

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

Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention d'un diplôme d'études supérieures
En Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option : Biochimie

Thème

Activité antioxydante des alcaloïdes de
Fumaria capreolata et de Peganum
harmala

Présenté par :

M^{elle} : Abbas Sabrina

M^{elle} : Boumaza Ouahiba

Membres de Jury :

Président: M^r NABTI. A

Promoteur: M^r BRIBI. N

Co-promotrice: M^{elle} BENSALÉM. S

Examineur: M^r TACHERFIOUT. M

Promotion 2011/2012

Remerciements

Tout d'abord, nous exprimons nos remerciements au Bon Dieu de nous avoir donné le courage et la force d'aller au bout de nos fins pour terminer notre travail et pour sa bienveillance.

*Notre profonde gratitude va à notre promoteur Mr **BRIBI**, pour l'honneur qu'il nous a fait de nous encadrer, pour ses précieux conseils, ses orientations et la confiance qu'il a mit en nous, et pour avoir suivi notre travail avec une extrême bienveillance.*

❖ *A notre Co-promotrice M^{elle} **BENSALEM** qui nous a beaucoup aidé, pour sa disponibilité, sa patience à chaque fois que nous avons eue besoin de ses services et sa bonne humeur.*

On tient également à exprimer nos sincères remerciements à :

❖ *Mr **NABTI** d'avoir accepté de présider le jury et de juger notre travail.*

❖ *Mr **TACHERFIUOT** de nous acceptés d'examiner notre travail.*

*L'ensemble du personnel de laboratoire de l'animalerie en particulier **SAIDA** et **NOURA***

Nous adressons nos sincères remerciements également à tous ceux qui ont contribués de loin où de près à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

En premier, je remercie Dieu tout puissant qui ma gardé en bonne santé afin de faire ce modeste travail et qui ma permet de vivre ce bonheur.

Je dédie ce modeste travail,

A la mémoire de mon père que j'ai bien aimé qu'il soit présent (que dieu le gardé dans son vaste paradis)

A ma chère maman pour ses encouragements, ses multiples soutiens et son affection quotidienne, Merci d'être présente dans toutes circonstances. Je prie le tout puissant de vous donner une longue vie et de nous aider à être toujours votre fierté.

A mes cher frère Karim et Nabil pour leurs sacrifices.

Mes très chères sœurs : Nadia, Karima, Nadira et Katia

A mes beaux frère : Ahmed et El-hassen

A notre petit adoré Daoud

A toute la famille Abbas , Allouache et tous mes voisins

Enfin, à tous ceux de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, en guise de reconnaissance.

A toutes mes copines et mes amis de la promo D-E-S Biochimie

Sabrina A.

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail à



◆ Mes chers parents qui ont tout sacrifié pour moi et dont les mots sont insuffisants pour exprimer toute ma gratitude et mon profond amour qu'ils trouveront ici. Je les remercie pour leur confiance et « que Dieu leurs accordent une très longue vie ».

◆ Mon cher mari **Lemnouar** qui m'a donné le courage et le soutien tout au long de mes années d'études et qui m'a entouré de ses précieux conseils et sa famille.

◆ Mes adorables frères (**Mokhtar et sa femme, Youcef et sa femme, Zahir, A/Hafid et Imad**), ainsi le petit bébé de mon frère qui n'est pas encore née.

◆ Ma chère sœur **Lynda** et son mari **Zahir**

◆ Mon grand père et ma grand-mère.

◆ Tous mes amis (es) (**Feroudja, Azzedine, djidji, Zina, Karima, Khalida Said, Sofiane, Nacer, Mourad, Faouzi, Malek, Djamel, Nassima, Habou, Samou, Naou, Bahou, Farou, Sofiane et sa copine Warda, Mouloud et sa fiancée,...**

◆ Mes oncles et leurs familles.

◆ Atouts(es) mes cousins et mes cousines.

◆ Mes chères nièces (**Ayman, Nor Han**)

◆ Mes chères petit **chayma, lyna et Nor Islam**

◆ Toute la promotion de **BIOCHIMIE, SCIENCES ALIMENTAIRES, et CONTROLE DE QUALITE (2012)**.

◆ Tous les résidents d'Aamriw surtout la chambre **D102**.

◆ Tout le personnel de laboratoire surtout notre Co-promotrice **Siham**

◆ Enfin, à tous ceux de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, en guise de reconnaissance.



Oua

Created with

 **nitroPDF** professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

Liste des abréviations

ABTS: Sel d'ammonium de l'acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazole-6-sulfonique).

ABTS^{•+}: Radical ABTS.

ATF : Alcaloïdes Totaux de *F. capreolata*.

At : Absorbance du Test

Atp : Absorbance du Temoin Positif (solution hypotonique)

ATPA : Alcaloïdes Totaux de la Partie Aérienne.

ATR : Alcaloïdes Totaux de la Racine.

ATSE : Alcaloïdes Totaux de la Graine.

DPPH: 2,2-Diphényl 1-Picryl Hydrazyle.

EetPa: Extrait Ethanolique de *P. harmala*.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

GPx : Glutathion Peroxydase.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucleotides Phosphate

¹O₂ : l'Oxygène Singulet.

•OH : Radical Hydroxyl.

ONOOH : Nitroperoxyde.

RL : Radical Libre.

RPM : Tour Par Minute.

SOD: Superoxyde Dismutase.

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

Liste des figures

Figure N°01 : Photographie de <i>Fumaria capreolata</i>	02
Figure N°2 : Photographie de <i>Peganum harmala</i>	03
Figure N°3 : Structure des hétérocycles constituant le noyau de base des alcaloïdes.....	05
Figure N°4 : Biosynthèse des alcaloïdes.....	06
Figure N°5 : Structure chimique de quelque alcaloïde isoquinoléiques.....	08
Figure N°6 : Structure chimique de quelque alcaloïdes carboliniques.....	09
Figure N°7 :Les principales étapes de la production des espèces réactives de l'oxygène.....	12
Figure N°8 : Principales cibles des ERO.....	13
Figure N°9 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydants.....	14
Figure N°10 : Réaction entre l'acide ascorbique et un radical (R [•]).....	15
Figure N°11 : Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux de <i>F. capreolata</i> et <i>P. harmala</i>	17
Figure N°12 : Protocole du pouvoir réducteur.	18
Figure N°13 : Protocole Scavenging du radical DPPH.....	19
Figure N°14 : Protocole Scavenging du radical ABTS.....	20
Figure N°15 : Protocole scavenging H ₂ O ₂	21
Figure N°16 : Protocole du test de la chélation du fer.....	22
Figure N°17 : Pouvoir réducteur des extraits de <i>F. capreolata</i> et de <i>P. harmala</i>	24
Figure N°18 : Effet scavenging contre le radical DPPH des extraits de <i>P. harmala</i>	25
Figure N°19 : Effet scavenging contre le radical DPPH des extraits de <i>F. capreolata</i>	26
Figure N°20 : Capacité antioxydant équivalent trolox (TEAC) des extraits de <i>F. capreolata</i> et de <i>P. harmala</i>	27

Figure N°21 : Effet scavenging contre le radical ABTS des extraits de <i>F. capreolata</i> et de <i>P. harmala</i>	28
Figure N°22 : Le mécanisme d'action des alcaloïdes beta-carboliniques	29
Figure N°23 : Effet Scavenging de H ₂ O ₂ des extraits de <i>P. harmala</i> et de <i>F. capreolata</i>	30
Figure N°24 : Chélation du Fer ferreux par les extraits de <i>P. harmala</i>	32
Figure N°25 : Chélation du Fer ferreux par l'extrait de <i>F. Capreolata</i>	32
Figure N°26 : Effet hémolytique des extraits de <i>f. capreolata</i> et de <i>P. harmala</i>	31
Figure N°27 : Photographie des globules rouges observées sous microscope optique (GX100) traités par les alcaloïdes de <i>F. capreolata</i> et de <i>P. harmala</i>	34
Figure N°28 : photographie des globules rouges observée sous microscope optique (GX100) non traités (control négative).....	35

List des tableaux

Tableau I: Les alcaloïdes de certaines espèces de <i>Fumaria</i>	07
Tableau II: Sources, concentration, demi-vie et effets biologiques de principales espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	10
Tableau III : IC50 des extraits de <i>P. harmala</i> et de <i>F. capreolata</i> contre le radical DPPH.....	25
Tableau IV: IC50 de la chélation du fer des extraits de <i>P. harmala</i> et de <i>F. capreolata</i>	31

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01

Chapitre I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. généralités sur <i>Fumaria capreolata</i> et <i>Peganum harmala</i>	02
I.1. Fumeterre.....	02
I.1.1. Classification botanique de <i>Fumaria capreolata</i>	02
I.1.2. Composition chimique et effets pharmacologiques de <i>Fumaria capreolata</i>	02
I.2. Peganum	03
I.2.1. Classification botanique de <i>Peganum harmala</i>	03
I.2.2. Composition chimique et effet pharmacologique de <i>Peganum harmala</i>	03
I.3. Les alcaloïdes	04
I.3.1. Propriétés physico-chimiques.....	04
I.3.2. Classification des alcaloïdes.....	04
I.3.3. Biosynthèse des alcaloïdes	05
I.3.4. Les alcaloïdes de <i>Fumaria</i>	07
I.3.5. Les alcaloïdes isoquinoléiques de <i>Fumaria</i>	07
I.3.6. Les alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i>	08
I.4. Les radicaux libres et les antioxydants	10
I.4.1. Les radicaux libres.....	10
I.4.1.1. Production des radicaux libres.....	12
I.4.1.2. Le stress oxydant	12
I.4.1.3. Effets pharmacologiques des radicaux libres.....	13
I.4.2. Les antioxydants.....	13
I.4.2.1. Classification des antioxydants	14
I.4.2.1.1. Antioxydants endogène.....	14
I.4.2.1.2. Antioxydants exogènes	15

Chapitre II

Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes.....	16
II.1. Matériel.....	16
II.1.1. Matériel végétal.....	16
II.1.2. Matériel et réactifs.....	16
II.2. Méthodes.....	16
II.2.1. Séchage.....	16
II.2.2. Extraction des alcaloïdes de <i>F.capreolata</i> et <i>P.harmala</i>	16
II.2.3. Détermination du pouvoir réducteur des alcaloïdes	18
II.2.4. Activité scavenger du radical 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	19
II.2.5. Effet scavenging du radical ABTS	19
II.2.6. Effet scavenging de H ₂ O ₂	21
II.2.7. Chélation du fer ferreux	21
I.2.8. Test de cytotoxicité	22

Chapitre III

Résultats et discussion

III. Résultats et discussions.....	23
III.1. Taux d'extraction des alcaloïdes de <i>F. capreolata</i> et <i>P. harmala</i>	23
III.2. Pouvoir réducteur de <i>Fumaria capreolata</i> et de <i>Peganum harmala</i>	23
III.3. Effet «scavenging» sur le radical stable DPPH.....	24
III.4. Effet scavenging du radical ABTS.....	27
III.5. Effet scavenging de peroxyde d'hydrogène « H ₂ O ₂ ».....	29
III.6. Chélation du fer.....	31
III.7. Effet cytotoxique des extraits de <i>F. capreolata</i> et <i>P. harmala</i>	33
<i>Conclusion</i>	36

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

L'oxygène est un élément indispensable à notre survie, à notre développement lors de sa prise régulière, mais dans le cas contraire, il peut être très toxique. Cette toxicité est due à la formation de diverses espèces chimiques qui sont généralement des radicaux libres, dotées des propriétés oxydantes importantes (Kœchlin-Ramonatsco, 2006).

Dans les conditions physiologiques, cette production est contrôlée par diverses molécules qui sont définies comme étant des antioxydants possédants la capacité de neutraliser ces composés très réactifs et de réduire leur nocivité (Berger, 2006).

Cependant, dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution de défense antioxydant on parle alors du stress oxydant à l'origine bien souvent d'altérations moléculaires (protéines, lipides, ADN et glucides) participant à l'apparition de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, maladies cardiovasculaires...etc. (Baudin, 2006).

Depuis des siècles, les plantes médicinales sont considérées comme une source majeure des produits utilisés en thérapeutique. Ces plantes sont douées de cette efficacité, à cause de leurs métabolites secondaires notamment les composés phénoliques, les alcaloïdes, les huiles essentielles,...etc. (Richter, 1993). Les alcaloïdes sont les agents actifs les plus abondants dans les extraits de plusieurs plantes médicinales, ou de plus en plus des études s'accroissent sur leurs effets et activités biologiques, notamment antioxydants (en neutralisant les radicaux libres et en inhibant la peroxydation des lipides...), anti-inflammatoires, anti-bactérienne, afin de remplacer les molécules synthétiques susceptibles de provoquer des effets secondaires au niveau de la cellule (Lin et *al.*, 2002 ; palanisamy, 2008).

Ainsi, l'objectif de notre travail consiste à déterminer l'efficacité des extraits de *Fumaria capreolata* et *Peganum harmala* qui sont des plantes locale utilisée en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire (rhumatismes, arthrites, goutte...), à inhiber la peroxydation lipidique, et des propriétés antioxydants des alcaloïdique de deux plantes à savoir l'activité de chélation du fer, l'effet scavenger de plusieurs radicaux, l'étude du pouvoir réducteur et le test de cytotoxicité.

Partie théorique

Chapitre I

Synthèses bibliographique

I.1. Généralités sur *Fumaria capreolata* et *Peganum harmala*

I.1. Fumeterre

La fumeterre vient du mot latin « fumus », fumée de terre à cause de ses propriétés lacrymogènes. Fumariaceae est une petite famille d'environ 19 genres et de 400 espèces. Est une plante annuelle très commune dans les lieux cultivés remués dans toutes nos régions. Elle est répartie principalement en Amérique du Nord, l'Europe, en Asie et en Afrique, se trouve en abondance à l'état sauvage, sur les terres cultivées, au bord des chemins, dans les terrains défrichés et dans les champs. Connue par des médecins de l'antiquité, elle est selon la tradition populaire un stimulant biliaire ; c'est «herbe à la jaunisse» (Bruneton, 1999 ; Larousse, 2001 ; Perveen et Qaiser, 2004 ; Delille, 2010).

I.1.1. Classification botanique de *Fumaria capreolata* (Bastow et al, 1990).



Règne	<i>Planta</i>
Famille	<i>Fumariaceae</i>
Genre	<i>Fumaria</i>
Espèce	<i>Fumaria capreolata</i>

Figure N°01 : Photographie de *Fumaria capreolata* Bejaïa (mars, 2012)

I.1.2. Composition chimique et effets pharmacologiques de *Fumaria capreolata*

Comme toutes les plantes, les espèces de la fumeterre sont composées de métabolites primaires voir des acides aminés, des polysaccharides hétérogènes ainsi que des sels potassiques. De plus, le genre *Fumaria* est très riche en métabolites secondaires notamment en alcaloïdes isoquinoléine (Protoberberines, Protopines,...etc), des acides organiques (acide caféique, acide fumarique, acide malique,...etc) et des flavonoïdes comme de la «Rutine» (Bruneton, 1999 ; Souseck et al, 1999).

