (métabolites primaires) donne naissance à une deuxième catégorie de constituants : « les métabolites secondaires » (**Raven et al., 2003**).

La fumeterre est particulièrement réputée pour sa teneur en métabolite secondaire notamment : les acides phénols, les flavonoïdes et les alcaloïdes isoquinoléiques. Le tableau ci-dessous (tableau I) résume la composition en alcaloïdes et acides organiques de l'espèce *Fumaria agraria* (celle utilisé dans notre partie pratique) (**Sousek et al., 1999 ; Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**)

Tableau I : composition chimique en alcaloïdes isoquinoléiques et acide phénoliques de la partie aérienne de *F. agraria* (**Sousek et al., 1999 ; Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**)

Alcaloïdes isoquinoléiques	Acides phénoliques
Adlumiceine, Coptisine, Cryptopine, Fumariline, Protopine, Stylopine, Parfumine, Bulbocapnine, ... etc.	Acides Caféique, Fumarique, Malique, Cinnamique, Succinique, Lactique, Eritique, ... etc.

La Fumeterre a été longtemps utilisée dans le traitement de plusieurs maladies, principalement contre les troubles digestifs, la régulation des fonctions hépatobiliaires et dans le cas des migraines d'origine digestive (**Gilani et al., 2005**).

D'autres effets ont été mis en évidence notamment, des effets antioxydants (**Maiza-Benabdesselam et al., 2007b ; Khamtach-Abderrahim et al., 2017**), des effets anti-inflammatoire (**Bribi et al., 2016**) et un effet anti-cancereux (**Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**).

Synthèse bibliographique

De nos jours, plusieurs médicaments à base de la fumeterre sont commercialisés. « L'Actibil gélules », « l'Actisan digestion » et « Superdiet ampoules » favorisent la production de bile par le foie et sa sécrétion dans l'intestin, facilitent les fonctions d'élimination rénale et aident à la perte du poids respectivement (**Marchand *et al.*, 2004**).

L'homme a toujours utilisé le végétal pour se soigner et s'alimenter. De nos jours, de nombreux aliments sont consommés même hors saison grâce à leurs conservations par les additifs alimentaires, qui agissent contre le brunissement des aliments afin de préserver leur qualité nutritionnelle et organoleptique.

III. Le brunissement des aliments

De nombreuses denrées alimentaires subissent avec le temps des réactions complexes conduisant à la formation de pigments bruns-noirs associés à des modifications d'odeur et de saveur. Ces changements de coloration consistent en un phénomène dit « **le brunissement** » qui se produit aussi bien au cours du vieillissement d'aliments, que pendant la mise en œuvre des différents procédés de fabrication ou de conservation. Ces réactions de dégradation modifient les caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment via la formation de pigments bruns mutagènes, tératogènes ou encore cancérigènes. Dans d'autres cas, certaines de ces réactions sont recherchées pour donner à l'aliment la couleur et le goût désiré (croûte de pain, chips, café, cacao,...etc) (**Amiot *et al.*, 1992**).

Deux principaux types de réactions peuvent être appréhendés, il s'agit des réactions de (**Bouquelet, 2008**):

- **Brunissement non enzymatique** : C'est une réaction, le plus souvent non oxydative, qui induit la formation de pigments de mélanines, par chauffage d'un mélange de sucre et d'acides aminés en présence d'H₂O. On peut citer, à titre d'exemple, le phénomène de caramélisation.
- **Brunissement enzymatique** : Qui ne se rencontre que dans le traitement des fruits et légumes et de certains crustacés. Sous l'action de certains enzymes végétales (**polyphénol-oxydase, peroxydases,...etc**), les composés phénoliques s'oxydent facilement en quinones en présence d'oxygène. Les quinones formées s'oxydent à leur tour, sans faire appel à des enzymes particulières, et se polymérisent en donnant des composés bruns dit « polyquinones »

Synthèse bibliographique

IV. La peroxydase végétale :

Les peroxydases végétales (*E.C. 1.11.1.7*), appelées aussi peroxydases de classe III jouent de grands rôles dans la croissance, le développement et le système de défense des plantes. Elles catalysent l'oxydation de plusieurs substrats dont les phénols en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Maciel *et al.*, 2007)

Les peroxydases sont des **hémoprotéines** contenant une composante glucidique. Leur groupement prosthétique est constitué par la protohématine IX qui est une **porphyrine** (4 noyaux pyrroles en cercle) liée à un atome de fer sous forme ferrique (**Baaziz *et al.*, 2006**) (Fig 01).

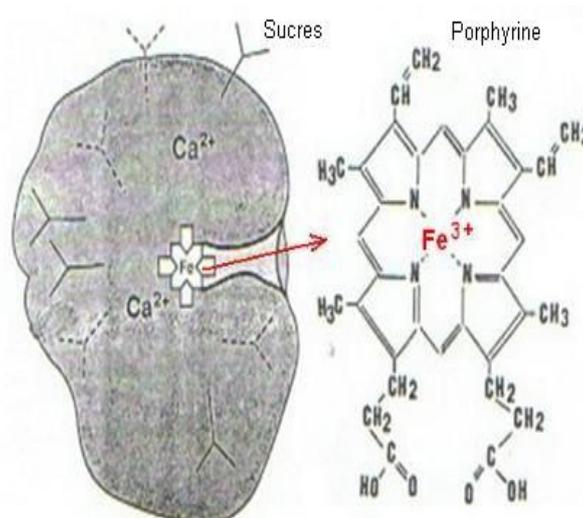


Figure 01 : La structure monomérique de la peroxydase du raifort (Baaziz *et al.*, 2006)

Les peroxydases sont des oxydoréductases qui catalysent l'oxydation d'un substrat (donneur de protons) en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La réaction globale est du type :



La catalyse déclenchée par le H_2O_2 permet la formation d'enzyme transitoire. En réagissant avec un donneur de proton (RH_2), ces dernières donnent naissance à des radicaux libres (RH^\cdot) qui peuvent former des polymères en réagissant entre eux (Fig 02) (Maciel *et al.*, 2007).

Synthèse bibliographique

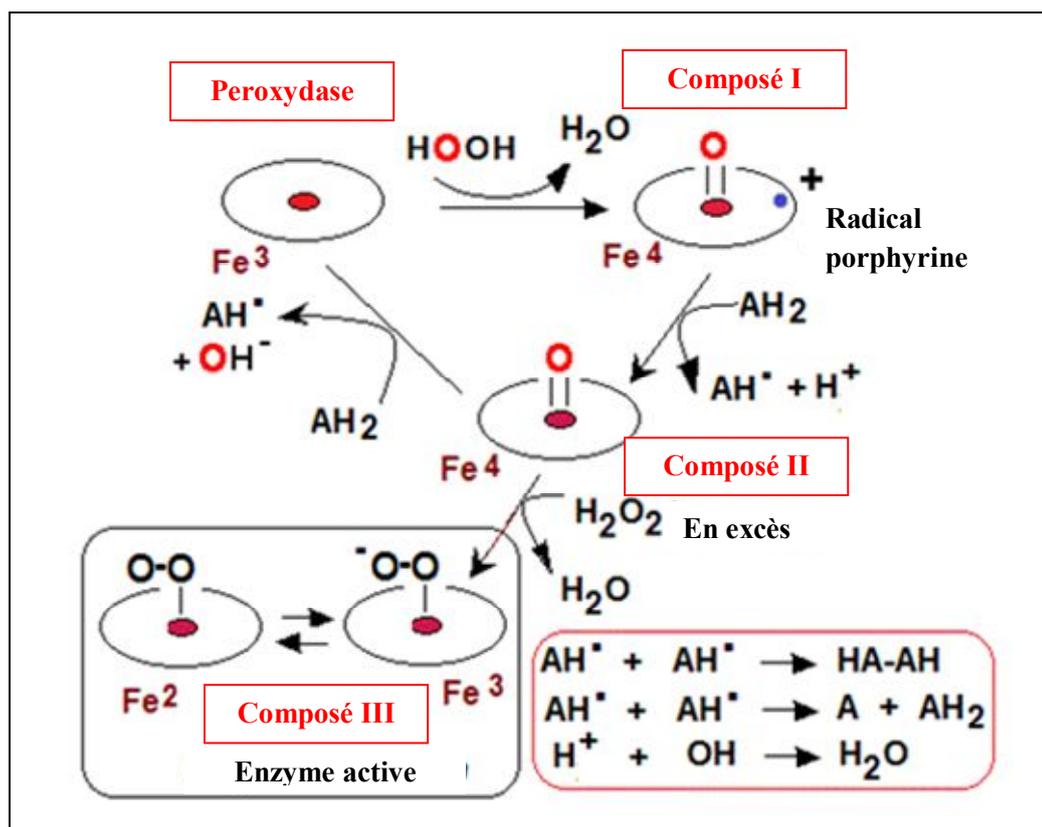


Figure 02: Mécanisme catalytique de la peroxydase (Maciel *et al.*, 2007)

En utilisant le gaïacol comme substrat (donneur de proton H^+), la réaction donne naissance au tétra-gaïacol, composé rouge rouille (absorbant la lumière à 470 nm) (Rani *et al.*, 2006) (Fig 03).

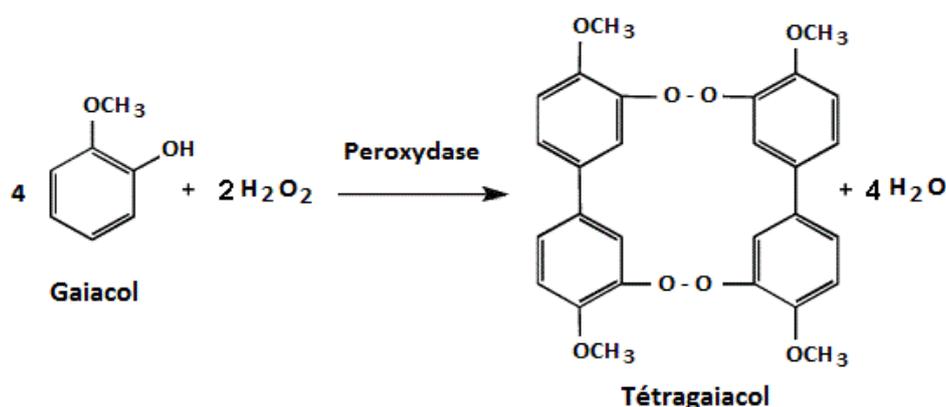


Figure 03: La réaction catalysée par la peroxydase (Rani *et al.*, 2006)

Synthèse bibliographique

Extraites des feuilles et testées avec le gaïacol comme substrat, ces enzymes sont hautement résistantes à la dénaturation par chauffage (**Fig 04**). Elles présentent un pH optimum moyen allant de 5 à 6,5 (**Baaziz, 1989**).

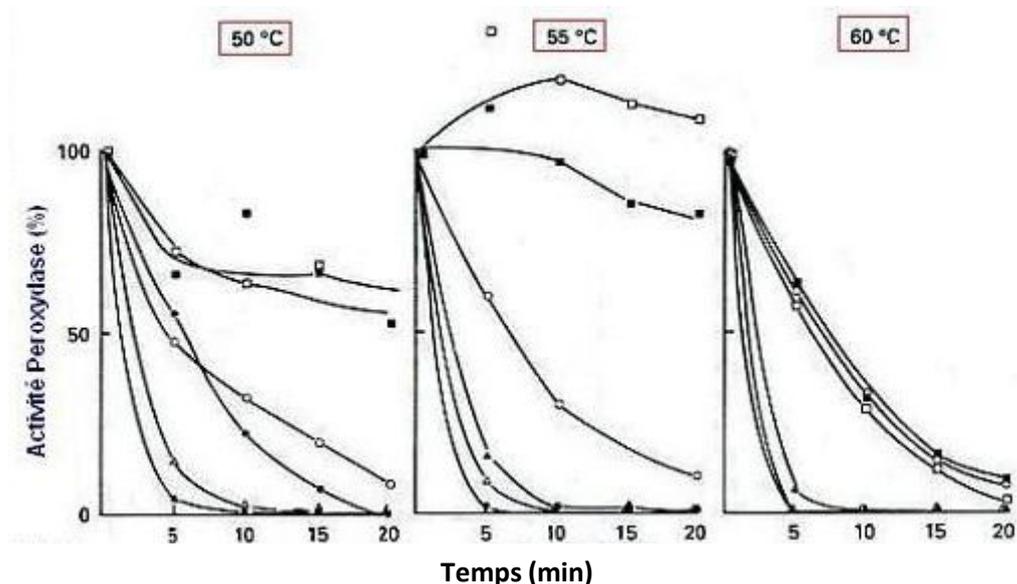


Figure 04 : Effet de la température sur l'activité des peroxydases végétales (**Baaziz, 1989**)

V. Inhibition du brunissement enzymatique :

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

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

Le consommateur préfère toujours des aliments avec le moins possibles de produits chimiques qui sont une nouvelle source de molécules oxydantes contre la santé humaine, pour cette raison et pour la conservation des qualités nutritionnelles et sensorielles, que des chercheurs se sont intéressés à la recherche des inhibiteurs naturels du brunissement enzymatique des aliments (**Fayad-Dahouk, 1998**).