Les préparations à base de fumeterre sont traditionnellement utilisées pour faciliter l'élimination urinaire et digestive. Son extraordinaire richesse en principe actifs lui vaut des propriétés multiples à savoir ; dépurative, diurétique, spasmolytique...etc. Elle est surtout intéressante pour son action bénéfique sur le flux biliaire grâce à sa richesse en fumarine qui aide à régulariser le fonctionnement hépatobiliaire, contribuant ainsi à dissiper les troubles liés à la

digestion. L'effet analgésique exercé par la « Protopine» est utile en cas de nausées (Bruneton, 1999 ; Wichtl et Anton, 2003).

I.2. Peganum

Peganum harmala, ou rue syrienne, est une plante de la famille Zygophyllaceae connue localement sous le nom de Harmel. Est une Herbacée de 30 à 90cm de hauteur, à rhizome épais et vivace. Les feuilles sont irrégulièrement divisées, les fleurs blanches avec des sépales persistants qui dépassent la corolle, le fruit est une capsule déprimée au sommet. Elle est répandue surtout dans les zones arides, en Europe; très commune (Espagne, steppes de la Russie et Hongrie); en Afrique, particulièrement dans les zones arides méditerranéennes (Maroc oriental, Sahara septentrional et hauts plateaux Algériens, Tunisie, steppes de la Lybie, déserts d'Egypte); et en Asie: répandue dans les steppes de l'Iran, du Pakistan et du Turkestan. Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle. c'est une plante riche en alcaloïdes carbolinique (Paris et Lemann, 1960 ; Abbassi et *al.*, 2003).

I.2.1. Classification botanique de *Peganum harmala* (Quezel et Santa, 1963).



Règne	<i>Planta</i>
Famille	<i>Zygophyllaceae</i>
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Peganum harmala</i>

Figure N°2 : Photographie *Peganum harmala* (Larousse, 2001)

I.2.2. Composition chimique et effet pharmacologique de *Peganum harmala*

Harmel est très connu par sa richesse exceptionnelle en alcaloïdes de type carbolinique (harmine, harmaline, harmane, harmalol, harmol et harmalidine), ainsi que des alcaloïdes de type quinazolinique (péganine, péganol, vasicine, oxyvasicine et désoxyvasicine). En plus des alcaloïdes *P. harmala* contient des huiles, qui sont composées majoritairement des acide gras des flavonoïdes glycosiliques (Neitlesbip et Slaytor, 1971; Tahrouch, 2002).

Les substances bioactives de cette plante, possèdent plusieurs activités pharmacologiques telle que: une activité antibactérienne (la destruction de fragment d'ADN de *Staphylococcus aureus*) (Nenaah, 2010; Darabpour et *al.*, 2011), une activité antitumoral (Lamchouri et *al.*, 2000; El Gendy et *al.*, 2012), une activité antioxydant et une activité antiviral. Elle a un effet anti-

inflammatoire (inhibe les facteurs pro-inflammatoires des monocytes) (Hadieh *et al.*, 2010), anti-Alzheimer (inhibe l'activité acétylcholinestérase) (Zheng, 2009), antihistaminique et un effet hypoglycémiant. Egalement c'est une plante qui stimule le système nerveux central dans le cas d'encéphalite léthargique (Berrougui *et al.*, 2006).

I.3. les alcaloïdes

Ce sont des substances naturelles provenant essentiellement des plantes et contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Ce sont des composés relativement stables, stockés dans les plantes en tant que produits des différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine ou le tryptophane. (Guignard, 1979 ; Bruneton, 1999).

I.3.1 Propriétés physico-chimiques

Les alcaloïdes ont des masses moléculaires variant de 100 à 900 kDa. La plupart des bases non oxygénées sont liquides à température ordinaire (nicotine, spartéine, coniine), celles qui comportent dans leur formule de l'oxygène, sont normalement des solides cristallisables, rarement colorés (berbérine). Presque toujours capables de dévier la lumière polarisée (Bruneton, 1999).

Les alcaloïdes sont des composés à caractère basique ; ils donnent des sels avec les acides. Leur solubilité dans les différents solvants varie en fonction du pH, c'est-à-dire selon qu'ils se trouvent à l'état de bases ou à l'état de sels :

a. sous forme de bases, ils sont solubles dans les solvants organiques non polaires (benzène, éther éthylique, chloroforme, chlorure de méthylène...etc.), solubles dans les solvants organiques polaires (alcools) et insolubles dans l'eau.

b. Au contraire, les sels d'alcaloïdes sont insolubles dans les solvants organiques apolaires et solubles dans les solvants organiques polaires et l'eau (Hurabielle et Paris, 1981).

I.3.2. Classification des alcaloïdes

Pour faciliter l'étude des alcaloïdes, on les classe généralement en réunissant tous ceux dont la molécule renferme le même noyau chimique (figure N°3) (Moreau, 1964).

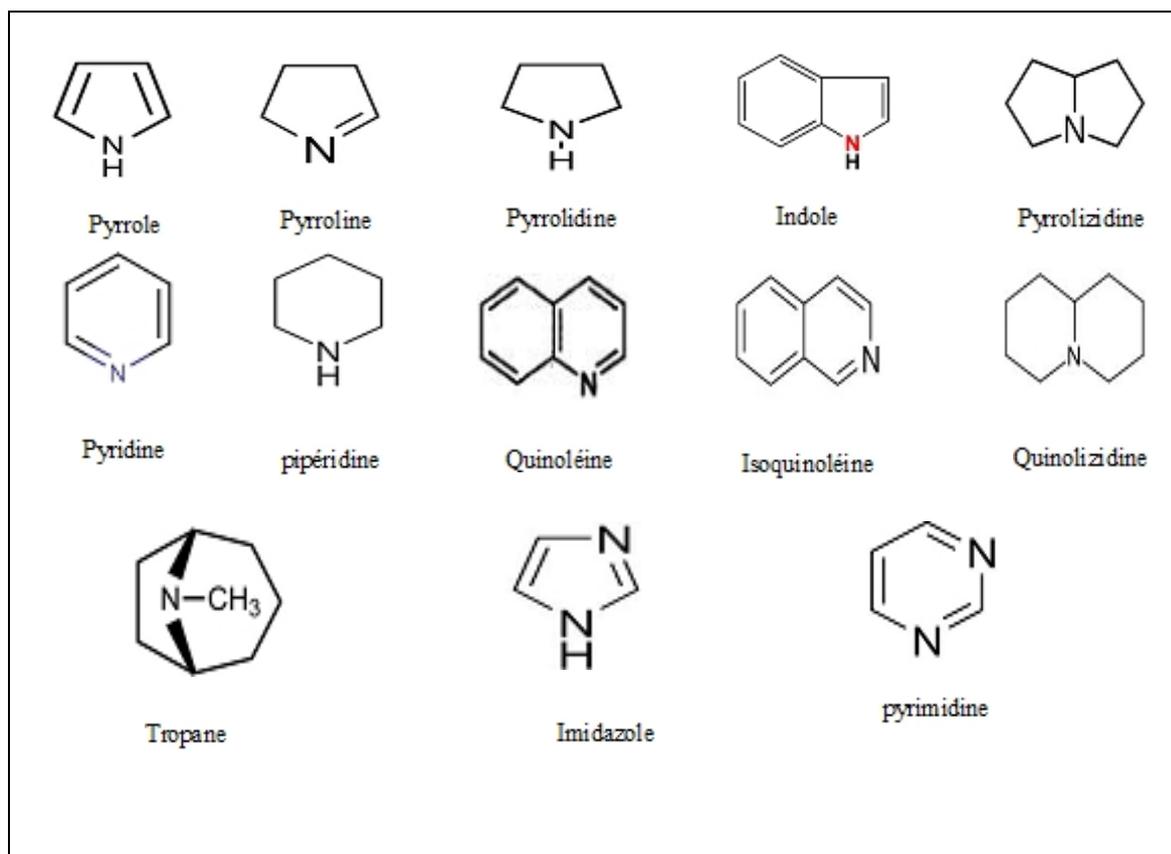


Figure N°3 : Structure des hétérocycles constituant le noyau de base des alcaloïdes (Moreau, 1964)

I.2.3. Biosynthèse des alcaloïdes

La biosynthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique ; les alcaloïdes se concentrent ensuite dans la vacuole. De façon générale, la production d'alcaloïdes s'observe dans les tissus en voie de croissance (Guignard, 2000; Richter, 1993).

Le point de départ de la synthèse de nombreux alcaloïdes se fait à partir :

- Des aminoacides diamminés (ornithine et la lysine) (Figure N°4)
- Des aminoacides aromatiques (la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane)

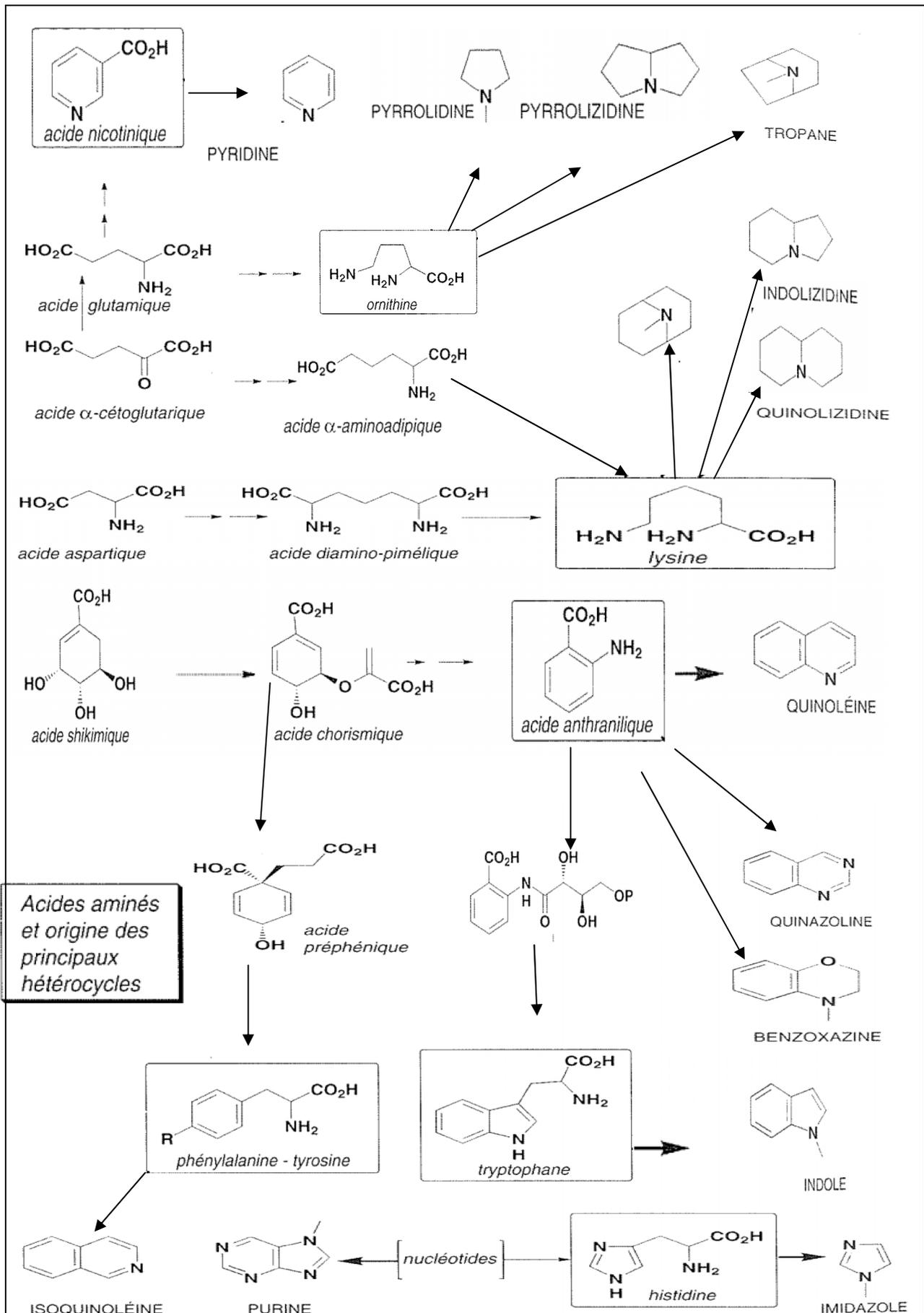


Figure N°4 : Biosynthèse des alcaloïdes (Brunetor)

I.3.4. Les alcaloïdes de *Fumaria*

Les fumariacées sont des plantes alcaloïdiques, connues pour leur richesse en alcaloïdes isoquinoléiques et leurs multiples activités biologiques (Shakil, 1998). Le tableau N°1 résume la composition en alcaloïdes isoquinoléiques de certaines espèces de *Fumaria sp.*

Tableau I: Les alcaloïdes de certaines espèces de *Fumaria* (Sousek, 1999).

Espèces	Alcaloïdes
<i>F. agraria</i>	Adlumiceine, Coptisine, Cryptopine, Fumariline, Fumaritine, fumarophycine, parfumine, N-methylstylopine
<i>F. capreolata</i>	Adlumiceine, coptisine, Cryptopine, Fumariline, Fumaritine, fumarophycine, parfumine, N-methylstylopine
<i>F. muralis</i>	Coptisine, Cryptopine, fumariline, Fumaritine, fumarophycine, O-methylfumarophycine, parfumine, sinactine, Stolypine, N-methylstylopine
<i>F. officinalis</i>	Adlumiceine, Adlumidiceine, Corytuberine, parfumine, N-methylstylopine
<i>F. parviflora</i>	Adlumiceine, coptisine, Fumaritine, Sinactine, N-methylstylopine
<i>F. spicata</i>	Adlumiceine, Coptisine, Fumariline, Fumarophycine, Protopine, N-methylstylopine
<i>F. vaillantii</i>	Fumaricine, fumarophycine, O-methylfumarophycine

I.3.5. Les alcaloïdes isoquinoléiques de *Fumaria*

La famille des Fumariacées et Papavéracées riches en alcaloïdes isoquinoléiques et benzophenarthridine (Suau et al, 2002) et parmi ces alcaloïdes isoquinoléiques on cite : la copisinedehydrocheilanthifolin, isoboldine, magnoflorine, N-méthyle corlaurine, réticuline, Protopine, sanguinaire et scoulerine. Le figure N°5 résume la structure chimique de quelques alcaloïdes isoquinoléiques.