Synthèse bibliographique

VI. Additifs alimentaires et danger :

D'après le comité FAO–OMS (**FAO** : Food & Agriculture Organisation) , un additif alimentaire est défini comme une substance dotée ou non d'une valeur nutritionnelle, ajoutée intentionnellement à un aliment dans un but technologique, sanitaire, organoleptique ou nutritionnel. Son emploi doit améliorer les qualités du produit fini sans présenter de danger pour la santé, aux doses utilisées. Il peut être d'origine naturelle : minérale (sulfites, nitrite etc.), végétale (épaississants extraits de graines, d'algues etc.), animale (colorants comme le carmin de cochenille) ou artificielle : produits de transformation de substances naturelles (amidons transformés comme agents de texture etc.), de fermentation (enzymes, gommes xanthane ...etc.), ou encore être un colorant de synthèse (érythrosine, indigotine) (**Dutau et al., 2002**).

Les exigences parfois contradictoires des firmes de l'industrie agro-alimentaire et des consommateurs conduisent à l'utilisation de nombreux additifs alimentaires. Leur évaluation en matière de sécurité est assurée par l'Autorité européenne de sécurité des aliments. Chaque additif autorisé bénéficie d'un code type « **Exxx** ». Source d'inquiétude, les additifs sont régulièrement incriminés pour expliquer des symptômes et des pathologies variées (**Dutau et al., 2002**).

Une autre difficulté concerne la méconnaissance habituelle du mécanisme physiopathologique de la toxicité des additifs alimentaires. On peut distinguer les quelques additifs où un phénomène IgE-dépendant est en cause, et où les investigations seront celles habituellement réalisées en allergologie alimentaire : c'est le cas par exemple du carmin de cochenille (**E120**), des carraghénanes (**E407**), de la gomme adragante (**E 413**), du lysosyme (**E 1105**) (**Wüthrich et al., 1993**).

Pour la plupart des autres additifs, le mécanisme est surtout celui d'une intolérance : dans ce cas les tests cutanés et biologiques n'ont alors pas d'intérêt. Dans cette situation, de loin la plus fréquente, les termes utilisés sont nombreux : « idiosyncrasie », « intolérance », « hypersensibilité non allergique » (**Worm et al., 2001**).

L'additif peut se comporter comme un haptène se liant à des protéines. Il peut aussi s'agir d'une augmentation de la perméabilité intestinale, d'une histaminolibération non spécifique, d'une inhibition de la cyclo-oxygénase par la voie de la lipo-oxygénase avec

Synthèse bibliographique

augmentation de la production de leucotriènes. Deux études se sont intéressées à ce dernier mécanisme.

La première étude, portant sur la dermatite atopique de l'adulte avec intolérance aux additifs, fait appel à un régime oligoantigénique et à des TPODAC « **Test de provocation en double insu contre placebo** », avec mesure de la production de leucotriènes par les basophiles circulants. En présence d'additif isolé, à doses croissantes de 0,2 à 200 µg/ml,

- Dans le groupe **A** (dix témoins non atopiques), il n'y a pas d'augmentation des leucotriènes.
- Dans le groupe **B** (neuf patients améliorés par le régime, mais dont le TPO « **test de provocation oral** » est négatif), on constate une augmentation des leucotriènes dans deux cas sur neuf.
- Dans le groupe **C** (neuf patients améliorés par régime avec un TPO positif), les leucotriènes sont augmentées dans sept cas sur neuf.

Comme résultats, la tartrazine (trois cas sur neuf), les nitrites (cinq cas sur neuf) et les benzoates (quatre cas sur neuf) sont les plus souvent en cause dans le groupe C (**Worm et al., 2001**).

L'autre étude argumente indirectement ce mécanisme en évaluant l'efficacité des anti-leucotriènes chez 51 adultes âgés de 15 à 71 ans présentant une urticaire chronique avec intolérance aux additifs et/ou à l'aspirine confirmée par TPODACP. Ils sont répartis en trois groupes de 17 patients traités par **Montelukast** (un antileucotriène) (**10 mg**), **Cétirizine** (un antihistaminique H₁) (**10 mg**) ou placebo. En étudiant pendant un mois le pourcentage de jours sans symptôme et de nuits sans réveil, l'efficacité du montelukast et de la cétirizine est supérieure au placebo avec une efficacité plus importante de l'antileucotriène (**Pacor et al., 2001**).

La connaissance des mécanismes physiopathologiques reste encore très floue et, à l'exception de quelques substances particulières où la démarche diagnostique est calquée sur celle de l'exploration générale de l'allergie alimentaire, seuls les tests de provocation sont capables d'affirmer le diagnostic. La prévalence, bien étayée chez l'adulte, étant faible par rapport à l'allergie alimentaire IgE-dépendante, mais plus difficile à prouver en pratique courante chez l'enfant en raison de la lourdeur des explorations à mettre en œuvre (**Bourrier, 2006**).

Synthèse bibliographique

Malgré la tendance actuelle, dans les civilisations mondiales, du retour à la nature, pouvant déboucher au maximum sur « l'orthorexie nerveuse », nouveau trouble du comportement alimentaire décrit par les nutritionnistes, où la crainte de toute contamination des aliments (colorants et conservateurs compris) touche à la psychiatrie (**Bourrier, 2006**).

Partie II :

Partie expérimentale

Chapitre I :

Matériels et méthodes

Partie expérimentale (Chapitre I)

I. Matériels et méthodes :

I.1. Matériel :

I.1.1. Matériel végétale :

Notre étude porte sur une espèce du genre *Fumaria* « *Fumaria agraria* » afin d'extraire des substances bioactives. Le Chou (*Brassica oleracea*) nous a servi comme une source de la peroxydase pour l'étude de l'activité enzymatique.

A. La Fumeterre

La partie aérienne de *Fumaria agraria* (tige, feuilles, fleur et fruit) a fait l'objet de notre étude afin d'extraire un ensemble de substances bioactives. La plante a été récoltée dans les champs de « Ighrem » commune « d'Akbou » (GPS : 36°28'0''N et 4°31'0''E) wilaya de « Bejaia » la matinée du mois de Mars 2018 (moment de la fructification). Un échantillon d'herbier a été déposé à l'Herbier des Conservatoire et Jardins botaniques de Nancy, France sous la référence "NCY013571" par le collecteur, Bougoffa-Sadaoui K. (2009).

La fumeterre est une plante herbacée, dicotylédone, de la famille des Fumariacées (Fig 05). Sa description peut être résumée dans le tableau ci-dessous (Tableau II) (Susplugas *et al.*, 1975) .



Figure 05 : Photographie de *Fumaria agraria* dans son champ

Partie expérimentale (Chapitre I)

Tableau II : Description de la plante du genre *Fumaria* (Susplugaset *al.*, 1975).

<i>Organe</i>	<i>Description</i>
Tige	Epaisse, longue, grimpante, rameuse.
Feuilles	Couleur verte, alternées, pétiolées et composées.
Fleurs	Volumineuses de plus en plus rose après fécondation, seul les pétales latéraux sont à appointe pourpre.
Fruits	Formé d'une capsule, très granuleux de plus de 2.4 mm de largeur.
La floraison	Mars – Juin

Certains Botanistes incluent les plantes des Fumariacées dans celles des Papavéracées (Salinas *et al.*, 2003).

- ✓ **Ordre** : Ranunculales ;
- ✓ **Famille** : *Fumariaceae* / *Papaveraceae* ;
- ✓ **Genre** : *Fumaria*.

Dans notre région, la plante porte plusieurs appellations à savoir :

- **En kabyle** : Zallamit ; Tijujargisghi; Tiquadnyesghi (Idres & Madi, 2017) ;
- **En arabe** : Mesran elhedj ; Hachichet archam (Haroumi & Nacef, 1979).

B. Le chou :

- Le chou utilisé comme source d'enzyme est celui commercialisé (Mars, 2018). Le nom latin de l'espèce « *Brassica* » serait dérivé d'un mot composé, « *bresic* », qui voulait justement dire « choux », alors que « *oleracea* » veut dire potager. La classification de ce végétal est décrite ci-dessous (De-Fontnelleet *al.*, 1836) :

- **Règne** : Plantea ;
- **Sous règne** : Traceobionta ;
- **Division** : Magnoliophyta ;
- **Classe** :Magnoliopsidae ;
- **Sous classe** :Dilleniidae ;
- **Ordre** : Capparales ;
- **Famille** : Brassicaceae ;
- **Genre** : *Brassica* ;
- **Espèce** :*Brassica oleraceaviridice*

Partie expérimentale (Chapitre I)

I.2.Méthodes :

I.2.1.Séchage, broyage :

Nos échantillons de *Fumaria agraria* ont été rincés à l'eau courant pour les débarrasser de poussières et d'autres particules, puis séchés à l'étuve ventilée à 40°C jusqu'à stabilisation du poids. Le séchage permet un meilleur broyage de la plante et donc une meilleure extraction et conservation du matériel végétal (**Debuigne, 1991**).

Les échantillons séchés sont réduits en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue est conservée dans des récipients en verre et stockées à l'abri de la lumière. Le broyage permet d'avoir un meilleur rendement de la substance par augmentation de la surface d'échange entre la matière végétale et le solvant d'extraction (**Debuigne, 1991**).

I.2.2.Extraction des substances bioactives :

Toutes les extractions sont réalisées en utilisant le Soxhlet comme extracteur permettant une extraction solide liquide, et l'éthanol comme solvant d'extraction.

On a tenté d'extraire, de la partie aérienne de *F.agraria*, les acides phénoliques, les alcaloïdes totaux ainsi que des fractions alcaloïdiques.

L'extraction des alcaloïdes est réalisée en se basent sur leur caractère alcalin.

Partie expérimentale (Chapitre I)

A. Extraction des alcaloïdes totaux « AT »:

L'extraction des alcaloïdes de la partie aérienne de *F. agraria* a été réalisée suivant le protocole schématisé sur la **figure 06** (Suau *et al.*, 2002).

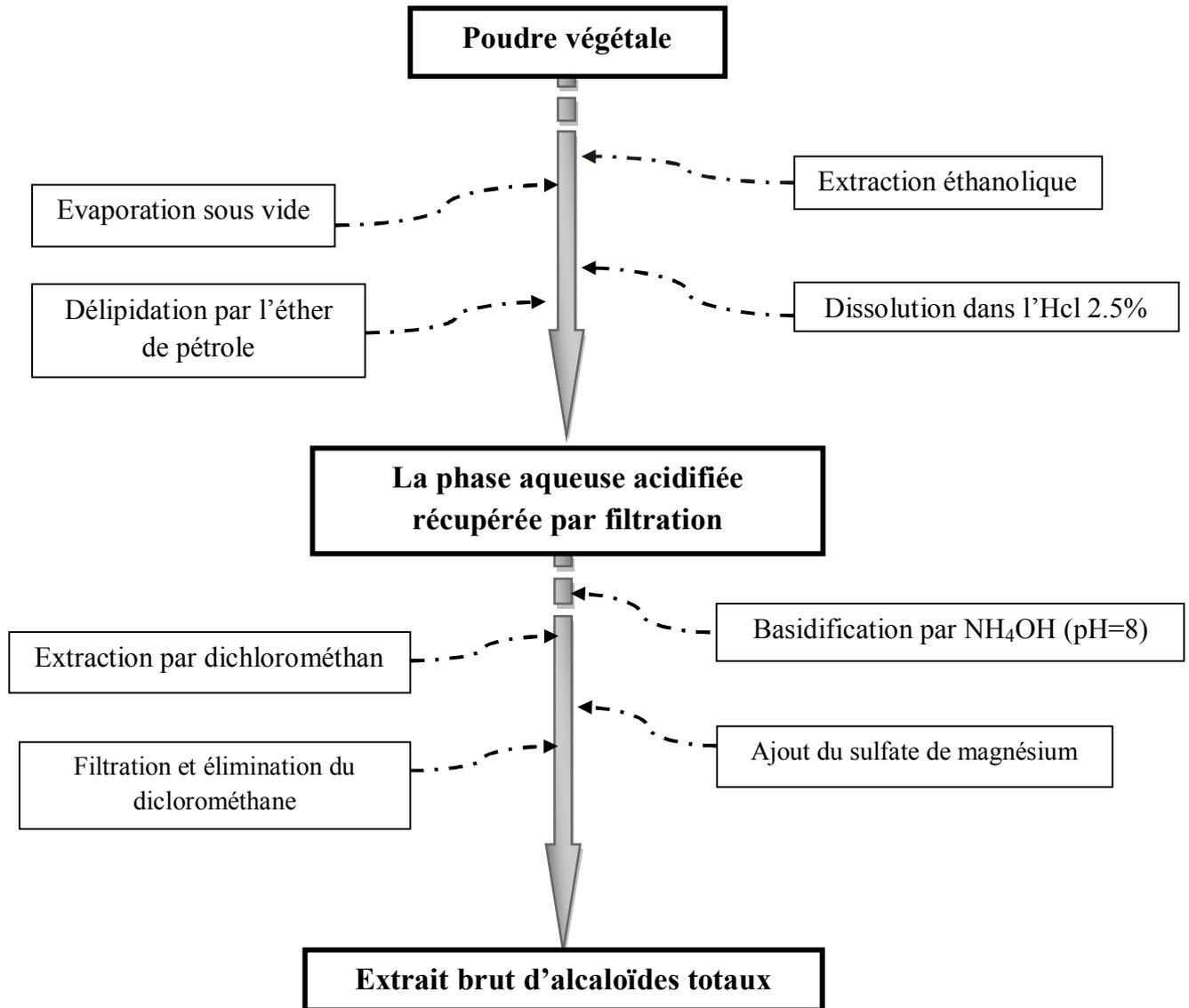
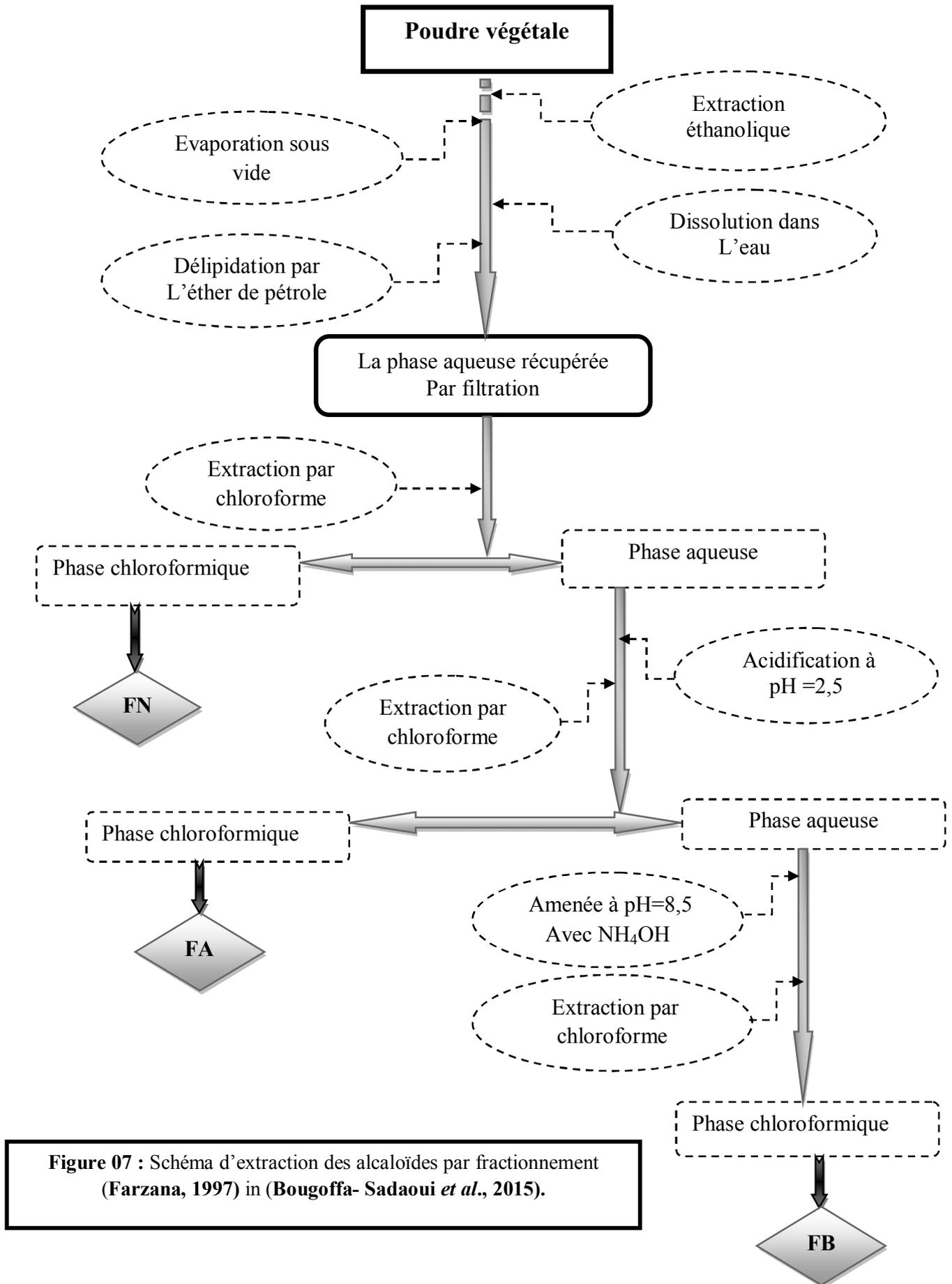


Figure 06 : Schéma du protocole d'extraction des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de *Fumaria agraria* (Suau *et al.*, 2002).

B. Extraction des alcaloïdes par fractionnement:

Le processus de fractionnement ici utilisé est celui de **Farzana (1997)** avec des modifications (**Bougoffa-Sadaoui *et al.*, 2015**) (**Fig 07**).

Partie expérimentale (Chapitre I)



Partie expérimentale (Chapitre I)

C. Extraction des Acides phénoliques :

L'extraction a été réalisée suivant le protocole recommandé par **Sousek et ses collaborateurs (1999)**. Les différentes étapes d'extraction sont schématisées sur la **figure 08**. Cet extrait est soumis à une analyse GC-MS afin de déterminer le profil en acides organiques et phénoliques de la partie aérienne de la plante.

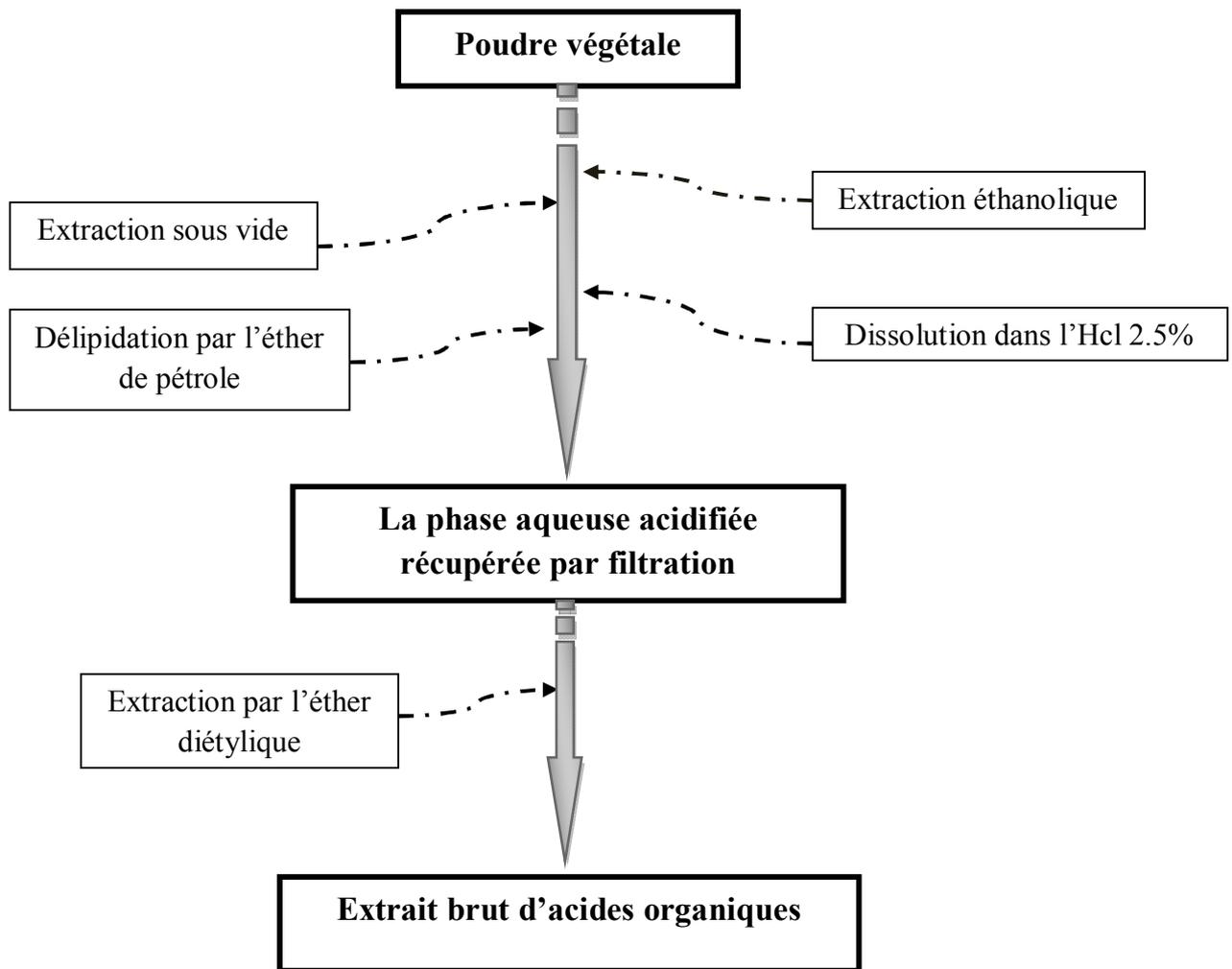


Figure 08: Schéma du protocole d'extraction des Acides organiques de la partie aérienne de *Fumaria agraria* (Sousek *et al.*, 1999).

Partie expérimentale (Chapitre I)

I.2.3. Taux d'extraction:

Les rendements massiques (MA) des différentes extractions (**EAP**, **AT** et **Fa**), sont déterminés par la formule suivante :

$$MA = M' - M$$

Le pourcentage (**PA**) est calculé comme suite :

$$PA = 100\% * MA / PE$$

D'où :

M : masse de la boîte de pétri vide.

M' : masse de la boîte de pétri est pesée de nouveau remplie.

PE : masse de la prise d'essai (**20g**).

Fa : fractions alcaloïdiques

EAP : extrait d'acide phénolique

AT : alcaloïdes totaux

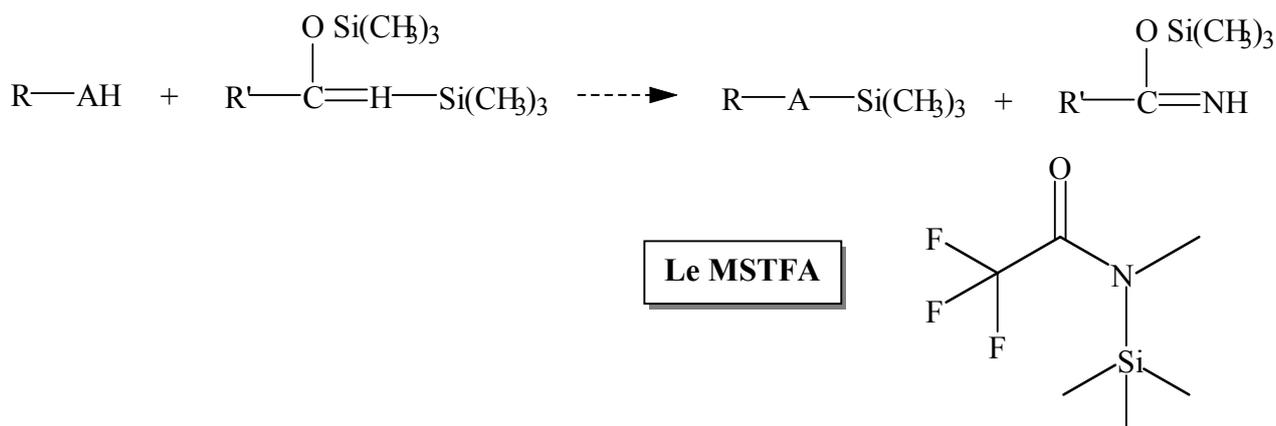
I.2.4. Caractérisation de l'extrait brut des acides phénols par GCMS :

L'extrait brut des acides phénols subit une dérivation par silylation afin de les rendre plus volatiles en abaissant leur point d'ébullition. Ainsi ces molécules seront analysables par GC-MS.