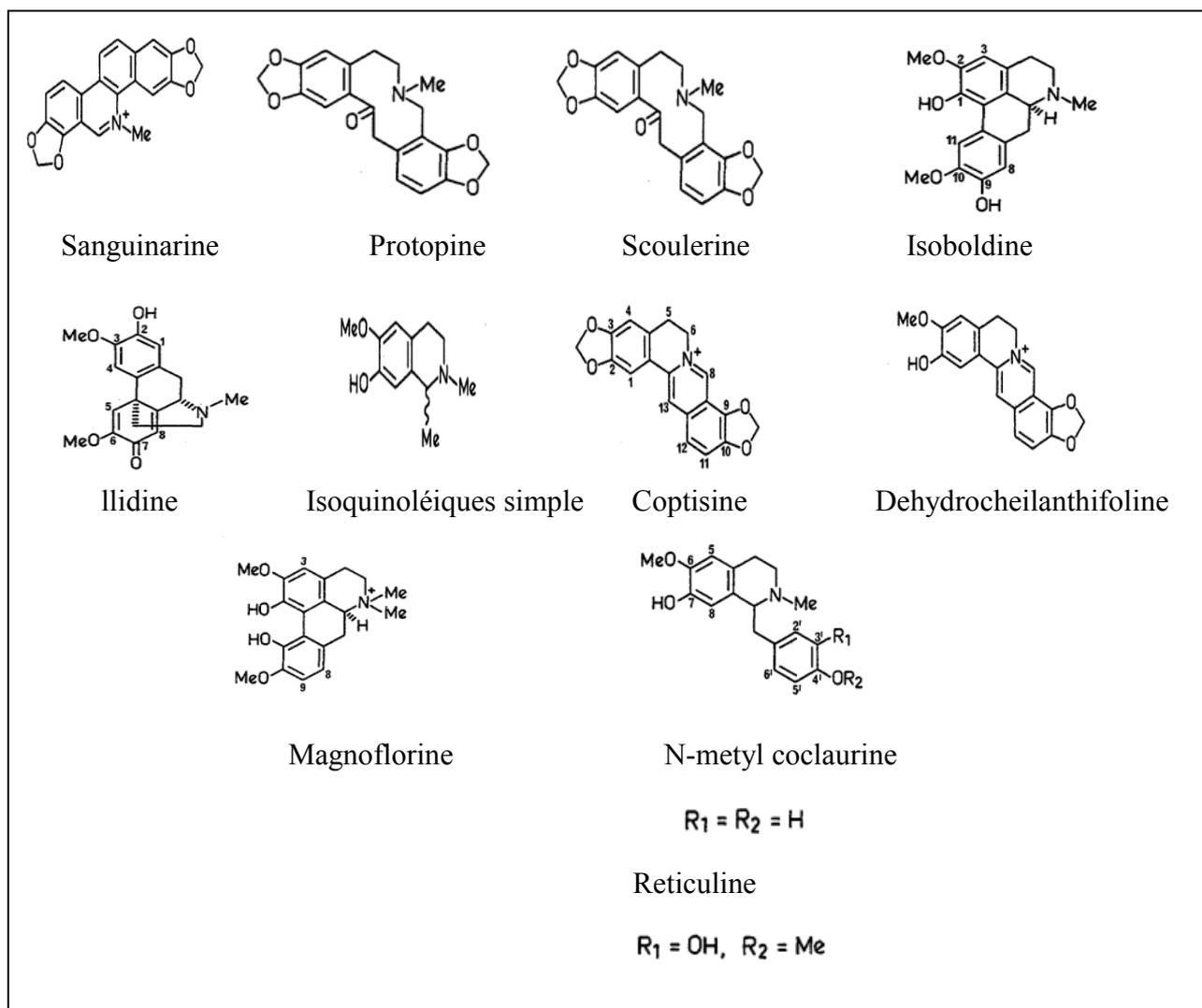


Figure N°5 : Structure chimique de quelque alcaloïde isoquinoléiques (Tanahashi et Zenk ,1985)

I.3.6. Les alcaloïdes de *Peganum harmala*

Peganum est une plante alcaloïdique, connu pour sa richesse en alcaloïde B-carboline et leur diverses activités biologiques. Les alcaloïdes B-carbolines sont les produits de condensation des indoleamines (tryptamine, sérotonine et/ou tryptophane) avec des composés carbonyliques (aldéhyde et/ou acide cétonique). Ils sont présents dans les feuilles, les graines et les racines de la plante. Il existe différentes structures des alcaloïdes carboliniques (Figure N°6) (Torreilles et *al.*, 1985; Tsuchiya et *al.*, 1999).

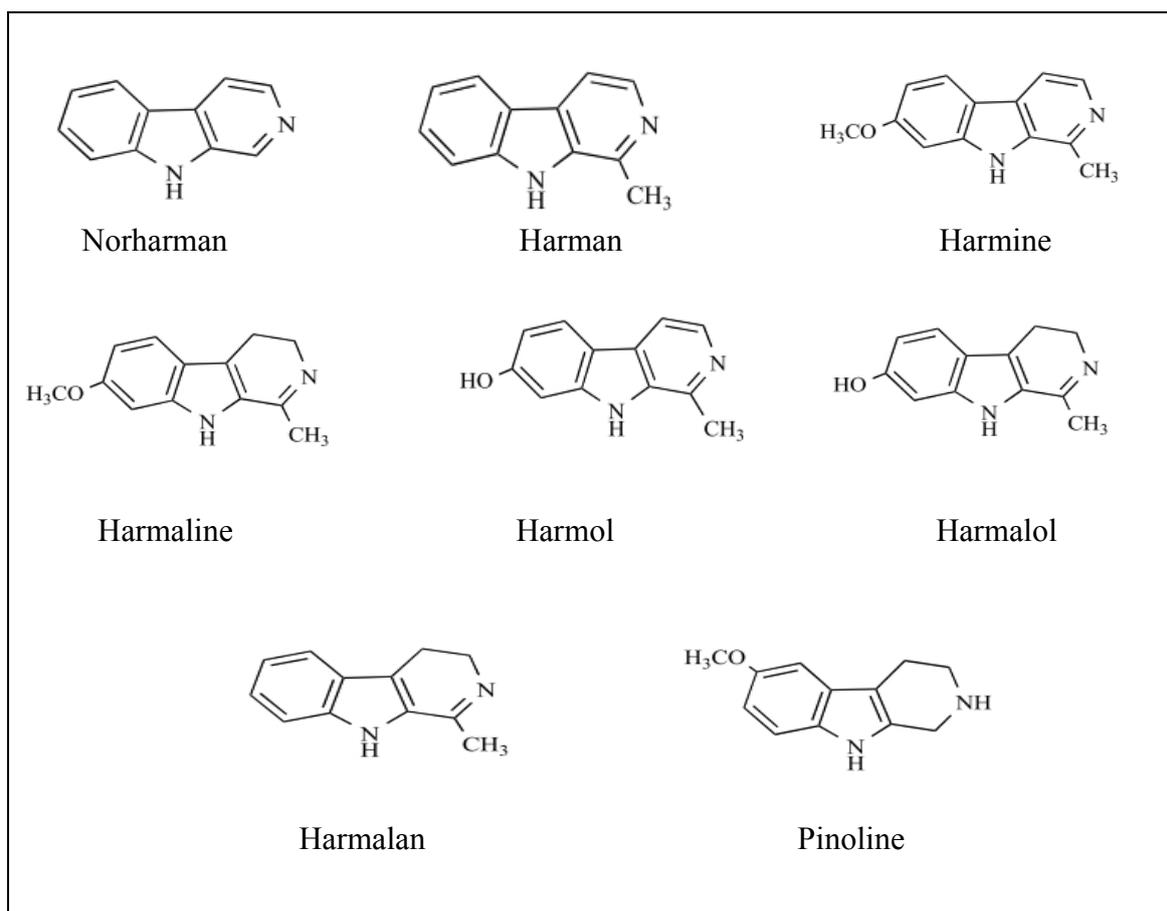


Figure N°6: Structure chimique de quelque alcaloïdes carboliniques (Cao et al.,2007).

I.4. Les radicaux libres et les antioxydants

I.4.1. Les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique (atome ou molécule, neutre ou chargée) possédant un électron non apparié sur sa couche périphérique (Moussard, 2006). Cette caractéristique lui confère une réactivité importante et réagit avec d'autres molécules plus stables pour capter son électron, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (Januel, 2003). Les espèces dérivées de l'oxygène dites espèces réactives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont des espèces et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leur précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) (FAVIER, 2003). Le tableau suivant résume les principaux radicaux libres.

Tableau II: Sources, concentration, demi-vie et effets biologiques de principales espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Le radical libre	Sources	Concentration	Demi-vie à (37°C)	Effets biologiques	Références
superoxyd ($O_2^{\cdot-}$)	-Réduction monovalente de l'oxygène moléculaire $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ dans : -La mitochondrie -la voie de la xanthine déshydrogénase - Oxydation des catécholamines -La stimulation de la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles.	10^{-12} à 10^{-11} M	Enzymatique*	-Impliqué dans les pathophysiologies de plusieurs maladies -Oxydation des lipides	(Rabaud et al., 1997 ; Vergely et al., 2003 ; Fontaine., 2007 ; Valko et al., 2007 ; Bartosz, 2009)
Radical hydroxyl ($\cdot OH$)	-Formé à partir de peroxyde d'hydrogène : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH + Fe^{3+}$ Réaction de Fenton -Formé à partir de l'anion superoxyde : $O_2^{\cdot-} + H_2O \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$ Réaction d'Haber-Weiss -peroxynitrite (ONOOH) lors des réactions inflammatoires.	-	10^{-9} (s)	- Oxydation Lipides Protéines ADN ; -Il se combine avec presque tous les composants cellulaires.	(Valko et al., 2005 ; Bartosz, 2009).
Monoxyde d'azote ($NO\cdot$)	-Produit à partir de la L-arginine sous l'action des NO synthèses (NOS), en présence d'oxygène et de cofacteurs	-	1 à 10 (s)	-Oxydation des Lipides, Protéines et d'ADN	(Vergely et al., 2003 ; Fontaine, 2007)
Peroxynitrite ($ONOO\cdot^-$)	-Formé à partir du $NO\cdot$ en réagissant avec le radical superoxyde ($\cdot O_2^-$)	10^{-9} à 10^{-7} M	0,05 à 1 s	-Oxydation des Lipides, Protéines et l'ADN	(Fontaine, 2007 ; Bartosz, 2009)

Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)	-Produit par la dismutation spontanée ou induite de l'anion superoxyde ; - Produit par l'urée oxydase, glucose oxydase D-amino acide oxydase par le transfert direct de deux électrons à l'oxygène.	10^{-9} à 10^{-7} M	Enzymatique*	-Possède un fort pouvoir oxydant, participant à la toxicité de l'oxygène ; - génère le très réactif radical OH (réaction de Fenton) ; - génère l'acide hypochloreux (HOCl) à partir du chlore, un oxydant très puissant.	(Vergely <i>et al.</i> , 2003 ; Ardanaz et Pagano, 2006 ; Bartosz, 2009)
Alkoyle (RO[•])	Produisent lors de la dégradation des peroxydes organiques.	–	10^{-6}	-Généré à la suite de l'action oxydante des ROS (superoxyde, hydroxyle) sur les chaînes d'AGPI, glucides, protéines, acides nucléiques	(Vergely <i>et al.</i> , 2003)
alkyl peroxyde (ROO[•])	formé par addition d'oxygène moléculaire sur des radicaux libres carbonés.	–	10^{-1}	-Généré à la suite d'action oxydante des ROS (superoxyde, hydroxyle) sur les chaînes d'AGPI, glucides, protéines, acides nucléiques	(Vergely <i>et al.</i> , 2003).

Enzymatique* : Les demi-vies du radical superoxyde et du peroxyde d'hydrogène varient en fonction de l'activité enzymatique des enzymes assurant leur métabolisme (Brito *et al.*, 1999 ; De Leiris, 2003).

I.4.1.1. Production des radicaux libres

La production des espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions dites, respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau au niveau de la mitochondrie, elle peut alors être à l'origine de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). La production des ERO a deux sources : les sources endogènes, (où les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme), les sources exogènes (fumée de cigarette, rayons ultraviolets, radiations...etc) (Pastre, 2005).

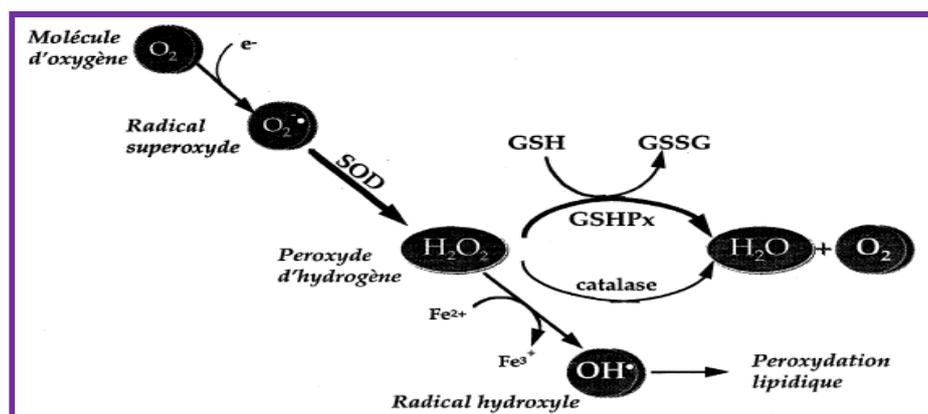


Figure N°7 : Les principales étapes de la production des espèces réactives de l'oxygène (Gaudable et Favier, 1997).

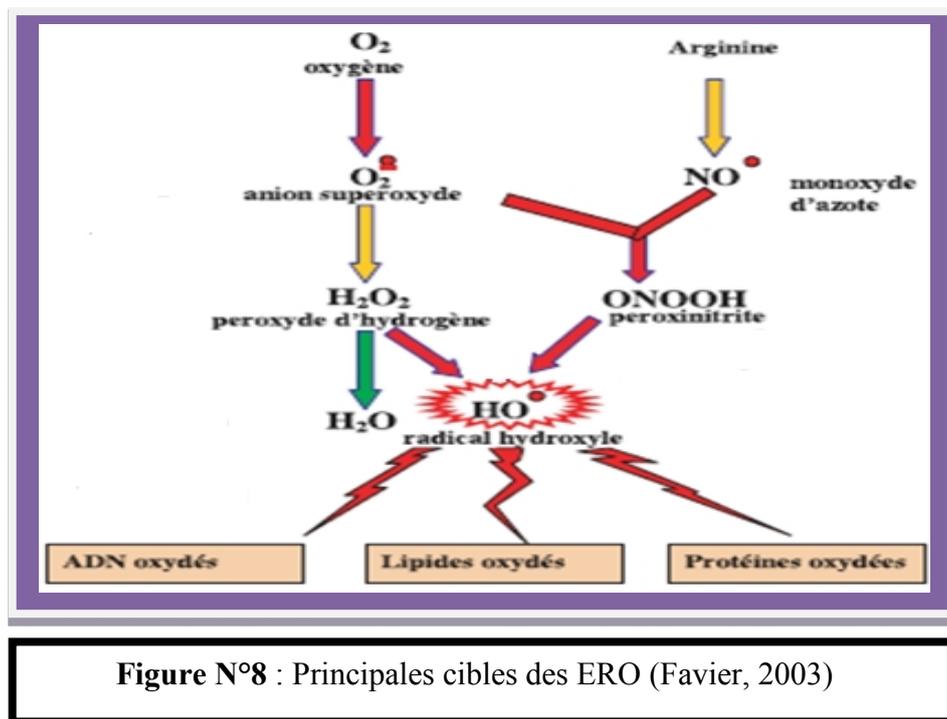
I.4.1.2. Le stress oxydant

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

I.4.1.3. Effets générés par les radicaux libres

Des concentrations élevées en ERO peuvent être un important médiateur de dommages, des acides nucléiques, des lipides et des protéines (Figure N°8) (Valko *et al.*, 2007). Selon Favier; la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydant et augmente la production mitochondriale de radicaux. Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies comme le cancer, syndrome de détresse respiratoire aigue, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré...etc. Le stress oxydant est

aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003).