A. La dérivation :

Les groupements hydrogènes actifs appartenant à un OH, un NH ou un SH seront remplacés par un groupement triméthylsilyl en utilisant le « MSTFA » (N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide) (**Rambaud *et al.*, 2005**), selon le mécanisme ci-dessous :

Partie expérimentale (Chapitre I)



L'extrait sec obtenu après lyophilisation est solubilisé et silylé à 37°C pendant 30 minutes, ensuite l'échantillon est laissé au repos pendant une heure à température ambiante avant injection.

B. L'analyse GCMS

Les analyses ont été effectuées grâce à un chromatographe GC-MS (Thermo Scientific TRACE GC, Italy), équipé d'un passeur automatique d'échantillons, d'un injecteur split/splitless et d'un spectromètre de masse DSQII (Thermo Scientific, USA). La colonne utilisée pour les analyses chromatographiques est une colonne apolaire BPX5 (SGE Analytical Science, France) (30 m × 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur du film : 0,25 µm). L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un flux constant de 1 ml/min.

La spectrométrie de masse a été réalisée en mode impact électronique (EI) à l'aide d'une trappe ionique équipée d'une source interne. Les molécules ont été bombardées avec un faisceau électronique d'une énergie de 70 eV. L'acquisition des données a été faite à partir de 5 min pour éviter le pic de solvant, pour une gamme de masse allant de 10 à 400 Da enregistré à un débit de 6 scans/s. Les températures des différentes parties du spectromètre ont été fixées à 230°C pour la trappe et 280°C pour la ligne de transfert.

Le programme choisi pour l'analyse GC/MS débute à une température 70°C, maintenue pendant 5 minutes, puis se poursuit par une montée en palier de 5°C/ min pour arriver à 310°C ou elle est maintenue pendant une minutes.

Partie expérimentale (Chapitre I)

L'injection a été réalisée en mode splitless durant toute la durée de l'analyse. Les extraits ont été dilués dans du naphthalène ou la pyridine de qualité CLHP (1mg/ml), et 1 µl de la solution a été injecté via le passeur automatique.

Pour le traitement des données chromatographiques, les indices de Kovats de chacune des molécules ont été calculés selon la formule suivante :

$$IK = 100 \left(n + \frac{\log(t(x)) - \log(t(n))}{\log(t(N)) - \log(t(n))} \right)$$

t(x) : temps de rétention du composé à identifier

t(n) : temps de rétention de l'alcane ayant élué immédiatement avant le composé à identifier

t(N) : temps de rétention de l'alcane ayant élué immédiatement après le composé à identifier

n : nombre d'atomes de carbone de l'alcane ayant élué juste immédiatement avant le composé à identifier

Les indices de Kovats sont les temps de rétention relatifs des substances analysées par rapport à ceux d'une série d'alcane linéaires injectés sur le même appareil (ici l'analyse a été effectuée à partir d'une série d'alcane allant de C8 à C20) (Annexe 1).

Chaque acide organique et phénolique a été quantifié par rapport à l'acide fumarique, dont le sommet superficielle mesurée en TIC a été fixée à une valeur de 100. L'identification des composés a été faite par comparaison directe de leurs MS et le temps de rétention (Rt) avec les données de la bibliothèque NIST et avec des données rapportée dans la littérature (**Sousek et al., 1999; Suau et al., 2002a; Suau et al., 2002b**)

Il est nécessaire de noter qu'en plus de l'extrait des alcaloïdes totaux et des acides phénoliques, seule la fraction FB sera évaluée pour son pouvoir anti-péroxydase.

Le choix de l'utilisation de la fraction FB repose sur des études préalables, antioxydantes et anticancéreuses, qui ont montré l'efficacité de cette fraction en comparaison au deux autres fractions FN et FA (**Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**).

Partie expérimentale (Chapitre I)

I.2.5. Evaluation de l'effet des extraits de *F. agraria* sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la peroxydase :

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

Les extraits de *Fumaria agraria* (AT, FB et EAP) sont testés pour leur pouvoir antioxydant en estimant leur potentiel sur l'activité de la peroxydase végétale.

A. Préparation de l'extrait enzymatique :

Le travail est réalisé sur un extrait brut obtenu à partir de chou connu pour sa richesse relative en peroxydase (Neves, 2002).

La préparation de notre extrait a été faite suivant les étapes schématisées sur la **figure 09** (Ponce *et al.*, 2004). Il est à noter que toutes les étapes ont été réalisées à froid (dans un bac à glace).

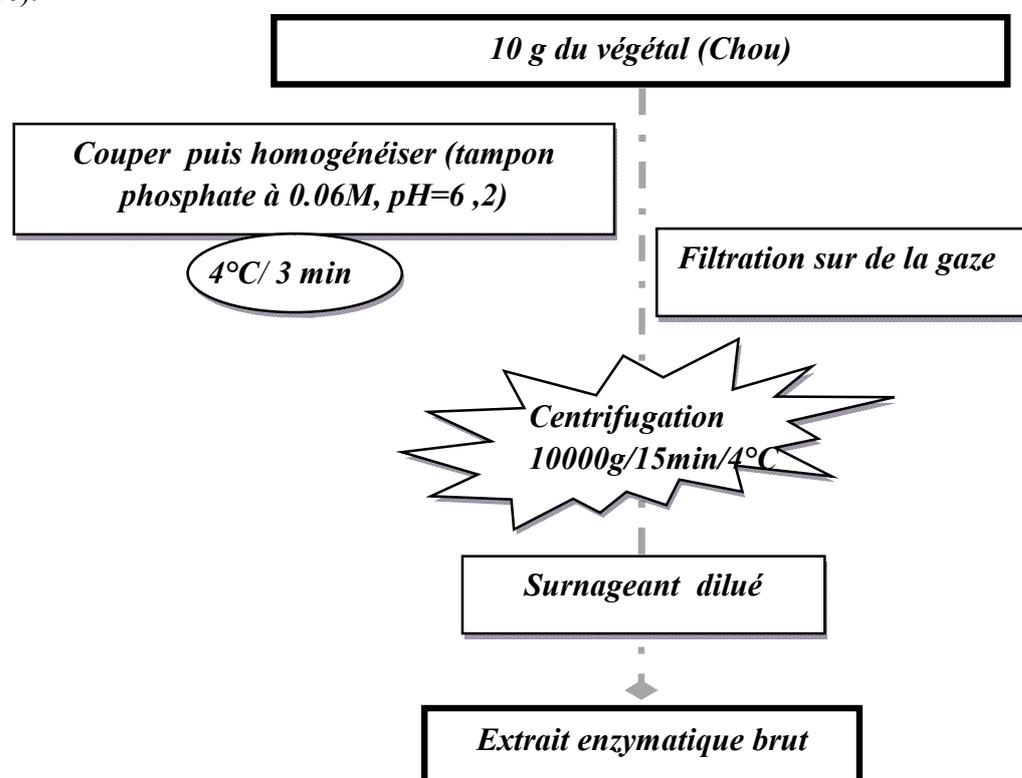


Figure 09 : Schéma de préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase (Ponce *et al.*, 2004).

Partie expérimentale (Chapitre I)

B. Préparation des différents éléments du milieu réactionnel :

Dans cette étude différentes préparations ont été faite à savoir:

- ◆ Préparation de H_2O_2 a différents concentrations « 1^{er} Substrat » (le peroxyde d'hydrogène à 10 V est utilisé comme solution mère).
- ◆ Préparation d'une solution gaïacol à 1% « 2^{eme} Substrat » (le gaïacol à 100 % est utilisé comme solution mère).
- ◆ Préparation d'une solution tampon phosphate à 0,06M et pH 6,2.
- ◆ Préparation des extraits de plante « AT, FB et EAP) et du standard « l'acide caféique » à une concentration de 0,4 mg/ml et 0,1 mg/ml respectivement.

C. Mesure de l'activité de la peroxydase

Le choix de la concentration du substrat (H_2O_2) et celle de l'extrait enzymatique brut a été maintenu, après plusieurs essais, dans le domaine de la linéarité de la courbe cinétique de l'enzyme.

Le suivi cinétique de la réaction catalytique se fait en fonction de la concentration en H_2O_2 , en maintenant le *gaïacol* constant.

L'étude de la cinétique de la peroxydase a été effectuée selon le protocole de **Ponce et al. (2004)** avec des modifications (**Fig 10**) en absence et en présence de nos extraits de plante utilisés comme additifs.

Partie expérimentale (Chapitre I)

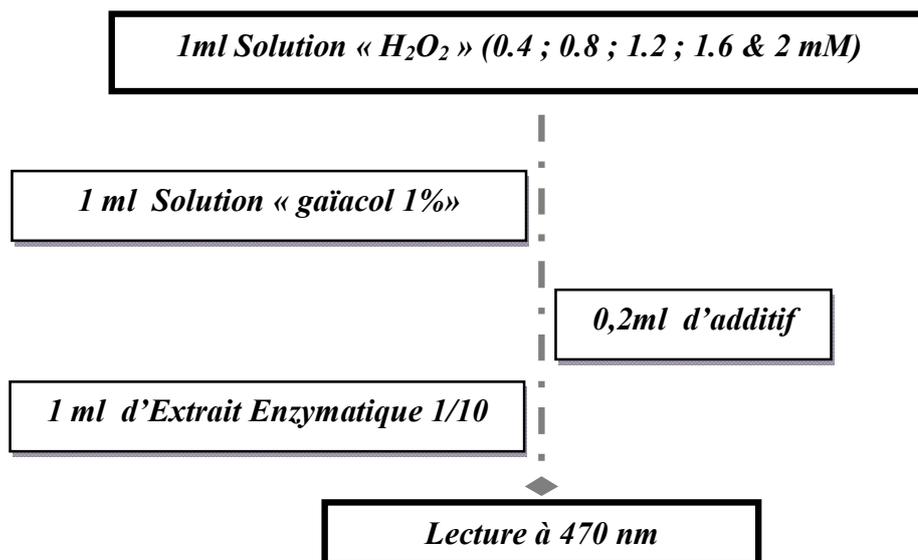


Figure 10 : Mode opératoire de l'étude cinétique de l'activité peroxydasique (Ponce *et al.*, 2004).

La réaction est déclenchée immédiatement après injection de l'enzyme et les mesures de l'absorbance ont été enregistrées à **470 nm** contre un blanc (sans enzyme) chaque **10 secondes** pendant **2 minutes**.

I. 2.6. Etude statistique

L'analyse statistique des résultats est donnée pour des expériences réalisées au moins trois fois et de manière indépendante. Les résultats sont présentés comme une moyenne \pm écart-type. Le calcul de la moyenne et de l'écart-type sont réalisés avec **Microsoft Excel 2007**. Leur significativité a été évaluée par le test "Student" permettant la comparaison des moyennes, celui-ci est effectué avec le logiciel "**Statistica 7.1.2**". Les résultats jugés statistiquement différents lorsque **p < 0.05** en comparaison au contrôle.

Chapitre II : Résultats et discussion

II. Résultats et discussion :

L'utilisation de l'éthanol (99%) comme solvant, permet d'extraire le maximum de composés, et possède l'avantage d'être plus facilement éliminé (volatile) et surtout moins toxique que le méthanol (Ribéreau-Gayon, 1968).

Dans cette étude, la poudre de la partie aérienne de *Fumaria agraria* nous a permis de préparer différents extraits à savoir, les alcaloïdes totaux, les fractions alcaloïdiques et un extrait brut contenant les acides phénols. Les taux d'extraction sont calculés par rapport à la masse de la poudre végétale initiale.