I.4.2. Les antioxydants

Les antioxydants sont définis comme étant des composés pouvant être de nature exogène ou endogène et possédant, la capacité d'empêcher la génération des oxydants toxiques, d'arrêter ceux qui sont déjà produits, d'inactiver et de bloquer de ce fait la réaction en chaînes de propagation produite par ces oxydants (kumar et *al.*, 2010). Selon Valko et ses collaborateurs (2006); Un bon antioxydant devrait à la fois : Agir spécifiquement sur les radicaux libres; Chélateur des métaux de transition; Agir en synergie avec d'autres antioxydants pour se régénérer; Être aisément absorbé; Agir à des concentrations physiologiques relativement faibles.

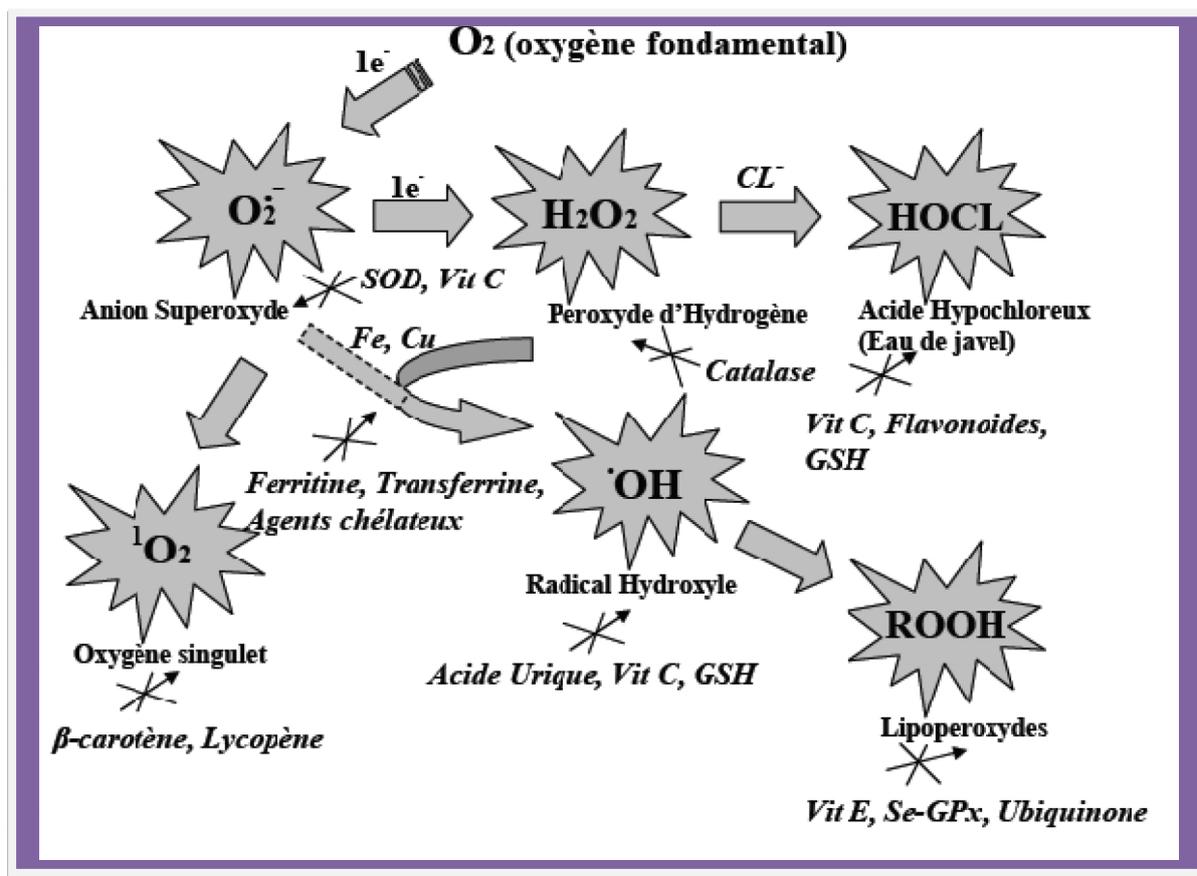


Figure N°9 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydants (Pincemail et *al.*, 2002).

I.4.2.1. Classification des antioxydants

II.4.2.1.1. Antioxydants endogène

Pour lutter contre l'excès de production de radicaux libres (ERO), l'organisme dispose d'enzymes antioxydante ubiquitaires telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (des lipases, des protéases et des endonucléases qui éliminent les molécules oxydées, mais également de systèmes non enzymatiques comme les thiols, le glutathion, la bilirubine, l'albumine et la ferritine qui complexent les ions divalents. A titre d'exemple, l'un des antioxydants enzymatiques intracellulaires les plus efficaces est la superoxyde dismutase, il s'agit d'une enzyme antioxydant qui catalyse la dismutation de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en oxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui sera transformé à son tour en $H_2O + \frac{1}{2} O_2$ par la catalase (Berger et Chioloro, 2001 ; Pastre, 2005 ; Valko et *al.*, 2006 ; Afonso et *al.*, 2007),

II.4.2.1.2. Antioxydants exogènes

Les antioxydants alimentaires sont essentiellement représentés par l'acide ascorbique (vitamine C), l' α -tocophérol (vitamine E), les caroténoïdes et les polyphénols ainsi que d'autres antioxydants (Valvo *et al.*, 2007). Cette classe d'antioxydants est particulièrement intéressante puisqu'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules (Pastre, 2005).

Acide ascorbique (vitamine C) est un antioxydant très puissant retrouvé dans les milieux aqueux, ses associés antioxydants primaires sont la vitamine E et les caroténoïdes. Possède deux groupes hydroxyle ionisables. Son mécanisme d'action est représenté dans la figure n° 11 (Valvo *et al.*, 2006).

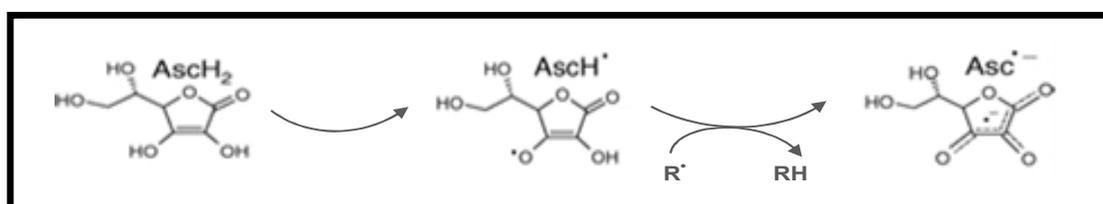


Figure N°10 : Réaction entre l'acide ascorbique et un radicale (R•) (Valko *et al.*, 2006)

Partie pratique

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

F. capreolata une plante annuelle ou bisannuelle, grimpante grâce aux pétioles qui s'enroulent, les fleurs étant de couleur blanche et ayant un sommet teinté de pourpre-noir, les fruits sont globuleux et arrondis au sommet. (Brette, 2006). *P. harmala* une Herbacée buissonnante de 30 à 90cm de hauteur, rhizome épais et vivace, les feuilles sont irrégulièrement divisées, les fleurs sont blanches avec des sépales persistants qui dépassent la corolle, le fruit est une capsule déprimée au sommet (Paris et Llemann, 1960 ; Abbassi *et al.*, 2003).

Notre travail consiste à étudier l'effet antioxydant de deux espèces des plantes médicinales locales ;(*F. capreolata* et *P. harmala*). Nous avons utilisé toute la partie aérienne (tige, feuilles, fleur et fruit) de *Fumaria* et différentes parties de *Peganum* (Racine, graine, partie aérienne). Nos échantillons ont été récoltés dans un endroit naturel loin de tout contact de pollution et ce pour écarter toute modification dans la composition chimique de l'espèce. La récolte de *Fumaria* a lieu à Imakhlef à El-kseur, wilaya de Bejaia, durant la période de fructification et de floraison (février, 2012) et la récolte de *Peganum* a été faite en Juin 2011 à Sétif.

II.1.2. Matériel et réactifs

Le matériel et les différents réactifs utilisés pour l'extraction et les différents tests sont reportés dans l'annexe.

II.2. Méthodes

II.2.1. Séchage

Nos échantillons de *F. capreolata* et *P. harmala* sont débarrassés de la poussière, du sable et autres particules, puis séchés à l'étuve à 40°C pendant dix jours, pour obtenir une meilleure extraction. Le séchage à l'étuve permet un meilleur broyage. Les échantillons séchés sont réduits en poudre grâce à un broyeur électrique.

II.2.2. Extraction des alcaloïdes de *F. capreolata* et *P. harmala*

Afin d'extraire une bonne quantité d'alcaloïdes, nous avons utilisé la méthode d'extraction par SOXHLET. Dans cette partie du travail on s'est intéressé à l'extraction des alcaloïdes totaux de *F. capreolata* et *P. harmala*. Le corps de l'extracteur, contenant une cartouche remplie de l'échantillon à analyser, est fixé à la partie supérieure et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le

matériel végétal pour donner une solution qui est soutirée périodiquement par l'amorçage d'un siphon. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction (Houghton et Raman, 1998). Distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté (Houghton et Raman, 1998). L'extraction des alcaloïdes est réalisée selon la méthode de Bruneton(1999), en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction (Figure 1).

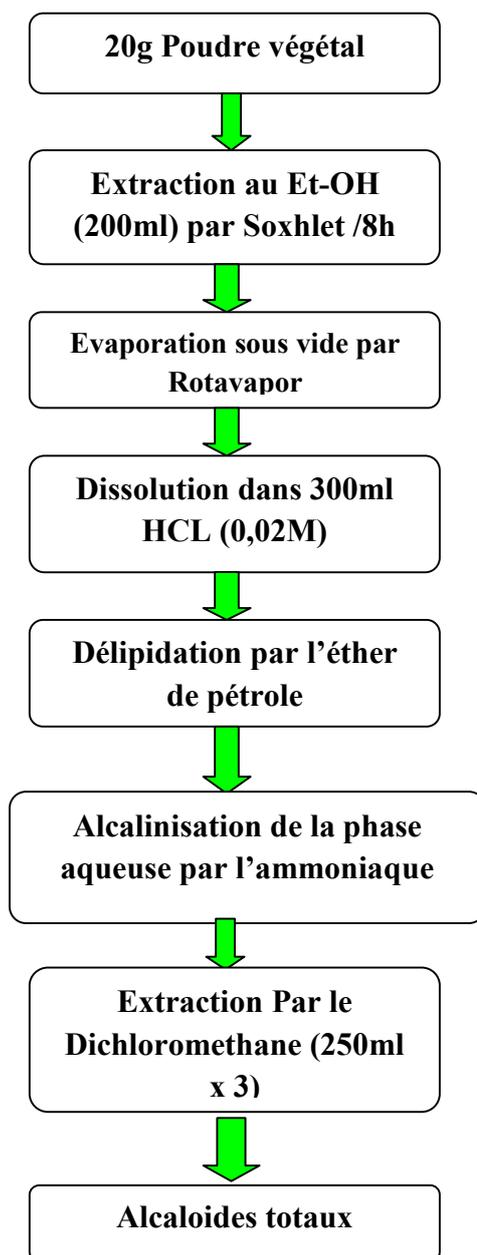


Figure N°11: Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux de *F. capreolata* et *P. harmala* (Bruneton, 1999).

II.2.3. Détermination du pouvoir réducteur des alcaloïdes

Le pouvoir réducteur des alcaloïdes a été déterminé selon la méthode développée par Oyaizu et ses collaborateurs (1986). Le principe repose sur le fait de la présence d'un réducteur entraîne la réduction du complexe Fe^{3+} / ferricyanure de potassium en forme ferreuse ; celle-ci est traduit par le changement de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers une couleur bleue verdâtre, dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque extrait (Kil et *al.*, 2009).

Le mode opératoire de détermination du pouvoir réducteur est présenté dans la figure suivante:

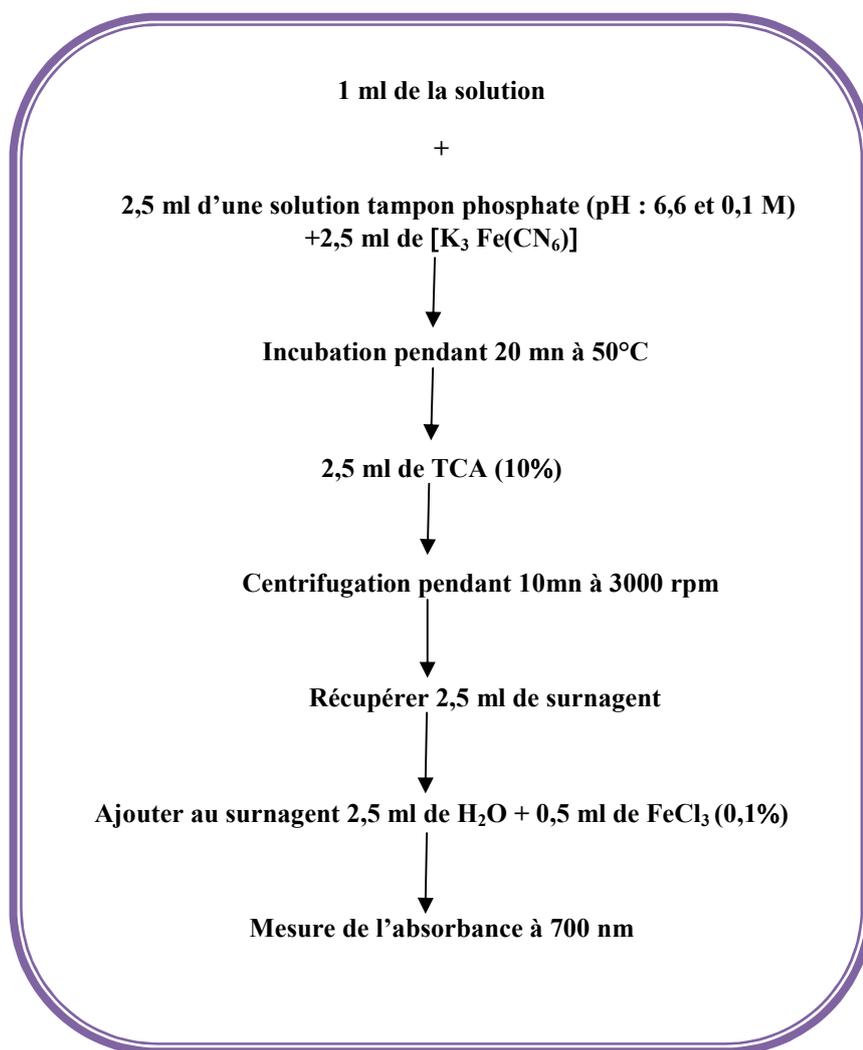


Figure N°12 : Protocol du pouvoir réducteur (Oyaizu et *al.*, 1986)

II.2.4. Activité scavenger du radical 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

C'est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des substances dites antioxydants à donner un électron au radical synthétique DPPH. Cette réduction se traduit par le changement de la couleur violette de la solution éthanolique de DPPH vers une coloration jaunâtre (Molyneux, 2004 ; Shirwaikar et al., 2006).

L'effet scavenging du radical DPPH par les alcaloïdes totaux de *F. capreolata* et de *P. harmala* a été déterminé selon la méthode de (Benabdesselam et al., 2007).

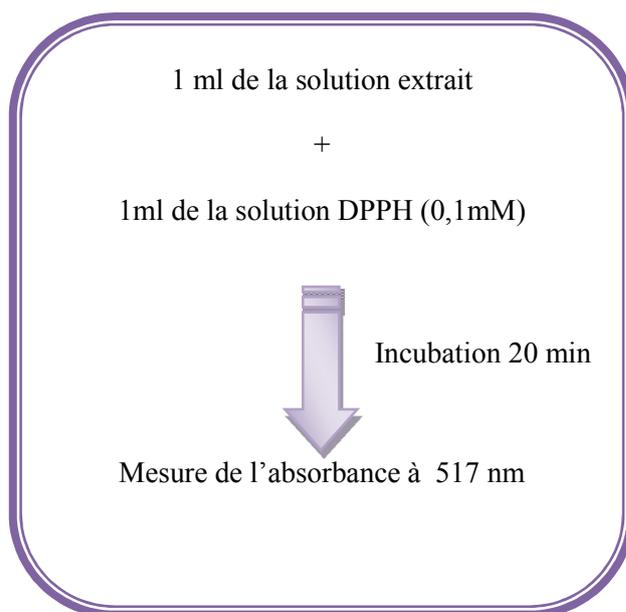


Figure N°13 : Protocol Scavenging du radical DPPH (Benabdesselam et al., 2007).

Le pourcentage de scavenging est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Scavenging} = \frac{Ac - At}{Ac} * 100$$

Ac: Absorbance du control.

At: Absorbance de test.

II.2.5. Effet scavenging du radical ABTS

La chimie de l'acide 2 ; 2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ABTS qui implique la génération direct du radical monocation ($ABTS^{\cdot+}$) et sans la participation d'autre radicaux libre intermédiaire, c'est le test de décoloration de la solution radicalaire $ABTS^{\cdot+}$. Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation $ABTS^{\cdot+}$ qui présente une bande d'absorption dans le visible. L'activité scavenging du radical $ABTS^{\cdot+}$ des

extraits de *F.capreolata* et de *P.harmala* a été mesurée selon la méthode rapporté par Re et ces collaborateurs(1999).

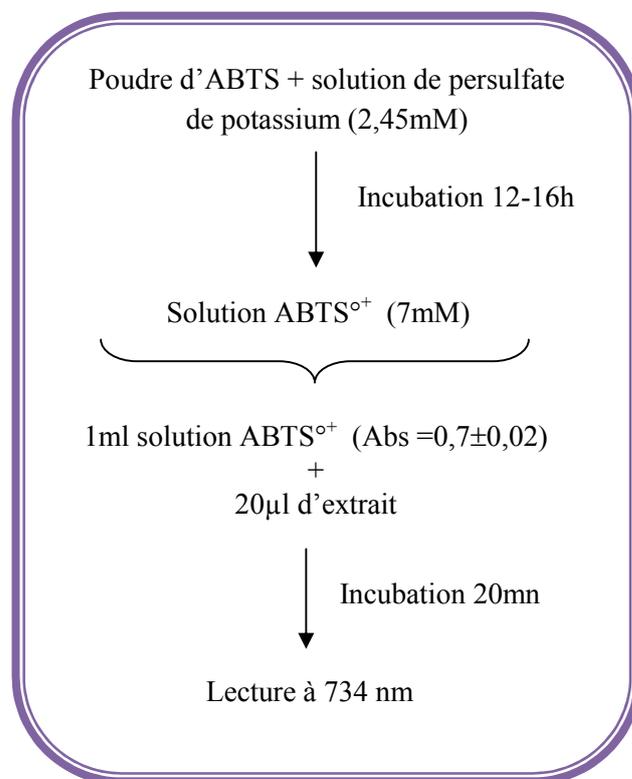


Figure N°14 : Protocole Scavenging du radical ABTS (Re et *al.*, 1999).

L'activité des composés est alors exprimée par la capacité antioxydante équivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration de l'extrait testé en se référant à une courbe d'étalonnage (annexe) et en pourcentage d'inhibition calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ scavenging du radical ABTS}^{\circ+} = [(Ac-At)/Ac]*100$$

Ac : Absorbance du control négatif (sans extrait)

At : Absorbance du test (avec l'extrait)

II.2.6. Effet scavenging de H₂O₂

Le principe de la réaction est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par un antioxydant qui va faciliter sa décomposition en molécules d'eau selon la réaction suivante : $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{é} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$

La capacité des extraits des deux plantes à piéger le peroxyde d'hydrogène a été déterminé suivant la méthode développée par Yerra Rajesthwar *et al*(2005).

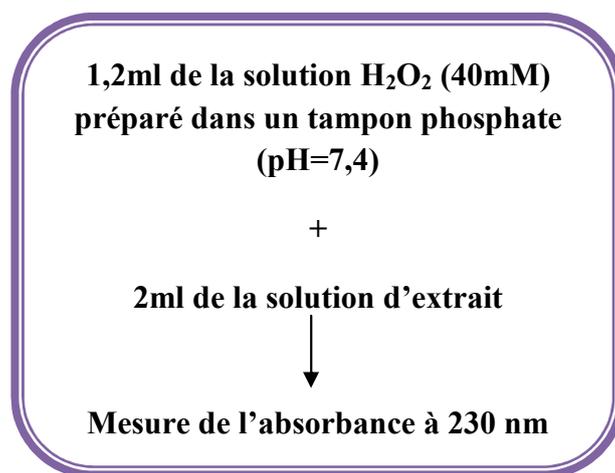


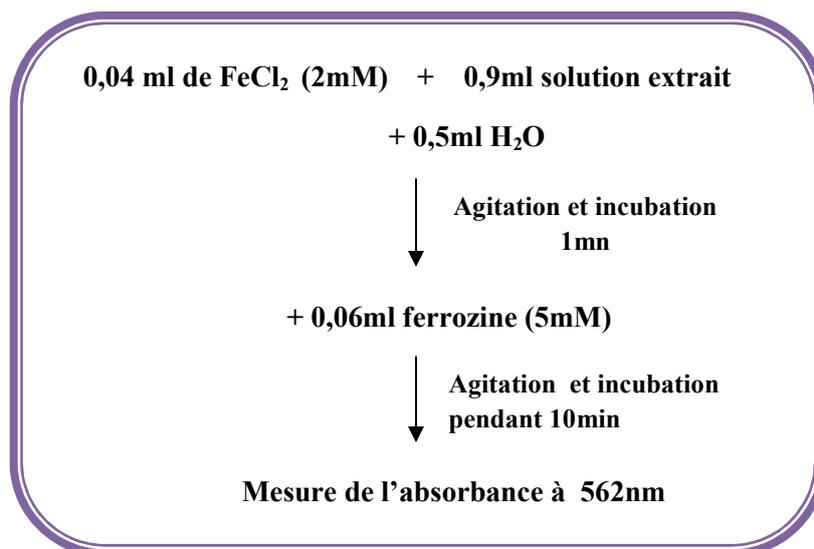
Figure N°15: Protocole scavenging H₂O₂ (Yerra Rajesthwar *et al*, 2005).

Le pourcentage de scavenging de H₂O₂ est déterminé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Scavenging H}_2\text{O}_2 = \frac{[\text{Ac}-\text{At}]}{[\text{Ac}]} * 100$$

II.2.7. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine (chromophore rouge ayant un maximum d'absorption à 562nm) après incubation des échantillons avec le fer divalent selon la méthode de (Okoko et Ere ,2012). Le protocole de la chélation du fer est résumé dans figure suivante :



FigureN°16 : Protocole du test chélation du fer (Okoko et Ere, 2012).

Le pourcentage de chélation du fer est déterminé par l'équation suivante :

$$\% \text{ Chélation} = [(Ac-At)/Ac]*100$$

AC: L'absorbance du contrôle

At : L'absorbance de l'extrait

II.2.8. Test de cytotoxicité

Dans ce test de cytotoxicité, on a utilisé les globules rouges de l'être humain comme modèle cellulaire. Le sang est collecté chez des patients sains dans des tubes héparines. Puis le plasma est éliminé par une centrifugation pendant 10 mn à 3000rpm. Le sang (culot) est lavé trois fois avec le tampon phosphate salin (10mM ; pH 7,4). Puis les érythrocytes sont dilués à une concentration de 2%.

Afin d'évaluer la toxicité des extraits des deux plantes, in vitro, le test d'hémolyse a été réalisé. Brièvement, Cinq dilutions d'extrait sont préparées (0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1mg/ml). Un volume d'extrait est mélangé avec 200µl de la suspension érythrocytaire. Le mélange est incubé pendant 30mn à 37°C puis centrifugé à 3000rpm. L'absorbance de surnageant est mesurée à 530nm et une observation des globules rouges sous microscope photonique a été faite. Le pourcentage d'hémolyse a été déterminé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = [At/Atp]*100$$

Atp : Absorbance du témoin positif (solution hypotonique)

At : Absorbance du test

Chapitre III

Résultats et discussions

III. Résultats et discussion

III.1. Taux d'extraction des alcaloïdes de *F. capreolata* et *P. harmala*

L'extraction des alcaloïdes a été réalisée dans un milieu acide. Le taux d'extraction des alcaloïdes que renferme *F. capreolata* (1,17%) a été calculé en fonction de la matière végétale sèche (poudre initiale) de la partie aérienne de la plante. Cette espèce semble être plus riches en alcaloïdes en comparaison à d'autres espèces du même genre ; En effet on observe chez *F. fella* un taux de 0,67%, dans le cas de *F. sepium* et *F. agaria* des rendements allant respectivement jusqu'à 0,88% et 0,83% ont été observés. Généralement, la teneur en métabolites secondaires dépend de plusieurs facteurs tels que l'espèce, l'origine, le stade de croissance, les influences environnementales et le patrimoine génétique (Bruneton, 1999). Le taux d'extractions des alcaloïdes que renferme *P. harmala* (5%) à été calculée de la même manière ce taux étant plus élevé que celui de *F. capreolata*.

III.2. Pouvoir réducteur de *Fumaria capreolata* et de *Peganum harmala*

Le pouvoir réducteur d'une substance peut être défini par sa capacité de transférer un électron ou de donner un atome d'hydrogène. Dans cet essai nous mesurons ce potentielle à travers la transformation de Fe^{3+} en Fe^{2+} par le don d'électron, d'après la figure N°17 à une concentration de 800 μ g/ml, le meilleur pouvoir réducteur à été obtenue par l'extrait de *F. capreolata* (0,57UA \pm 0,005) par contre les extrait de *P. harmala* ont donné un faible pouvoir réducteur : ATR, ATSe, ATPa et EetPa (0,18 \pm 0,007 ; 0,17 \pm 0,001 ; 0,10 \pm 0,004 et 0,1 \pm 0,022UA) respectivement, comparant à la caféine qui n'a presque aucun effet réducteur (0,01 \pm 0,008UA).

Le pouvoir réducteur des alcaloïdes de *F. capreolata* et des extraits de *P. harmala* suggère la présence de(s) molécule(s) réductrices.

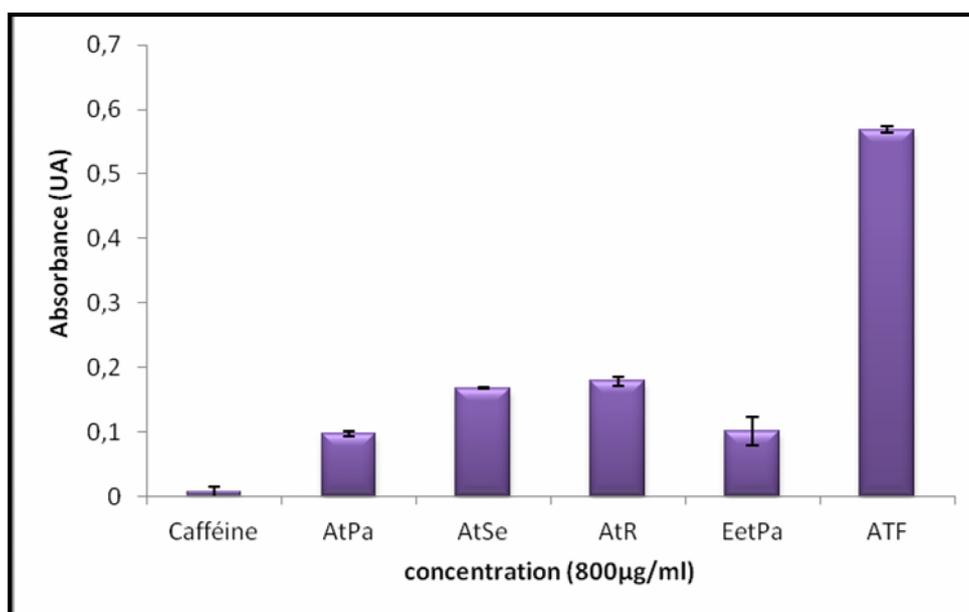


Figure N°17 : Pouvoir réducteur des extraits de *F. capreolata* et de *P. harmala*. ATPa : alcaloïdes totaux de la partie aérienne ; ATSE : alcaloïdes totaux de la graine ; ATR : alcaloïdes totaux de la racine ; EetPa extrait éthanologique de *P. harmala* ; ATF : alcaloïdes totaux de *F. capreolata*

III.3. Effet «scavenging» sur le radical stable DPPH

Nous avons évalué l'activité anti-radicalaire de différents extraits de deux plantes très utilisées en médecine traditionnelle, les alcaloïdes totaux de la partie aérienne de *F. capreolata* et de différentes parties de *P. harmala* (partie aérienne, racine et graine) par l'utilisation d'un radical libre stable de 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Comme le montre les figures N°18 et N°19 l'activité anti-radicalaire de différentes parties de *P. harmala* et de *F. capreolata* augmente avec la concentration dans la gamme allant de 0-800µg/ml et de 0-100µg/ml, respectivement. Le meilleur effet scavenging du radical DPPH est obtenu par l'extrait alcaloïdiques de *F. capreolata* ($68,31 \pm 0,35\%$) à une concentration de 100µg/ml. Par contre les extrait alcaloïdique de *P. harmala* (ATPa, ATSe, et ATR,) exercent un effet remarquable à 800µg/ml (ATPa : $78,56 \pm 2,12$; ATSe : $97,19 \pm 0,77$ et ATR : $90,07 \pm 0,58$), à l'exception de l'extrait éthanologique de la partie aérienne (EetPa : $45,19 \pm 1,24$ %). La meilleur IC₅₀ à été obtenue par la BHA 8,21µg/ml, suivi de l'extrait ATF (28,87 µg/ml) puis par les extraits de *P. harmala* dans la meilleur IC₅₀ à été obtenue par ATSe (0,15 mg/ml). Le tableau III représente les IC₅₀ du radical DPPH des extraits alcaloïdiques des deux plantes.