II.1. Dosage massique des alcaloïdes totaux et des fractions alcaloïdiques de la partie aérienne de *Fumaria agraria*

Notre extraction a permis de récupérer un taux d'alcaloïdes totaux « AT » de 720mg/100 g du poids sec (PS) (0,72%), qui est inférieur à celui retrouvé chez la même espèce Espagnole avec un rendement de 0,83% (Suau *et al.*, 2002). Ceci peut s'expliquer par la différence de la région et la période de récolte. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Bougoffa-Sadaoui *et al.* (2015) de la même espèce récoltée en 2009, qui a donné un rendement de 0,7%, ce qui confirme la reproductibilité du protocole d'extraction.

Par contre, notre résultat reste largement inférieur à celui trouvé par Maiza *et al.*, (2007) qui allait à un taux de 2.66% (*Fumaria bastardi*) qui s'explique par la différence de la méthode d'extraction, ou cette dernière a utilisé un réactif spécifique précipitant sélectivement les alcaloïdes (le réactif de Mayer). En terme de rendement, l'utilisation des réactifs spécifiques aux alcaloïdes sont les plus efficaces ; alors que, d'un point de vue pureté, le protocole d'extraction adopté dans notre cas (par simple entraînement des alcaloïdes sous forme de sels par acidification) nous permet d'avoir un extrait brut d'alcaloïdes totaux le plus pur possible (sans utilisation d'autres techniques plus avancées et plus coûteuses pour la purification telle que la chromatographie sur colonne).

Nos résultats restent meilleurs que ceux obtenus par Bruneton (1987), par macération, avec un taux de 0,33% chez *F. officinalis* et une moyenne de (0,3 à 0,4 %) pour d'autres plantes alcaloïfères (Bruneton, 1999), ce qui montre l'efficacité et la sélectivité de la technique d'extraction utilisée dans notre étude.

L'extraction par fractionnement de la partie aérienne de *F. agraria* a permis l'obtention de trois fractions alcaloïdiques avec des taux variables : la fraction neutre « FN » (400 mg/ 100 g PS), la fraction acide « FA » (50 mg/ 100 g PS) et la fraction basique « FB » (270 mg/ 100 g PS). La méthode d'extraction par fractionnement, comparant aux taux récupérés par **Bougoffa-Sadaoui et ces collaborateurs (2015)** ainsi que des études de fin de cycle des années précédentes, montre sa fiabilité et sa reproductibilité.

Une analyse par GC-MS réalisée sur les mêmes extraits alcaloïdiques (totaux et fractionnés) a démontré leurs richesses en alcaloïdes isoquinoléines avec abondance de la protopine, la stylopine et la fumariline (**Bougoffa-Sadaoui et al., 2015**).

II.2. Caractérisation par GCMS des acides phénols de la partie aérienne de *F. agraria*

De même que précédemment, il a été calculé le rendement massique de l'extrait brut des acides phénols, ou on a enregistré une valeur de **5,72 %**. Cet extrait a été soumis à une analyse GC-MS, les résultats sont présentés sur la **figure 11** et le **tableau III**. Au temps de rétention, entre 10 et 40 minutes, 10 pics correspondant aux acides phénoliques ont pu être détectés et identifiés avec certitude.

L'acide Fumarique est le composant majoritaire ici identifié, tandis que les acides Caféique, Oxalique, Lactique, Protocatechique, p-Coumarique, Cinnamique, Férulique et esters d'acide Malique sont détectés comme des acides phénols mineurs ou à l'état de trace (**Tableau III, Fig 11**). Pour la plupart de ces molécules, aucun standard n'a été injecté pour la quantification absolue. L'abondance relative de chaque acide phénolique a ensuite été estimée en fonction de la surface de pic sur le chromatogramme sur la base du courant ionique total (CIT). Le pic de l'acide fumarique étant considéré comme la référence, sa surface était fixée à 100 ; pour une comparaison relative, la surface des autres pics a ensuite été exprimée en pourcentage de cette référence (**Tableau III**).

Comme il est montré sur le chromatogramme de l'extrait des acides phénols (**Fig 11**), la silylation (**Fig 11 B**) permet une meilleure détection de certains métabolites notamment des acides phénols comparant au chromatogramme de l'échantillon nonsilylé (**Fig 11 A**).

Sur la **figure 12** sont représentées les structures de quelques acides phénols identifiés dans la partie aérienne de *F. agraria*

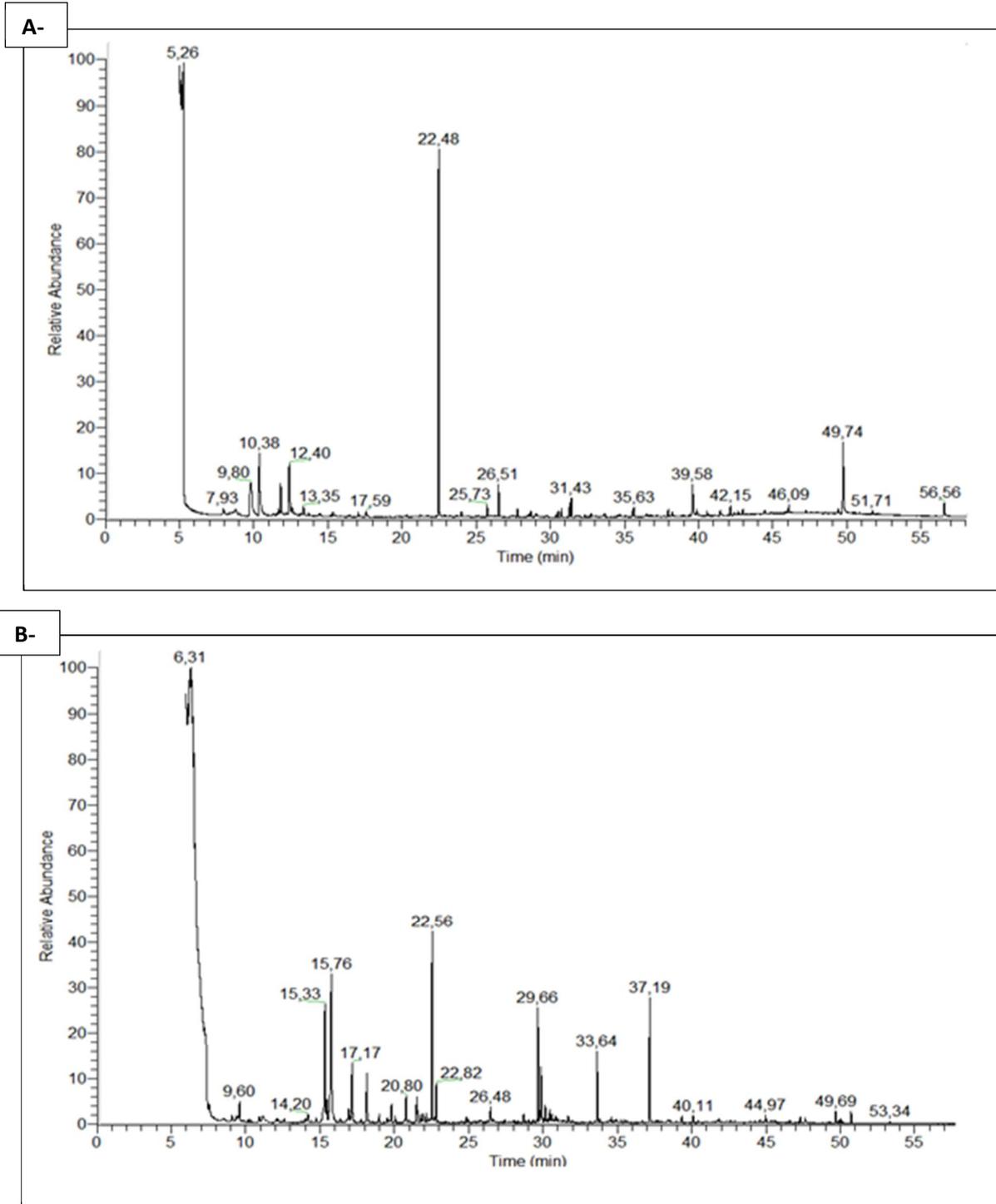


Figure 11 : Chromatogramme GC-MS de l'extrait d'acides phénols de la partie aérienne de *Fumaria agraria*. A) extrait sans dérivatisation. B) extrait avec dérivatisation.

Partie expérimentale « Chapitre II »

Tableau III : Les acides phénols identifiés dans l'extrait brut de la partie aérienne de *F. agraria*

Acide phénolique (tR min)	Formule chimique	Abondance relative (% en acide fumarique)*
Acide oxalique (12,4)	C ₂ H ₂ O ₄	0,80
Acide lactique (17,37)	C ₃ H ₆ O ₃	0,46
Acide succinique (17,65)	C ₄ H ₆ O ₄	1,15
Acide fumarique (18,7)	C ₄ H ₄ O ₄	100
Esters d'acide malique (22,05)	C ₄ H ₆ O ₅	0,57
Acide protocatechique (29,65)	C ₇ H ₆ O ₄	0,23
Acide p-coumarique (32,32)	C ₉ H ₈ O ₃	1,26
Acide cinnamique (33,58)	C ₉ H ₈ O ₂	0,34
Acide férulique (35,23)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0,92
Acide caféique (35,88)	C ₉ H ₈ O ₄	1,26

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% d'acide fumarique.

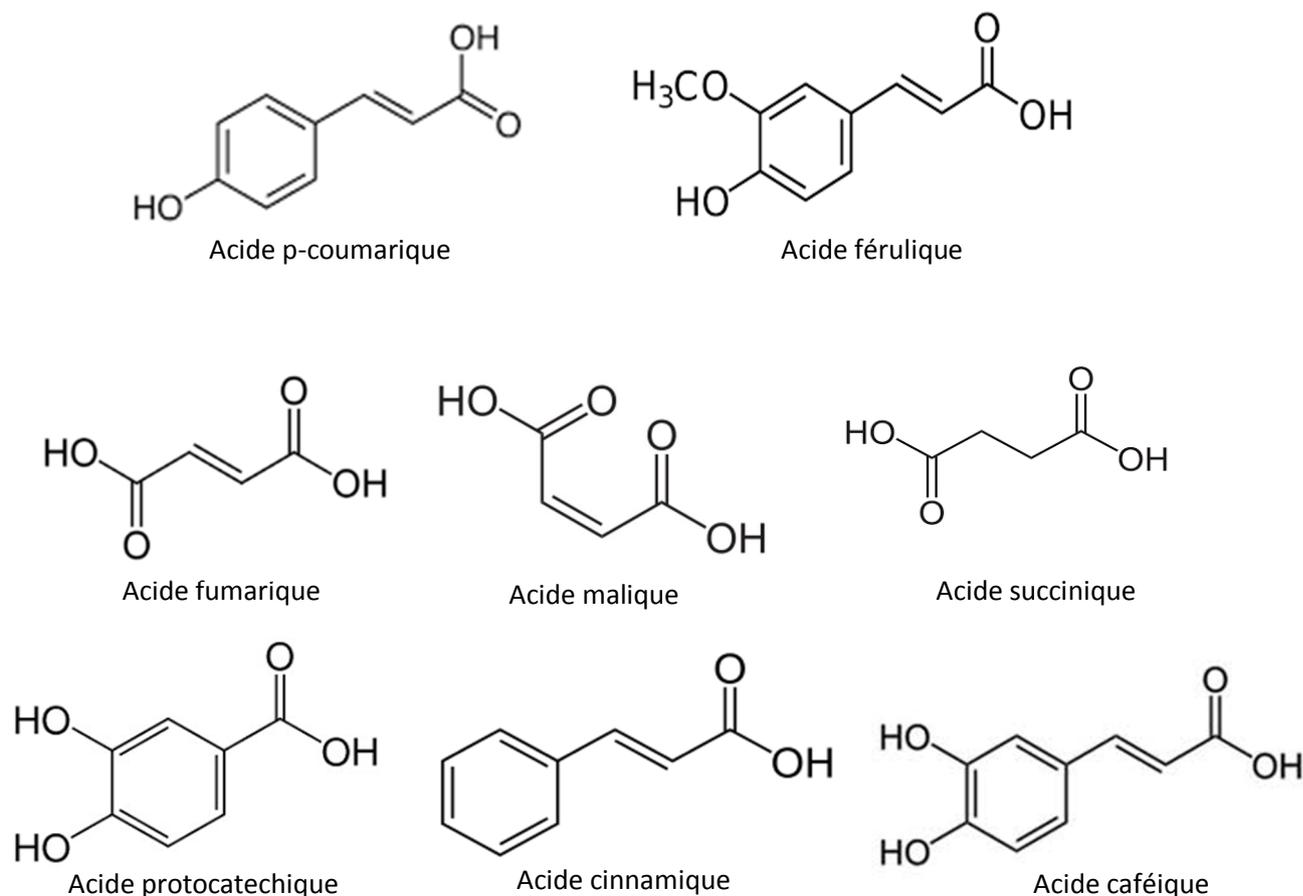


Figure 12 : Structure chimique de quelques acides phénoliques identifiés dans la partie aérienne de *Fumaria agraria*

Il est connu que le type de substituant influence le temps de rétention des molécules à analyser : la valeur de tR diminue en fonction de la substitution du groupe hydroxyle.

Comme nous l'avons décrit dans notre partie théorique, beaucoup de composés naturels sont connus pour leur pouvoir antioxydant. Plusieurs tests *in-vitro* existent afin d'évaluer ce paramètre.

II.3. Mesure de l'activité peroxydasique de l'extrait brut de chou :

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à l'étude de l'efficacité des extraits de *F. agraria* à inhiber l'activité de la peroxydase (extrait enzymatique brut de chou) enzyme responsable du brunissement des fruits et légumes.

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

L'activité enzymatique de la peroxydase est déterminée par une méthode colorimétrique, permettant d'estimer le taux de « **gaiacoquinone** » (produit coloré) issu de l'oxydation du « **gaïacol** » (substrat incolore) en présence d'une molécule d' H_2O_2 .

La représentation graphique $V = f([S])$ (**Fig 13**), montre que l'enzyme « la peroxydase » suit une cinétique Michaelienne vis-à-vis du substrat H_2O_2 . D'après ce graphe, on constate que la relation est proportionnelle entre la concentration et la vitesse enzymatique. Les résultats obtenus sont statistiquement significatifs ($p < 0,05$).

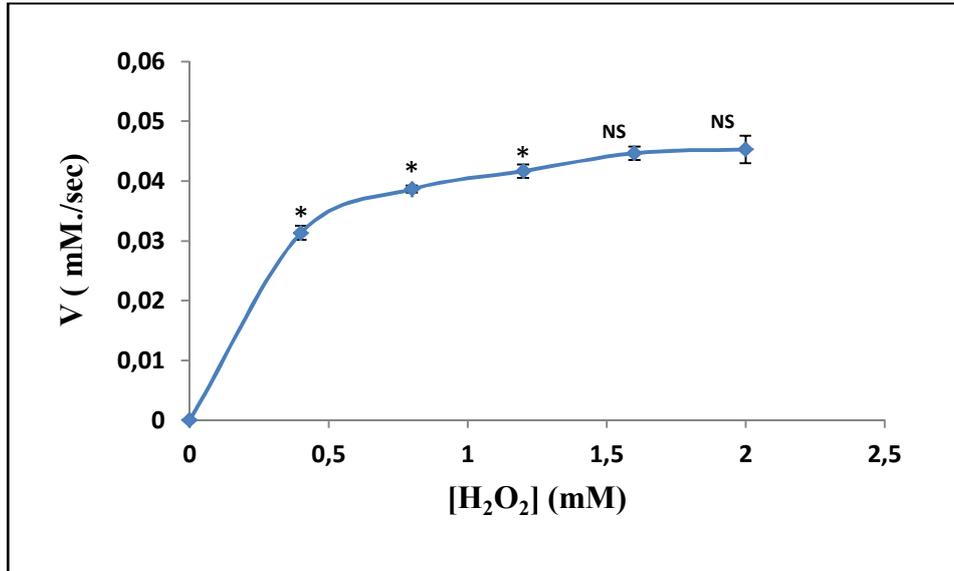


Figure 13 : La cinétique de la peroxydase

De la représentation précédente on procède à la représentation de Lineweaver - Burk $1/V = 1 / ([S])(\text{Fig 14})$ qui nous a permis de déterminer les différents paramètres cinétiques de la peroxydase à savoir la vitesse maximale « $V_{max} = 0,05 \text{ mM} / \text{sec}$ » et la constante de Michaelis - Menten « $K_M = 0,25 \pm 0,02 \text{ mM}$ ». L'étude statistique a montré que les résultats obtenus sont statistiquement significatif ($p < 0,05$).

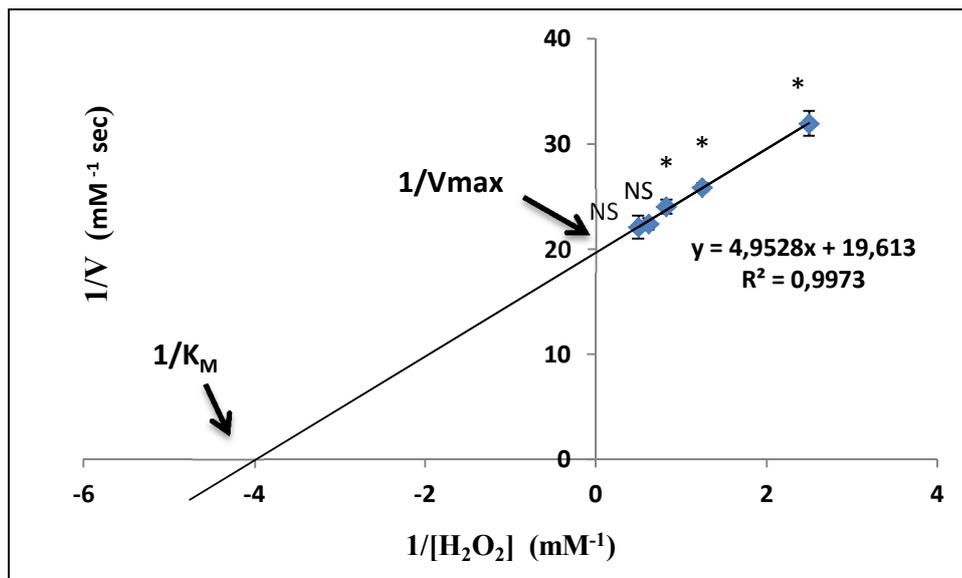


Figure 14 : Représentation de Lineweaver - Burk de la peroxydase

Cette étude a été étendue sur l'aspect cinétique de cette dernière en présence et en absence de nos molécules (extraits de plante) utilisés comme conservateur alimentaire

II.4. Test d'inhibition :

Dans le but de trouver un inhibiteur naturel de la peroxydase pour l'amélioration de la biotechnologie alimentaire en minimisant l'utilisation des additifs chimiques, qui ont une importante gamme de toxicité sur la santé humaine, nous avons donc étudié l'effet des extraits de la partie aérienne de *F. agraria* (**AT**, **FB** et **EAP**) sur l'activité de la peroxydase végétale.

Les mesures ont été effectuées avec le **gaïacol** et l'**H₂O₂** comme substrats de l'enzyme. L'influence du temps d'incubation sur l'inhibition de l'activité enzymatique a été examinée jusqu'à **2 min**. Une absorbance faible en présence de l'additif testé signifie une activité antioxydant élevée.

Les tests d'inhibition ont été effectués pour les différents extraits (**AT**, **FB** et **EAP**) et les taux d'inhibition ont été calculés et résumés dans le **tableau VI**, l'acide caféique « **AC** » a été utilisé comme standard connu pour son activité antioxydant.

Tableau VI : Taux d'inhibition de l'activité peroxidasique par les extrait de *F. agraria* et l'acide caféique.

Additifs (Extrait de plante)	% d'inhibition
AT	42% ± 0,05
FB	50% ± 0,01
EAP	38% ± 0,12
AC	0% (activation)

Selon le tableau ci-dessus (**Tableau VI**) la plus forte inhibition est observée avec la fraction alcoïdique « **FB** » avec **50%** d'inhibition à l'issue des **60 sec** de la réaction catalytique, vient par la suite les extraits « **AT** » et « **EAP** » avec, respectivement, **42%** et **38%** d'inhibition.

Des études menées par **Ponce *et al.* (2004)** ainsi que **Hemeda** et ses collaborateurs (1990) sur un extrait brut de la peroxydase de chou et d'autres végétaux, montrent qu'à des concentrations variables en substances antioxydantes on note une activité anti-peroxydase aussi importante. Par exemple à une concentration minimale inhibitrice [CMI = **0,05 ml/100(v/v)**], cette activité est de **33%** pour les huiles essentielles de « *Syzygium romaticum* », elle est de **35%** dans le cas de l'acide ascorbique (**vitamine C**).

D'après les courbes figurant la variation de l'inverse des vitesses réactionnelles exprimées en « **mM⁻¹ s** » en fonction de l'inverse des concentrations exprimé en « **mM⁻¹** » pour différentes concentrations de substrat (**H₂O₂**) (**Fig15**) ont maintenant la concentration du gaïacol constante, nous avons déterminé le type d'inhibition de chaque échantillon ainsi que les paramètres cinétiques apparents (**V_{max}_{app}** et **K_M_{app}**) en les comparant à la réaction catalytique de la peroxydase en absence de tout effecteur (**Fig 13**).

Les **V_{max}_{app}** et **K_M_{app}** sont calculés à partir de ces graphes, et le type d'inhibition de chaque additif (extrait de plante et standard) est déduit à partir du point de rencontre de ces tracés. **Le tableau V et figure 15** regroupent les différents résultats obtenus.

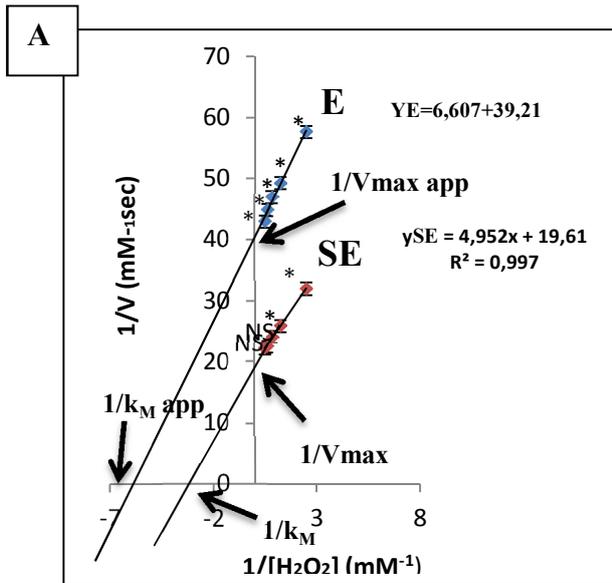


Figure A: Représentation de Lineweaver - Burk de la peroxydase en absence et présence de la fraction alcaloïdique FB

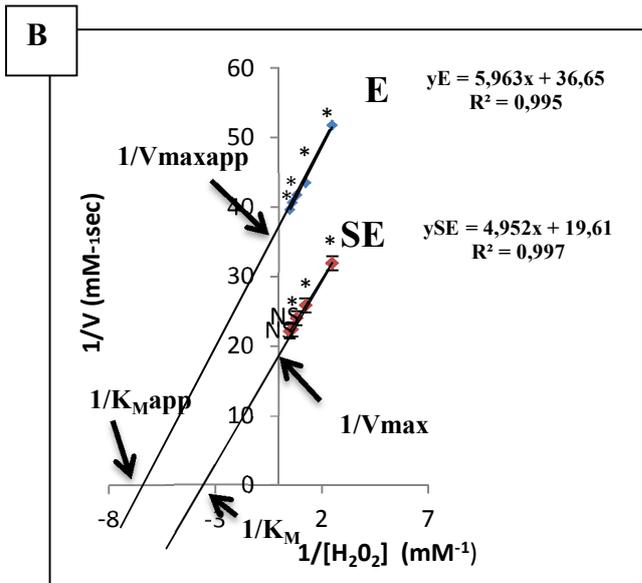


Figure B: Représentation de Lineweaver - Burk de la peroxydase en absence et présence de l'extrait d'alcaloïde totaux

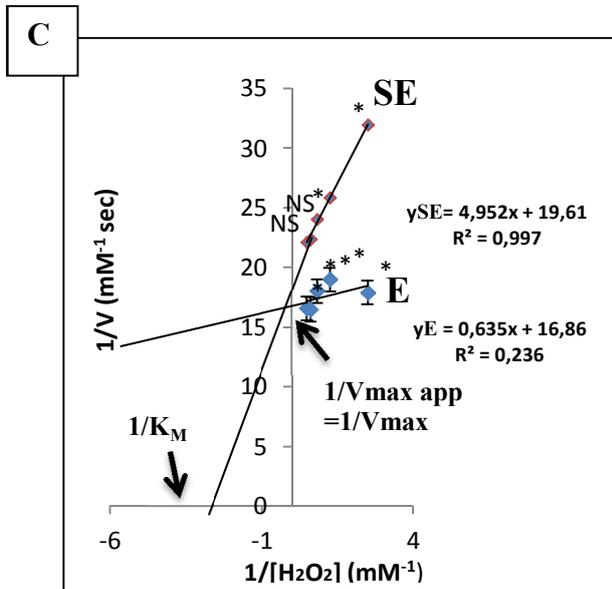


Figure C: Représentation de Lineweaver - Burk de la peroxydase en absence et présence d'acide caféïque