Tableau III : IC50 des extraits de *P. harmala* et de *F. capreolata* contre le radical DPPH

Extraits	IC50 (mg/ml)
ATPA	0,24±0,05
ATSE	0,15±0,0053
ATR	0,18±0,003
ATF	0,029±0,001
EETPA	>0,8

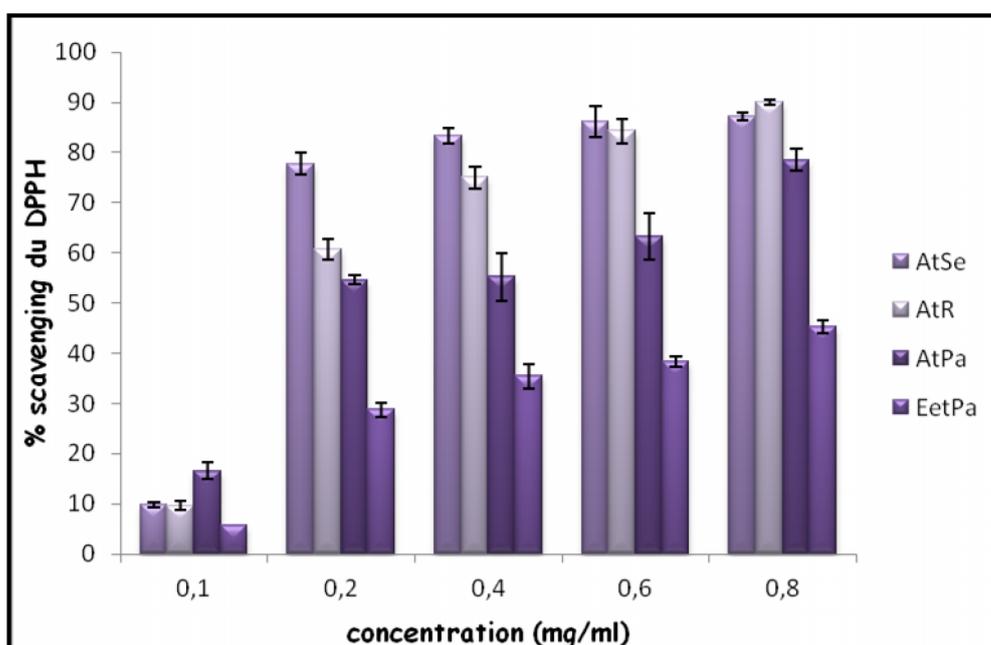


Figure N°18 : Effet scaavenging contre le radical DPPH des extraits de *P. harmala*

ATPA : alcaloïdes totaux de la partie aérienne ; ATSE : alcaloïdes totaux de la graine ; ATR : alcaloïdes totaux de la racine ; EetPa: extrait ethanologique de *P. harmala*

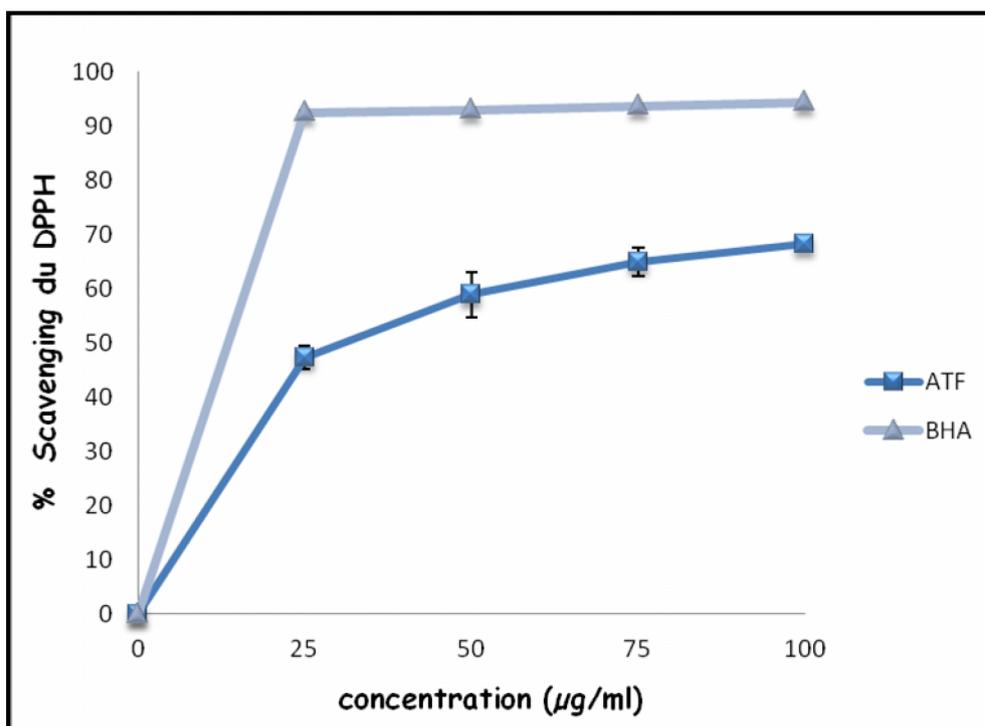


Figure N°19 : Effet scavenging contre le radical DPPH des extraits de *F. capreolata*. ATF : alcaloïdes totaux de *F. capreolata*

L'effet scavenging du radical DPPH des extraits de *F. capreolata* et de *P. harmala* est dû à la présence des alcaloïdes isoquinoléiques et des alcaloïdes β -carbolinique. Des études ont été réalisées par Cui et ces collaborateurs (2006) sur les alcaloïdes isoquinoléiques ont démontré que ces composés sont dotés d'un grand effet scavenger du radical DPPH, avec une IC50 dans l'ordre de micro molaire. Une autre étude a été réalisée par Shirwalkar et ces collaborateurs (2006), ont démontré l'effet de la berbérine sur le radical DPPH, cette berbérine réduit le radical DPPH, par un don d'hydrogène, en forme hydrazine.

Le meilleur effet scavenging est observé par ATSe et ATR, cela peut être dû à la richesse de ces deux parties par les alcaloïdes β -carbolinique. Une étude a été faite par Berrougui et ces collaborateurs (2006), ils ont montré que les alcaloïdes β -carbolinique, Harmine et Harmaline exhibent un effet scavenging contre le radical DPPH à une concentration de 10 μ M avec un pourcentage scavenging, harmaline (36,11 \pm 2,14%), Harmine (13,42 \pm 1,20%), et ils ont montré que le radical DPPH est un abstracteur faible d'hydrogène. Ils ont conclu que l'alcaloïde harmaline a une meilleure capacité de scavenger le radical DPPH par rapport à l'Harmine qui est due à l'absence d'un doublet sur le cycle aromatique au niveau du carbone 3.

III.4. Effet scavenging du radical ABTS

L'activité des alcaloïdes totaux des deux plantes est exprimée par la capacité antioxydant Equivalent Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydant qu'une concentration du composé testé. Plus la valeur TEAC est élevée, plus l'activité antioxydant est efficace.

Comme le montre la figure N°20 la meilleure capacité antioxydante est obtenue par l'extrait ATSe (1278,68mmol équivalent trolox/g d'extrait), suivi de l'extrait de *F. capreolata* ATF (728,12mmol équivalent trolox/g d'extrait) et par l'extrait ATR (401,87mmol équivalent trolox/g d'extrait), par contre l'extrait éthanolique de la partie aérienne et les alcaloïdes de la racine ont exercé une très faible capacité antioxydante (340 et 179,37 mmol équivalent trolox/g d'extrait), respectivement.

La capacité antioxydante équivalente trolox de différents extraits est représentée dans la figure N°20

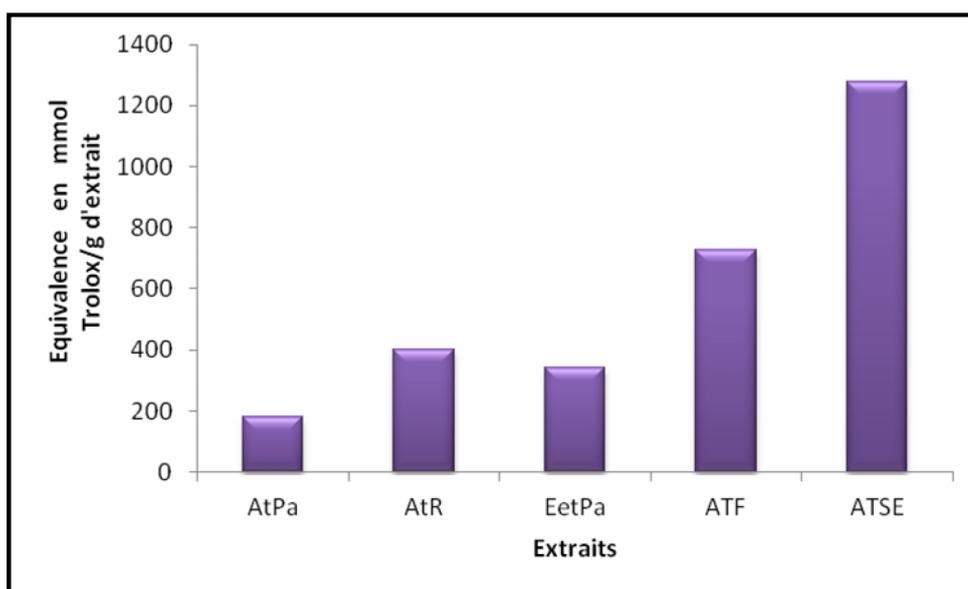


Figure N°20 : Capacité antioxydant equivalent trolox (TEAC) des extraits de *F. capreolata* et de *P. harmala*

ATPA : alcaloïdes totaux de la partie aérienne ; ATSE : alcaloïdes totaux de la graine ; ATR : alcaloïdes totaux de la racine ; EetPa extrait éthanolique de *P. harmala* ; ATF : alcaloïdes totaux de *F. capreolata*

L'activité scavenging est aussi exprimé en terme de pourcentage d'inhibition du radical ABTS à une concentration de 800µg/ml figure N°21

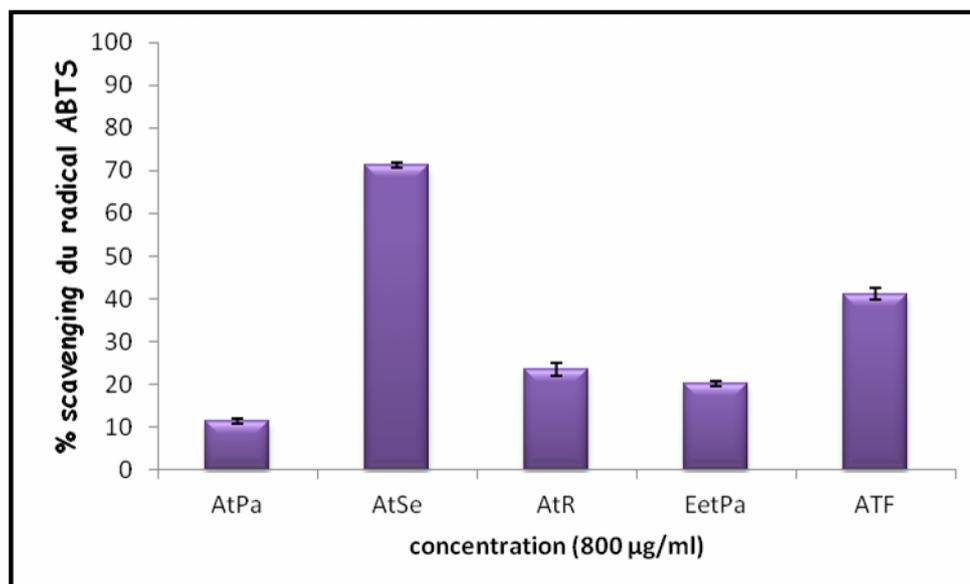


Figure N°21 : Effet scavenging contre le radical ABTS des extraits de *F. capreolata* et de *P. harmala*

ATPA : alcaloïdes totaux de la partie aérienne ; ATSE : alcaloïdes totaux de la graine ; ATR : alcaloïdes totaux de la racine ; EetPa : extrait éthanolique de *P. harmala* ; ATF : alcaloïdes totaux de *F. capreolata*

Des études ont été faites par Shirwalkar et ses collaborateurs (2006), sur l'effet de la berbérine contre le radical ABTS, ont démontré que la berbérine exhibe un effet sur le radical ABTS d'une manière à concentration dépendante avec un maximum effet scavenging à 512µg/ml (80% d'inhibition) et un minimum effet scavenging à 2µg/ml (2% d'inhibition).

D'après ces résultats on peut suggérer que l'extrait de *F. capreolata* a exhibé un effet sur le radical ABTS par la présence de la berbérine. Étant donné que l'effet exercé par la berbérine est plus élevé que celui de ATF, malgré la présence de cet alcaloïde dans ATF, donc cela est peut être dû à la présence de plusieurs alcaloïdes dans l'extrait ATF qui induit à la diminution de l'effet de la berbérine par un encombrement stérique ou un effet antagoniste des autres alcaloïdes.

L'effet anti radicalaire exercé par les extraits de *P. harmala*, en particulier ATSe est peut être due à la présence des alcaloïdes β -carboline actifs. Des études ont été faites par Herraiz et Galisteo (2004), ont démontré que l'indol en général incluant plusieurs dérivés de tryptamine et de tryptophane sont des antioxydants efficaces, qui est due à leur capacité de scavenger les cations radicalaire et qui sont eux même transformés en produits dégradables (indol oxydé via des radicaux indonile)

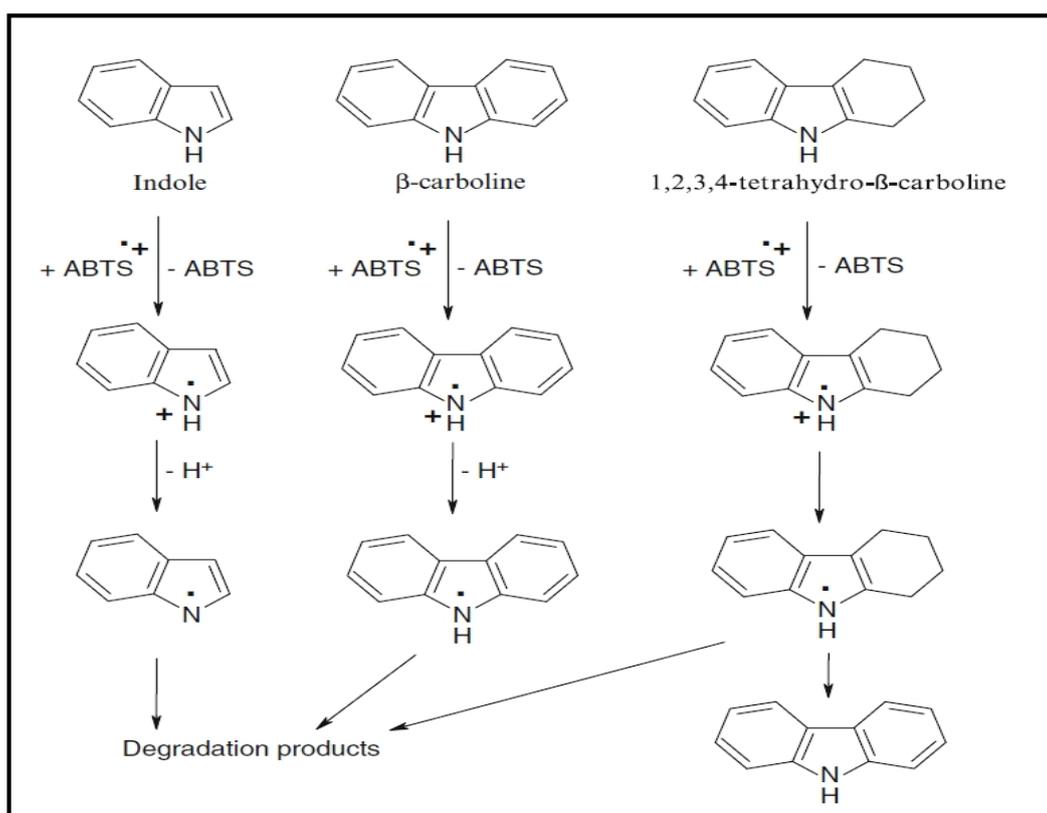


Figure N°22: Le mécanisme d'action des alcaloïdes beta-carboliniques (Jochen Lehmann, 2012)

III.5. Effet scavenging de peroxyde d'hydrogène « H_2O_2 »

Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant formé dans les tissus vivants par plusieurs processus métaboliques et sa désintoxification est essentiel pour la protection des cellules (Mansouri et al ,2005). Les résultats du test scavenging de H_2O_2 des deux plantes, sont présentés dans la figure N°24. A une concentration de $100\mu\text{g/ml}$ les meilleurs effets scavenging de H_2O_2 ont été obtenu par ATSe, ATPa et ATR de *P. harmala* ($90,48\pm 2$; $97,36\pm 2$; $92,49\pm 4\%$) respectivement, suivi par l'extrait ATF de *F. capreolata* ($78,89\pm 0,48\%$). Par contre, l'extrait ETPa de *P. harmala* à exercé un faible effet scavenging de H_2O_2 ($46,51\pm 2\%$). L'effet scavenging de H_2O_2 obtenue par les alcaloïdes totaux de *P. harmala* et de *F. capreolata* sont proches à celui exercé par l'acide caféique ($95,21\pm 0,01\%$).