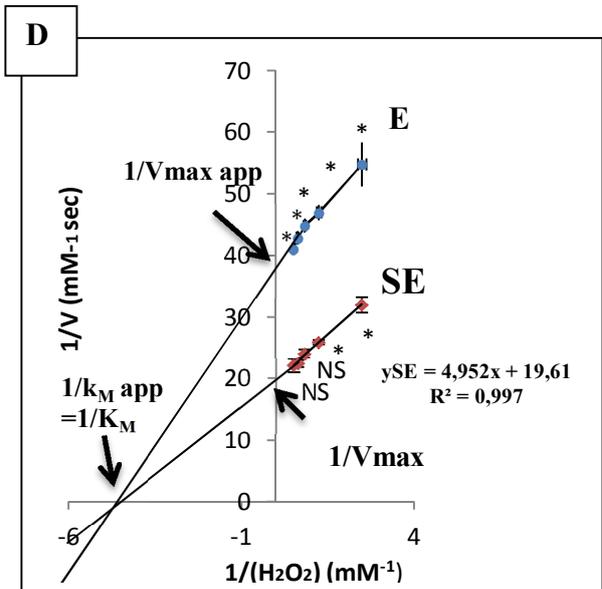


Figure D: Représentation de Lineweaver - Burk de la peroxydase en absence et présence de l'extrait brut d'acide phénol

Figure 15 : Représentation de Lineweaver - Burk de la peroxydase
SE : Sans Effecteur ; E : Effecteur

Partie expérimentale « Chapitre II »

Tableau V : Type d'inhibition et paramètres cinétiques apparents de la peroxydase en présence des extraits de *F. agraria* et standard

<i>La Concentration en extrait (Additif)</i>	<i>V_{max}app (mM . Sec⁻¹)</i>	<i>K_Mapp (mM)</i>	<i>Type d'inhibition</i>
<i>Extrait brut d'acide phénol</i>			
[C]=0,4 mg/ml	0,02 ± 0,002	0,25 ± 0,01	Non-compétitive
<i>Extrait d'alcaloïdes totaux</i>			
[C] =0,4 mg/ml	0,02 ± 0,001	0,16 ± 0,046	In-compétitive
<i>Fraction basique « FB »</i>			
[C] =0,4 mg/ml	0,02 ± 0,004	0,16 ± 0,005	In-compétitive
<i>Acide caféique</i>			
[C] =0,1 mg/ml	0,05 ± 0,002	0,037 ± 0,057	Activation

L'ensemble des résultats obtenus montrent que la totalité des extraits, aqueux (**EAP**) et alcaloïdiques (**AT** et **FB**), de notre plante ont la capacité d'inhiber l'activité de la peroxydase III, en présentant des inhibitions de type : non-compétitive et in-compétitive respectivement.

Un inhibiteur non compétitif classique n'a aucune influence sur la fixation du substrat et réciproquement, les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont distincts. En conséquence, l'inhibiteur se fixe à l'enzyme libre « **E** » et au complexe « **ES** » ; de même, le substrat se fixe à l'enzyme libre « **E** » et au complexe « **EI** ». Les inhibiteurs non compétitifs n'ont pas d'homologie structurale avec le substrat. Ce type d'inhibition est connu cinétiquement par une diminution de **V_{max}** tandis que le **K_M** reste inchangé.

Les résultats de la **GC-MS** de l'**EAP** (**tableau III**) montrent la richesse de cet extrait en acides organiques et phénoliques. Il est important de noter que cet extrait (**EAP**) en plus des composés précédemment cités, il contient d'autres molécules (des glucides, des acides gras...etc) qui sont résumés sur le **tableau IV** (**Annexe 2**).

Il est connu que les acides phénols présentent une analogie structurale au gaïacol (substrat de la peroxydase), qui devraient, théoriquement, présenter une inhibition compétitive. Dans notre cas, l'extrait des acides phénols « **EAP** » présente une inhibition de type non-compétitive, qui peut s'expliquer par la présence d'autres molécules (tel que les glucides ou acides gras) qui empêchent, par un encombrement stérique, l'accès de ces substances (acides phénols) au site actif. Aussi, l'extrait **EAP** est un extrait brut contenant un mélange de molécules de structures variées et qui peuvent être antagonistes.

En ce qui concerne les alcaloïdes (**AT** et **FB**) l'effet inhibiteur qu'ils exercent est de type incompétitive dit aussi « inhibition par blocage du complexe intermédiaire » ; cette appellation décrit mieux le mécanisme : l'enzyme et le substrat forment d'abord le complexe enzyme-substrat (le complexe intermédiaire), puis l'inhibiteur se fixe à ce complexe. Dans ce cas l'alcaloïde se fixe sur un autre site autre que celui du substrat (site actif) vu qu'il est déjà occupé, et du aussi à l'absence d'analogie structurale entre les alcaloïdes et le gaïacol (le substrat). Ce type d'inhibition est essentiellement observé pour des réactions impliquant plusieurs substrats (notre cas).

L'inhibiteur incompétitive est caractérisé par la fixation sur l'enzyme complexé (**ES**). Ce type d'inhibition est connu cinétiquement par une diminution de K_M et V_{max} . En effet, il y a formation d'un complexe ternaire (**ESI**) (**peroxydase-gaïacol-alcaloïde**) non productif. Ce qui est intéressant, c'est que cette inhibition ne peut être "levée" par un excès de substrat puisque plus il y a de substrat, plus il y a formation de complexe **ES** et plus l'équilibre de fixation de l'inhibiteur est déplacé en faveur du complexe ternaire **ESI**.

Dans les réactions catalytiques, plus le K_M est faible, plus l'activité enzymatique maximale est atteinte pour un faible niveau de concentration de substrat. L'affinité de l'enzyme pour le substrat est forte. Il s'agit en général d'enzymes sélectives et/ou très actives. C'est par exemple le cas des peroxydases, qui doivent dégrader des composés toxiques, dès des niveaux de concentrations très faibles (**Delannoy et al., 2013**).

Dans le cas de l'acide caféique, la vitesse maximale apparente (**V_{maxapp}**) de la réaction est la même en fonction de la concentration en comparaison avec la réaction catalytique en absence de tout effecteur (**V_{max}**), tandis que la constante Michaelienne diminue (**K_{Mapp}** < **K_M**) (l'affinité de liaison est élevée). Dans ce cas cet acide phénolique (acide caféique) présente le rôle d'un effecteur activateur en accélérant la réaction d'oxydation du gaïacol (substrat) en gaiacoquinone (produit) sous l'action de la peroxydase, qui se traduit par une augmentation de la « **Do** » en fonction du temps et de la concentration en **H₂O₂** (substrat). Cette activation peut s'expliquer par la notion de dose (concentration) ; autrement dit, l'acide caféique à certaine concentration (**0.1 mg/ml** dans notre cas) se comporte comme un prooxydant et non pas comme un antioxydant (**Defraigne and Pincemail, 2008**).

Conclusion & Perspectives

Conclusion & perspectives

Au cours de la présente étude ayant pour objectif la recherche de nouveaux composés naturels à intérêt conservateur, deux extraits alcaloïdiques (**AT** et **FB**) et un extrait brut d'acides phénols (**EAP**) provenant de la partie aérienne d'une espèce végétale algérienne (Bejaia) « *Fumaria agraria* » choisie sur la base de son utilisation en médecine traditionnelle, ont été évalués à l'aide de méthodes physico-chimiques et biologiques, afin de mettre en évidence les extraits les plus actifs et leur mode d'action.

La méthode d'extraction des alcaloïdes totaux, celle basée sur les propriétés physicochimiques de ces substances (celle utilisée dans notre étude) est assez simple, et a permis de récupérer un bon rendement (**0.72%**) avec une bonne pureté. Ces résultats sont proches à ceux trouvés par d'autres auteurs (**Suauet *al.*, 2002 ; Bougoffa-Sadaoui *et al.*, 2015**). L'extraction par fractionnement de la partie aérienne de *F. agraria* a permis l'obtention de trois fractions alcaloïdiques avec des taux variables : la fraction neutre « FN » **0,4 %**, la fraction acide « FA » **0,05 %** et la fraction basique « FB » **0,27 %**.

L'utilisation de la technique analytique couplée « GC/MS » pour déterminer le profil chromatographique des acides phénols, a permis de mettre en évidence 10 acides phénoliques : L'acide Fumarique est le composant majoritaire identifié, tandis que les l'acide Caféique, acide Oxalique, acide Lactique, esters d'acide Malique, acide Protocatechique, acide p-Coumarique, acide Cinnamique et acide Férulique sont détectés comme des acides phénols mineures

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

L'étude de l'effet des extraits de *F. agraria* sur la peroxydase a montré une activité inhibitrice appréciable, plus importante dans le cas de la fraction **FB** suivi des **AT** et **EAP**. Ce test confirme les capacités antioxydantes de nos extraits (**Maiza-Benabdesselam *et al.*, 2007b**).

Conclusion & Perspectives

La connaissance de type d'inhibition de l'enzyme est un facteur très important dans le choix de l'additif naturel en question (l'extrait de plante). La peroxydase intervient surtout dans les phénomènes de brunissement enzymatique des végétaux qui peuvent avoir des conséquences néfastes sur la qualité organoleptique de nombreux fruits et légumes. Pour pallier cet inconvénient on fait généralement appel à des antioxydants de synthèse (additifs chimiques tel que la vitamine C).

La capacité d'inhibition de cette enzyme par certains extraits végétaux donne une alternative à l'utilisation de ces composés synthétiques. Un approfondissement des connaissances dans ce domaine a pour but d'aider les technologues dans la recherche d'inhibiteurs naturels et non toxiques du brunissement, applicables sur des fruits et légumes frais et/ou transformés.

En résumé, nos travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois l'effet des extraits de la partie aérienne de *Fumaria agraria* sur le brunissement enzymatique des aliments via l'inhibition de la peroxydase III. Des études complémentaires sont à envisagées afin d'évaluer le degré de toxicité de ces additifs naturels (nos extraits). Pour ceci on peut procéder à des tests *in-vivo* sur des animaux de laboratoire (souris) qui recevront ces additifs incorporés dans la nourriture. Ceci nous permettra de contrôler la dose administrés qui peut être plus importante que celle utilisée dans nos tests précédents vu qu'elle subirait le premier passage hépatique ainsi que gastrique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Andrews, J., Malone, M., Thompson, L.C. et Burton, K.S. (2000).** Peroxidase isozyme patterns in the skin maturing tomato fruit. *Plant. Cell and Environement. (23)*, p: 415-422.
2. **Amiot, M.J., Tachini, M., Aubert, S. et Nicolas, J. (1992).** Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci, (57)*, p: 958-962.
3. **Baaziz, M. (1989).** The activity and priliminary characterization of peroxidase in lives of culvors of date palm *Phoenix dactylifera*. *L. New Phitlogiste (111)*, p: 403-411.
4. **Baaziz, M., Qacif, N., Bendiab, K. et Aouad, A. (2006).** Les peroxydases des plantes, aspect théorique et application pratique, Congrès international de Biochimie. *Aghadir. 5p.*
5. **Bouquelet, S. (2008).** Brunissement. Université de Lille 1. http://biochim-agro.univ-lille1.fr/brunissement/co/brunissement_web.html. (15.05.2008).
6. **Bourrier, P. (2006).** Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique Volume 46, Issue 2, March 2006, Pages 68-79
7. **Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} Edition *Lavoisier*, p : 224-228.
8. **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} Edition
a. *Technique et Documentation Lavoisier*, p :784-873.
9. **De Fontenelle, J. & Barthez, M. (1836).** *Nouvau dictionnaire de botanique médicales et pharmaceutique. Edition Pris*, p : 340.
10. **Debuigne, G. (1991).** *Dictionnaire des plantes qui guérissent*. Paris : Larousse. p. 74.
11. **Defraing, J. O., Pincemail, J. (2008).** Stress oxydant et antioxydant: mythes et réalités. *Rev Med Liège* 2008; 63 : Synthèse 10 2008 : 10-19.
12. **Delannoy et al;** licensee BioMed Central Ltd. 2013; Human streptococcus agalactiea strains in aquatic mammals and fish.
13. **Dutau G.** Additifs. In: **Dutau G**, editor. *Le dictionnaire des allergènes*. 3e éd. Paris: Phase 5; 2002. p. 12–3.

14. **Fayad-Dahouk, N. (1998).** Etude de traitements alternatifs à l'utilisation du sulfite comme moyen de prévention du brunissement enzymatique. *Thèse Doct., Université de Paris VII. p: 170.*
15. **Frzana, A. (1997).** Isolation and structural studies on the chemical constituents of *Withania somnifera*, *Fumaria falabellata* and X-ray diffraction studies. *International center for chemical science H.E.J. research institute of chemistry, university of Karachi.*
16. **Gilani, A. H., Bachir, S., Janbaz, K. H. et Khan, A. (2005).** Perspective paper. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology, (100), p: 43-49.*
17. **Hemeda, H.M & Klein B.P. (1990).** Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of Food Science. 55(1), p: 184-186.*
18. **Haroumi, A. & Nacef, M. (1979).** 100 Plante médicinales Algérienne. *Edition Kassr al kitab.*
19. **Hopkins, W., Rambourg, S., Charles-Marie Evrard, C. M. (2003).** Physiologie végétales. 2^{ème} Edition De Boeck. *Patri2 Chapitr14, p267-281.*
20. **Idres, A. & Madi, R. (2017).** Dictionnaire Universel Bilingue Français Tamazight. *Edition Jazz, Alger.*
21. **Lee, J., Koo, N. et Min, D.B. (2004).** Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Saffety, (3), p: 21-33.*
22. **Leong and Shui, 2002.** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets *Food Chemistry, 76 (1) (2002), pp. 69-75.*
23. **Maciel, H.P.F., Gouvea, C. M.C. P., Toyama, M., Smolka, M., Marangoni, S. et Pastore, G.M. (2007).** Extraction purification and Biochemical characterization of a peroxylase from. *Quim. Nova. (30).*
24. **Maiza-Benabdesselam, F., Chibane, M., Madani, K., Max, H. et Adach, S. (2007).** Determination of isoquinoline alkaloids contents in two Algerian Species of *Fumaria (Fumaria capreolata and Fumaria bastardi).* *African journal of Biotechnolog. 6 (21), 6p.*
25. **Marchand, F., Forget, J. F. et Thera. (2004).** Dictionnaire des médicaments conseil et produits de parapharmacie. *Edition VIDAL (143).*

26. **Néve, J. (2002).** Selenium as a nutraceutical: How to conciliate physiological and supranutritional effects for an essential trace element. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (5), p: 659–663.

27. **Pacor, ML, Di Lorenzo G, Corrocher R.** Efficacy of leukotrien receptor antagonist in chronic urticaria. A double-blind, placebo-controlled comparison of treatment with montelukast and cetirizine in patients with chronic urticaria with intolerance to food additive and/or acetylsalicylic acid. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:1607–14.

28. **Peschel, W., Rabaneda, F.S., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jiménez, D., Raventos, R.L., Buxaderas, S. et Codins, C. (2005).** An industrial approach in the natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* (article in press).

29. **Ponce, A.G., Dell Valle, C.E. et Roura, I.S. (2004).** Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* (37), p: 199-204.

30. **Rani, D.N & Abraham, T. E. (2006).** Kinetic study of a purified anionic peroxydase isolated from *Eupatorium odoratum* and its novel application as time temperature indicator for food materials. *Journal of Food engineering.* (77).

31. **Raven, P. H., Ray, F. E. et Susan, E. (2003).** Biologie végétale. 6^{ème} Edition boeckcapitres : 2 composés moléculaires de la cellule végétales, p : 32-35.

32. **Raynaude, J. (2005).** La Fumeterre (*Fumaria officinalis*). *Institut Européen des substances végétales.* 2p.

33. **Ribereau –Gayon P. (1968)** – Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod ; p : 5-7, 10-13, 55-86.*

34. **Salinas, M .J., Romer, A.T., Blanca, G., De la Herran, R., Garrido- Ramos, M., Ruiz Rejon, C., Morales, C., Ruiz- Rejon, M. et Suarez, V. (2003).** Contribution to the Taxonomy and Phylogeny of *Sarcocapnos* (DC). (*Fumariaceae*). *Plant Systematic Evolution.* (237), p: 153-164.

35. **Santavy, F. (1970).** In the Alkaloids. *Edition R. H. F Mansk Academic press, New York.* (12), p: 333.

36. **Shakil, A. (1998).** Isolation and structural elucidation of chemical constituents from *Fumaria indica*, *Ferula oopoda* and *Withania somnifer*. These de Doctorat. *International center for chemical research, university of Karachi.*

37. **Sousek, K. J. & Valesova, M. (1995).** Chemical components of genus *Fumaria*. *Phytochemical Analysis.* (89), p: 489-500.

38. **Sousek, K.J., Guedon, D., Adam, T., Bochorakova, H., Taborska, E., Valka, I. et Simanek, A. (1999).** Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species. *Phytochemical Analysis.* (10), p: 6-11.

39. **Suau, R., Cabezudo, B., Ricor, R., Lopez-Romero, J. M. et Najera, F. (2002).** Direct determination of alkaloids contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phytochem Anal.* (13),p: 363-367.
40. **Susplugas, J., Massa, V., Susplugas, P., Taillade, R., Mme. Susplugas, C. et Salabert, J. (1975).** Fumeterres en Languedoc Roussillon. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* (32).
41. **Worm M, Vieth W, Ehlers I, Sterry W, Zuberbier T.** Increased leukotriene production by food additives in patients with atopic dermatitis and proven food intolerance. *ClinExp Allergy* 2001;31:265–73.
42. **Wüthrich B.** Adverses reactions to food additives. *Ann Allergy* 1993;71: 379–84.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1 : Matériel et produits utilisés

1- Appareillage :

- Ampoule a décanté.
- Balance de précision : BP 310P
- Barreaux magnétique.
- Bêchers.
- Broyeur.
- Burette.
- Centrifugeuse.
- Entonnoir.
- Éprouvette gradué.
- Etuve : BINDER BD 53.
- Fioles
- Hotte.
- Micropipette.
- pH mètre : WTWPH 422.
- Pipette.
- Rotavapor : Heidolph.
- Soxhlet : BEHR labortechnik.
- Spatule métallique.
- Spectrophotomètre UV-visible SHIMADZU 1240.
- Tubes à essais.
- Verre de montre.

2- Produits chimique :

- Ammoniaque.
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3).
- Chloroforme.
- Eau distillée.
- Ethanol.
- Ether de pétrole.
- Sulfate de magnésium.
- Tampon phosphate (pH= 6 .6, M= 0 .2).

ANNEXES

Annexe 2 : Résultats et discussion

Tableau IV : les composés identifiés dans l'extrait brut de la partie aérienne de *F.agraria*

Composé (tR min)	Formule chimique	Abondance relative (% en acide fumarique)*
Acide lactique (9,64)	C ₃ H ₆ O ₃	0,69
Hydroxylamine (11,29)	H ₃ NO	1,15
Acide oxalique (12,4)	C ₂ H ₂ O ₄	0,8
Acide lactique (17,37)	C ₃ H ₆ O ₃	0,46
Acide succinique (17,65)	C ₄ H ₆ O ₄	1,15
Acide fumarique (18,7)	C ₄ H ₄ O ₄	100
Esters d'acide malique (22,05)	C ₄ H ₆ O ₅	0,57
Acide protocatechique (29,65)	C ₇ H ₆ O ₄	0,2
Acide oxalique (12,4)	C ₂ H ₂ O ₄	0,23
D-fructose (30,25)	C ₆ H ₁₂ O ₆	4,48
D-fructose (30,46)	C ₆ H ₁₂ O ₆	4,48
D-galactose (30,75)	C ₆ H ₁₂ O ₆	8,51
D-galactose (31,15)	C ₆ H ₁₂ O ₆	1,38
Acide p-coumarique (32,32)	C ₉ H ₈ O ₃	1,26
Acide cinnamique (33,58)	C ₉ H ₈ O ₂	0,34
Acide palmitique (34,26)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1,49
Acide férulique (35,23)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0,92
Acide caféique (35,88)	C ₉ H ₈ O ₄	1,26
Acide stéarique (37,8)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	2,53

Résumé :

Fumaria agraria est une plante de la famille des *Fumariaceae*, qui sont réputées pour leurs multiples utilisations thérapeutiques. Ces propriétés pharmacologiques sont dues à leur richesse en substances actives, notamment en alcaloïdes isoquinoléiques. Nous nous sommes intéressées d'une part à l'extraction des acides phénols « EAP », des alcaloïdes totaux « AT », des fractions alcaloïdiques et leur dosage. D'autres parts une évaluation de l'activité antioxydante vis-à-vis de la peroxydase du chou par spectrophotométrie a été tentée. La méthode d'extraction a permis la récupération d'un rendement de 0.72% d'AT, des taux variables des fractions alcaloïdiques : FN (0,4%) FA (0,05%) et FB (0,27%). Les substances alcaloïdiques (AT et FB) ainsi que phénoliques (EAP) ont démontré une activité inhibitrice vis-à-vis de la peroxydase, de types non-compétitif et incompétitif respectivement. Le taux d'inhibition allé jusqu'à 50% dans le cas de la FB. La GCMS de « EAP » a montré sa richesse en acides phénols avec dominance de l'acide fumarique.

Mots clés : *Fumaria agraria*, alcaloïdes isoquinoléiques, acides phénoliques, antioxydants, peroxydasique, GCMS, protopine

Abstract:

Fumaria agraria is a plant that belongs to the family of *Fumariaceae*. They are known for their several therapeutic uses. Their pharmacologic characteristics are due to the richness of these plants in active substances especially in isoquinoline alkaloids. In our study, we were interested, first to the extraction and proportioning of the alkaloids of these plants in addition to the extraction of phenolic compounds. In the second, a study of the antioxidant activity of our extracts was determined by measuring the inhibition of peroxidase activity. Rates of alkaloids recorded were respectively of 0,72% of total alkaloids "TA", 0,4% of neutral fraction "NF", 0,05% of acid fraction "AF" and 0,27% of the basic fraction "BF". Alkaloids and phenolic acids present non-competitive and un-competitive inhibitions on the peroxidase activity respectively. An inhibition percentage of 50% was obtained with the alkaloids extract "BF".

Key words: *Fumaria agraria*, isoquinoline alkaloids, phenolic acids, oxidants, anti-peroxidase activity

المخلص:

فوماريا أغراريا من فصيلة فومارياسية هذه الاخيرة تتميز باستعمالاتها العلاجية الواسعة كما ان لها خصائص صيدلية معتبرة نظرا لغناها بالمركبات النشطة خاصة المركبات العضوية الألكيدية، وتطرقنا من خلال دراستنا هذه من جهة الى استخلاص وتعيين الاحماض العضوية (EAP) والمركبات العضوية الألكيدية (AT) كما تم تحديد تركيزاتها ، و من جهة اخرى تقييم نشاط هذه المركبات المضادة للأكسدة وقدراتها على تثبيط انزيم البيروكسيداز النباتي المستخلص من الكرنب (الملفوف) عن طريق دراسة حركية الامتصاص الضوئي، سمحت طريقة الاستخلاص لفوماريا أغراريا بتحديد المردودية لكل من المركبات العضوية الألكيدية وتقرب 0.72 % ونسب مختلفة من المردودية لكل من المركبات الألكيدية وتقدر نسب هذه المستخلصات على التوالي ب 0.4% (FN) و 0.05% (FA) اما المستخلص (FB) فنسبته قدرت ب 0.27%. ان المركبات الألكيدية والاحماض الفينولية اظهرت قدرتها على تثبيط انزيم البيروكسيداز بطرق مختلفة للتثبيط اللاتنافسي (AT) (FB) وغير تنافسي بالنسبة (EAP) حيث وصلت قدرة التثبيط حوالي 50 % بالنسبة للمستخلص (FB). كما اظهرت دراستنا لمستخلص الاحماض الفينولية عن طريق الكروماتوغرافيا الغازية المتصلة بالحزم الالكترونية (GCMS) بغناها بالاحماض الفينولية وخاصة المركب العضوي حمض الفوماريك .

كلمات البحث: فوماريا أغراريا ، المركبات العضوية الألكيدية ، الاحماض العضوية ، المركبات المضادة للأكسدة، لبيروكسيداز.