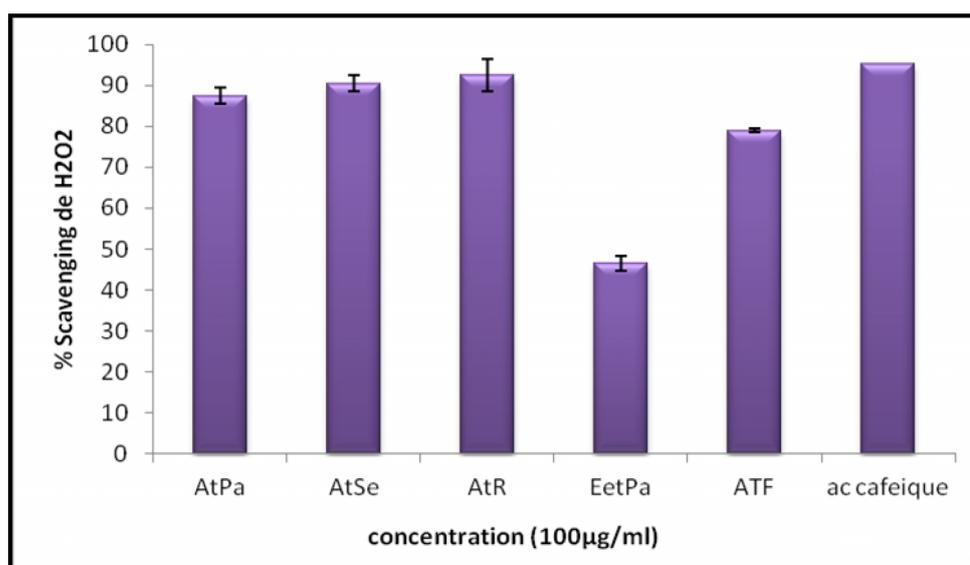


Figure N°23 : Effet Scavenging de H₂O₂ des extraits de *P. harmala* et de *F. capreolata*

ATPA : alcaloïdes totaux de la partie aérienne ; ATSE : alcaloïdes totaux de la graine ; ATR : alcaloïdes totaux de la racine ; EetPa extrait éthanolique de *P. harmala* ; ATF : alcaloïdes totaux de *F. capreolata*

Des études ont été faites par Xiao et ces collaborateurs (2008) sur la protection par la protopine des cellules PC12 (cellules nerveuse) lysés par H₂O₂. Le pourcentage de viabilité des cellules, après traitement à 5 et 50µM est de 50,6 et 61,6%, respectivement. Ces résultats nous laissent suggérer que l'effet de l'extrait de *F. capreolata* est peut-être dû à l'effet scavenging de H₂O₂ de la protopine tout seul ou l'association avec d'autres molécules d'alcaloïdes isoquinoléiques.

D'autres études ont été réalisées par Moura et ces collaborateurs (1964) sur les alcaloïdes β-carboliniques, ils ont démontré que ces derniers ont un très bon effet antioxydant (harmalol, harmaline, harmol, harmane, harmine). Ils ont démontré aussi que les précurseurs indoliques (noyau indol) tryptophane et tryptamine sont connus de leur activité antioxydante, qui est peut-être dû à l'effet scavenging des espèces réactives d'oxygène ou à la formation d'un radical indol stable au cycle pyrrole. Des études faites par Tse et ces collaborateurs (1991) suggèrent que, le noyau indol de β-carboline peut avoir des propriétés anti-oxydantes similaires. Cela peut expliquer la grande activité antioxydante observée par l'harmane, qui ne possède pas une substitution au niveau du cycle aromatique. Le résultat obtenu par Moura et ces collaborateurs (1964) démontre que l'activité anti-oxydative de β-carboline dépend de la structure chimique de déshydrogénéation de cycle pyridile exemple (harmalol, harmol,

harmaline harmine) qui induit une diminution considérable de l'effet antioxydant, ainsi que le remplacement du groupement hydroxyle par un groupe méthoxyl (harmalol harmaline, harmone harmine).

Toutes les études sur le α -carboline ont trouvé que l'harmalol possède un très bon effet scavenging. Ces études nous laisse suggérer que l'effet scavenging de H_2O_2 par les extrait de *P. harmala* est peut être due à la présence de ce type d'alcaloïdes (harmalol, harmaline,...)

III.6. Chélation du fer

L'efficacité de la chélation du fer par les alcaloïdes de *P. harmala* et de *F. Capreolata* à été déterminé. Les extraits de la partie aérienne, la graine et la racine de *P. harmala* ont exhibé une très bonne activité chélatrices du fer, avec un pourcentage de $96,84 \pm 1,12$; $98,7 \pm 0,18$ et $96,59 \pm 0,76\%$ respectivement, à une concentration de $100 \mu\text{g/ml}$, comparant au résultat obtenue par le chélateur du fer, EDTA à $40 \mu\text{g/ml}$ le pourcentage de chélation est de 99% à l'exception les résultats obtenue par l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *F. capreolata* et de *P. harmala* qui a exhibé un faible effet chélateur du fer (ATF : $27,49 \pm 1,4\%$ et EetPa : $7,5 \pm 1,7\%$) à $125 \mu\text{g/ml}$, et cet effet diminue en augmentant la concentration de l'extrait (figure N°23 et 24). les IC₅₀ de différents extraits sont représentés sur le tableau suivant

Tableau IV: IC₅₀ de la chélation du fer par les extraits de *P. harmala* et de *F. capreolata*

Extraits	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
ATPA	$44,69 \pm 1,98$
ATSE	$22,46 \pm 0,71$
ATR	$46,58 \pm 2,78$
ATF	/
EETPA	/

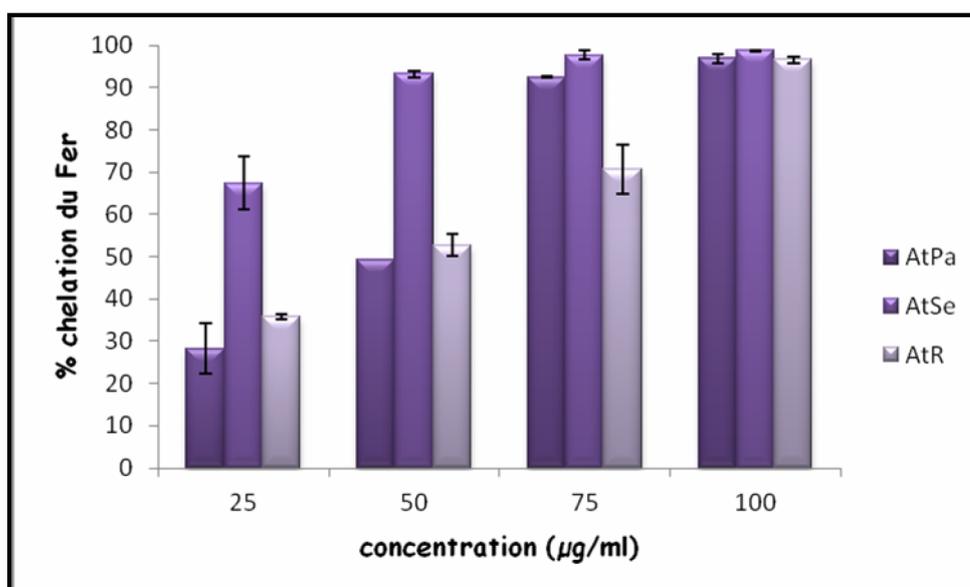


Figure N°24 : Chélation du Fer ferreux par les extraits de *P. harmala*
 ATPA : alcaloïdes totaux de la partie aérienne ; ATSE : alcaloïdes totaux de la graine ; ATR :
 alcaloïdes totaux de la racine.

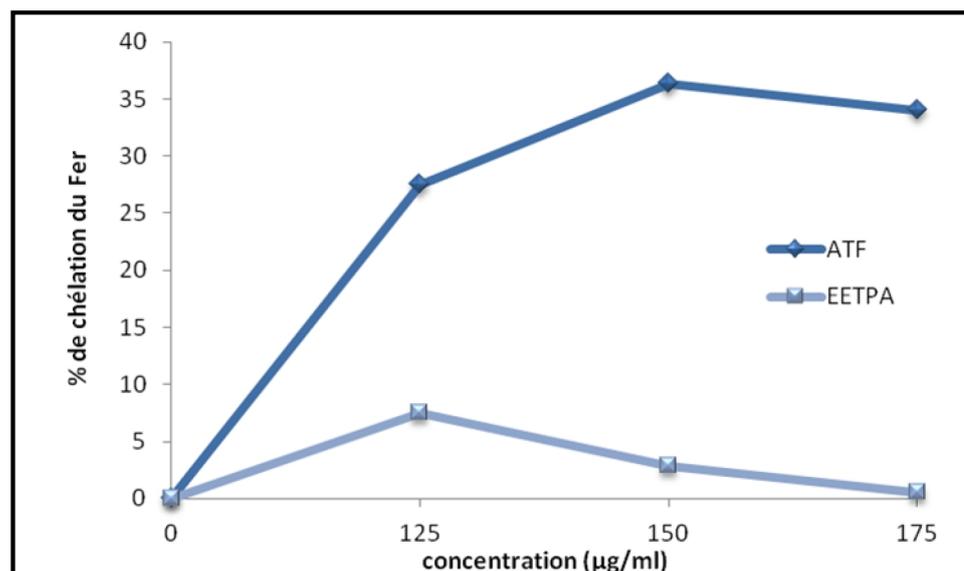


Figure N°25 : Chélation du Fer ferreux par l'extrait de *F. Capreolata* (ATF)
 et de l'extrait éthanoliques de *P. harmala* (EETPA)

L'effet de la chélation du fer obtenue par nos trois extraits ATPa, ATR, ATSe est peut être due à la présence des alcaloïdes qui ont des groupements fonctionnelle actif. Des études ont été faite par Jang et ces collaborateur (2003), ont démontré que les composés avec des

structures qui contiennent deux ou plusieurs groupement fonctionnelle OH, SH, COOH, PO₃H₂, C=O, NR₂, S, et O peuvent avoir une activité chélatrices des métaux .

D'autres études ont été faites par Sihrawalka et *al* (2006) sur la chélation du fer par la berbérine, ont démontré que cette molécule joue un rôle très important comme chélateur du fer. Ces résultats nous mène à suggérer que l'effet de la berbérine contenue dans les alcaloïdes de *F. capreolata* est inhiber par la présence d'autres alcaloïdes à effet antagoniste ou une inhibition par excès de substrat, ce qui explique la diminution de l'effet en augmentant la concentration de l'extrait .

III.7. Effet cytotoxique des extraits de *F. capreolata* et *P. harmala*

Ce test nous a permis d'évaluer l'effet cytotoxique de différente concentration des alcaloïdes de *F. capreolata* et de *P. harmala* sur les globules rouges. Les résultats du pourcentage d'hémolyse sont représentés dans la figure N°26. Comme le montre cette dernier à différentes concentrations (0,4 et 1mg/ml) des extraits de *F. capreolata* et de *P. harmala* n'ont presque pas effet cytotoxique sur les globules rouges, dont le pourcentage d'hémolyse est inférieure à 10 %. A l'exception de l'extrait ATPa de *P. harmala* qui exerce un effet hémolytique, à 1mg/ml le pourcentage d'hémolyse est de : 77,34%.

Des images prises sous microscope photonique a fin d'observer la forme des globules. On remarque que les globules rouges traités avec les extraits ont gardé leur forme intacte et aucune altération ne s'est produite (flèches noires) en comparant au control négatif (tampon). A l'exception, de l'extrait ATPa où on observe une hémolyse qui est presque totale à 1mg/ml (flèches blanches).

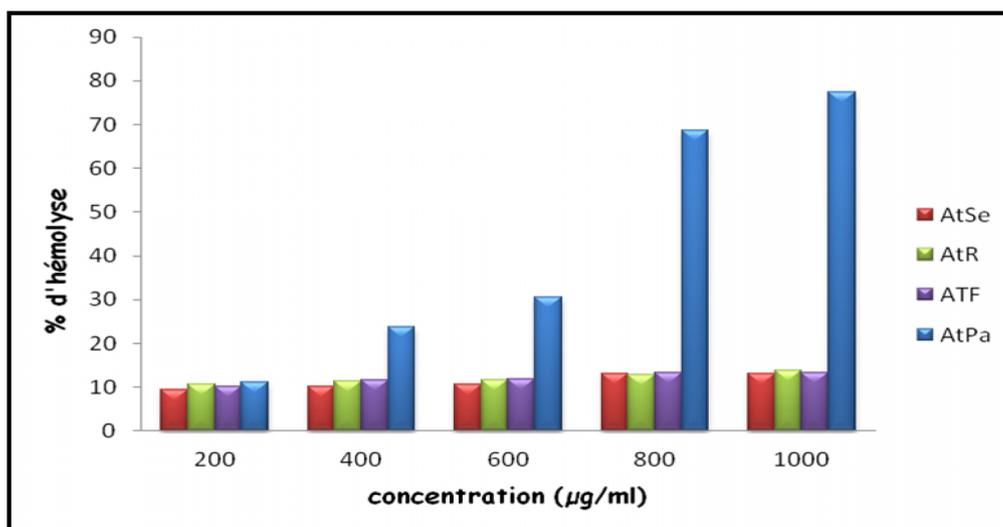


Figure N°26 : Effet hémolytique des extraits de *F. capreolata* et de *P. harmala*

ATPa : alcaloïdes totaux de la partie aérienne ; ATSE : la graine ; ATR : alcaloïdes totaux de la racine ; EetPa extrait éthanolique de *P. harmala* ; ATF : alcaloïdes totaux de *F. capreolata*

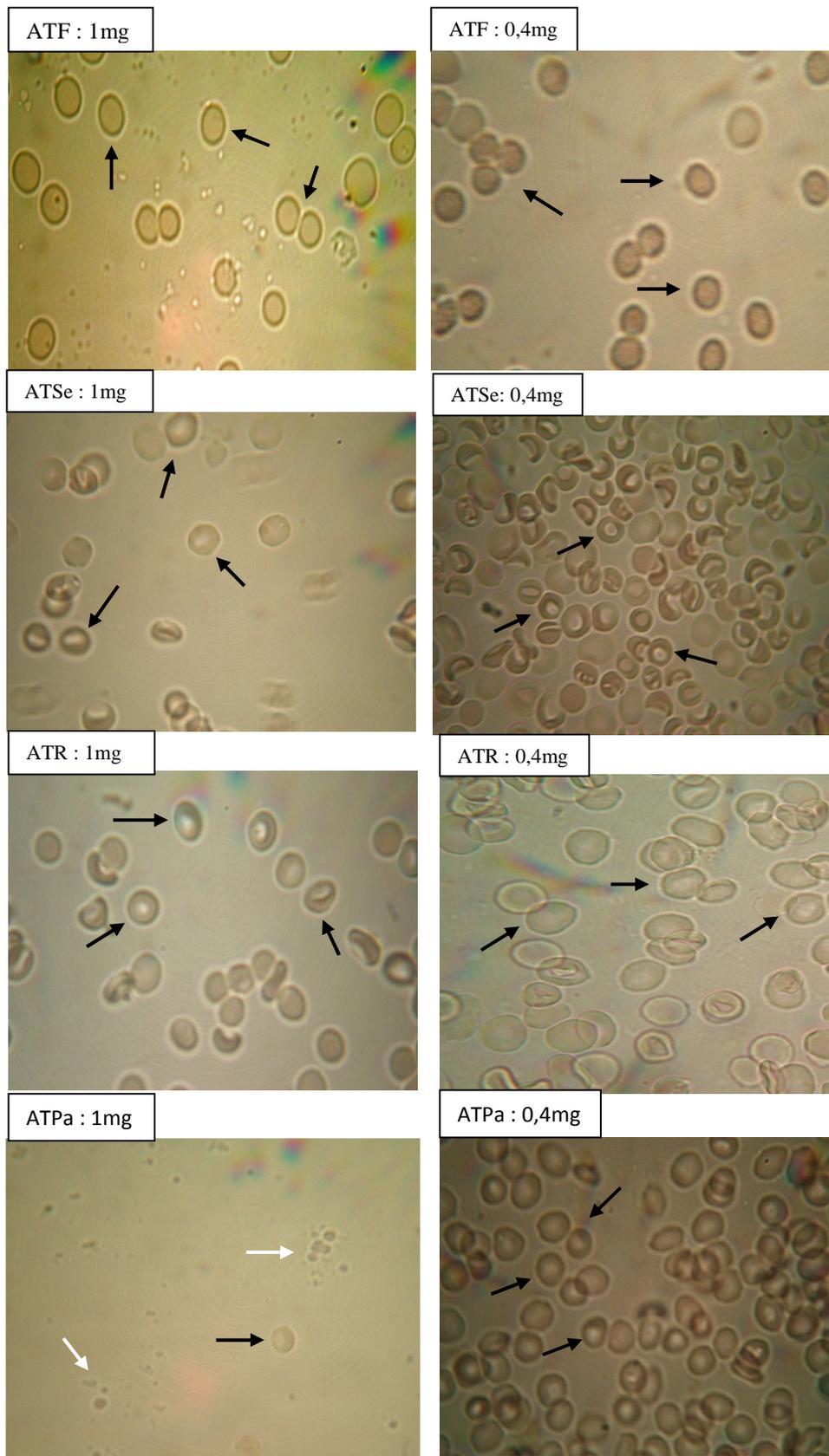


Figure N°27 : Photographie des globules rouges observée sous microscope optique (GX100) traité par les alcaloïdes de *F. capreolata* et *P. harmala*. ATPa : alcaloïdes totaux de la partie aérienne ; ATSE : alcaloïdes totaux de la graine ; ATR : alcaloïdes totaux de la racine ; ATF : alcaloïdes totaux

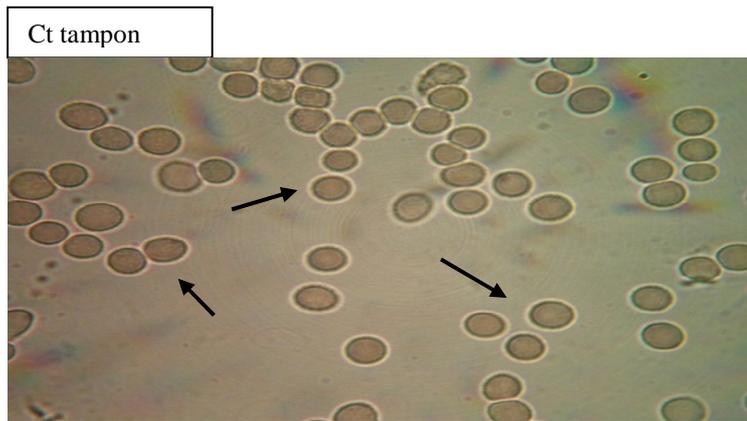


Figure N°28 : Photographie des globules rouges observés sous un microscope optique (GX100) traité par control négative (tampon)

Conclusion

Conclusion

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. Ces molécules suscitent actuellement l'intérêt de plusieurs recherches en raison de leurs diversités et leurs multiples effets pharmacologiques.

Nous avons choisi dans cette étude deux plantes (*F. capreolata* et *P. harmala*) riches en alcaloïdes. Les extraits des deux plantes possèdent un grand pouvoir réducteur avec la concentration de 800µg/ml. Les alcaloïdes de *F. capreolata* exercent de fortes activités scavenging du radical ABTS à une concentration de 800µg/ml et de peroxyde d'hydrogène à 100µg/ml, par contre son activité est moins importante dans la chélation du fer. Un grand effet scavenging contre le radical DPPH à 800µg/ml est exercé par les alcaloïdes totaux de la graine de *P. harmala*, une très bonne activité contre le radical ABTS est marquée par les alcaloïdes de la graine, avec une meilleure activité de chélation de fer est obtenue avec les extraits de la partie aérienne, la graine et les racines, à une concentration de 100µg/ml. L'extrait éthanolique de la partie aérienne *P. harmala* a exercé un faible effet scavenging de H₂O₂. Les alcaloïdes des deux plantes sont avérés non toxiques avec les concentrations allant de 0,4 à 1mg/ml par l'absence d'effet hémolytique sauf pour les alcaloïdes de la partie aérienne de *P. harmala* qui sont toxiques surtout avec les concentrations 800 et 1000µg/ml.

Notre étude a fait la lumière sur la capacité antioxydante des extraits de *F. capreolata* et *P. harmala*. Il serait, cependant, très utile d'approfondir et d'élargir cette étude, surtout la purification et la détermination de la structure des molécules actives dans chaque extrait en vue de caractériser les composés responsables de ces effets biologiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abbassi K., Mergaoui L, Kadiri Z. Atay, Stambouli A. et Ghaout S. (2003) -Effects of extracts of *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) on the desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskål, 1775). 13/14: 203-217.

Afonso V., Campy R., Mitrovic D., Collin P. et Lomri A. (2007) -Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme*, 74: 636–643.

Ardanas N. et PAGANO P.J. (2006) -Hydrogen Peroxide as a Paracrine Vascular Mediator :Regulation and Signaling Leading to Dysfunction.*Experimental Biology and Medecine*, 231-237.

Barouki R., Morel Y. (2004) - Oxidative stress and gene expression. *J Soc Biol*, (195), p: 82-377.

Bartosz G. (2009) -Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochemical pharmacology*, 77: 1303– 1315.

Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio*, 2 (1) : 43-52.

Berger M.M. et Chioléro R.L. (2001) -Apport d'antioxydants en réanimation : pourquoi, les quels, avec quels objectifs? *Réanimation*, 10 :527-34.

Berger, M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20: 48–53.

Berrougui H., Martin-Cordero C., Khalil A., Hmamouchi M., Ettaib A., Marhuenda E. et Herrera M.D. (2006) -Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from *Peganum harmala* L. seed's in isolated rat aorta. *Pharmacological Research*, 50: 150-157.

Brito C., Naviliat M., Adriana C., Tiscornia L., Vuillier F., Gualco G., Dighiero G., Radi Bruneton J. (1987) -Elément de phytochimie et de pharmacologie. *1^{ère} Edition Technique et Documentation Lavoisier*, p: 345.

Bruneton J. (1999) -Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. *3^{ème} Edition Technique et Documentation Lavoisier*, p : 239-915.

Bruneton J. (2001) -Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et animaux. *2^{ème} Edition Technique et Documentation Lavoisier* p: 542.

Cao R., Peng W., Wang Z et Xu A. (2007) -B-Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. *Current Medicinal Chemistry*, 14: 479-500.

- Chopra I. C., Abrol B. K., et Handia K.L.,** (1960) –Les plantes médicinales des régions arides. *UNESCO*, 16-72
- Christelle K. R. (2006)** - Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20: 165–177.
- Cui W., Iwasa K., Tokuda H., Kashihara A., Mitani Y., Hasegawa T., Nishiyama Y., Moriyasu M., Nishino H., Hanaoka M., Mukai C. et Takeda K. (2006)** -Potential cancer chemopreventive activity of simple isoquinolines, 1-benzylisoquinolines, and protoberberines. *Phytochemistry*, 67: 70–79.
- Darabpour E., Bavi A. P., Motamedi H. et Seyyed Nejad S. M. (2011)** -Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala L.* Growing in IRAN against multi-drug resistant bacteria. 10: 252-263.
- De Leiris J. (2003)** -Biochemistry of free radicals. *Heart Metabolism*, 19: 40–44.
- Dekhuijzen P.N. (2004)** - Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 23: 36- 629.
- Delattre J & Coll. (1995)** - Radicaux libres et vieillissement. *Act. Pharm. Biol. Clin*, 8 p: 31 47.
- Delille, L. (2007)** -Plantes médicinales d'Algérie. Edition Berti p: 120.
- Droge, W. (2002)** -Free radicals in the physiological of cell function. *Physiology Reviews*, 82: 47-95.
- El Gendy. M. A. M, Soshilov. A. A, Denison. M. S, El-Kadi. A. O.S. (2012).** Transcriptional and posttranslational inhibition of dioxin-mediated induction of CYP1A1 by harmine and harmol. *Toxicology Letters*, 208: 51-61.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, 108-115.
- Fontaine, (2007)** -Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Chapitre: radicaux libres. *Edition Springer*, 252-254.
- Gaudable G. et Favier A. (1997)** -Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol*, 11 :115-20.
- Gilani, A.H; Atta, U. R. (2005)** -Perspective paper. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 43-49.
- Guignard J.L. (1979)** -Les alcaloïdes et les dérivés de l'acide cyanhydrique. In *Abrégé de Biochimie Végétale. Edition Masson* : 08.

Guignard J.L. (1996) -Métabolismes secondaires .In Abrégé de Biochimie Végétale. *Edition Masson* : 169-187.

Guignard J.L. (2000) -Métabolismes secondaires. In Abrégé de Biochimie Végétale. *Edition Masson* : 155-201.

Hadieh B., Abo Farich B., Said O. et Saad B. (2010) - Anti-Inflammatory Effects of Herbal-Derived Factors Are Mediated By Down Regulation Of Pro-Inflammatory Cytokines. 78-8.

Herraiz T. et Galisteo J. (2004) -Endogenous and dietary indoles: a class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay. *Free Radic, Res* 38:323–331.

Hurabielle M. et Paris M. (1981) -Pharmacognosie .Abrégé de matériel Médical. Plantes à alcaloïdes. 2^{ème} Edition. *Masson* : 256-262.

Iwasa K., Moriyasu M., Nader B (2000) – Fyngicidal and herbicidal activities of berberine related alkaloids. *Biosc.Biotechnol.Biochem*, 64(9): 1998-2000.

Jang M. H., Kim H. Y., Kang K.S., Yokozawa T. et Park J. H. (2009) - Hydroxyl Radical Scavenging Activities of Isoquinoline Alkaloids Isolated from *Coptis chinensis*. *Archives of Pharmacal Research*. 32: 341-345.

Januel C. (2003) -Strss oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète: étude de glutathion et de glutathion peroxydase 4.Thèse de Doctorat Biochimie. N°03.Université de Lyon I/INSA-Lyon, P: 200

Khalid A., Choudhary M. I., Haq Z., Ghayur M. N., Feroz R. A., Gilani A. H. (2004) - Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. *Journal of steroidal Biochemistry and Molecular Biology*, 92: 477-484.

Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et métabolisme*, 20: 165-177.

Lamchouri F., Settaf A., Cherrah Y., Hassar M., Zemzami M., Atif N., Nadori E.B., Zaid A., Lyoussi B. (2000) -In vitro cell-toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. *Fitoterapia*,71: 50-54.

Larousse (2001) -Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparation, soin. 213-245.

Lin, C., Chen, C., Liang, Y. and Lind, J. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthin oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 294: 167-169

- Morceau F.** (1964) -Alcaloïdes et Plantes Alcaloïfères. 3^{ème} Edition. Presse Universitaires de France: 12-18.
- Moura D.J., Richter M.F., Boeira J.M., Henriques J.A.P et Saffi J.** (2007) -Antioxidant properties of β -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, 22:293–302
- Moussard C.** (2006) -Annexe, Radicaux libres oxygénés et anti oxydant. In Biochimie structurale et métabolique. 3^{ème} édition. De Boeck et Larcier. s.a, Bruxelles. pp, 335-341
- Neitlesbip L. et Slaytor M.** (1971) -RUINE: A glucosidic β -carboline from *Peganum harmala*. *Phytochemistry*. Pergamon Press. Printed in Englan, 10: 231-234.
- Nenaah G.** (2010) -Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, 81: 779-782.
- Palanisamy, U., Ming, C. H., Masilamani, T., Subramanian, T., Teng, L. L., and Ammun, K.** (2008) Rind of the rumbutan, *Nephelium lappaceum*, a potential source of naturel antioxidants. *Food chemistry*, 109: 54-58
- Pastre J. O. C.** (2005) -Intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse présentée et soutenue publiquement en vue de l'obtention du diplôme de docteur Veterinaire, *Ecole national Vétirinaire de Toulouse*, 120.
- Perveen, A. et Qaiser, M.** (2004) -Polien flora of pakiston-XL. Fumariaceae. *Pak J. Bot*, 36: 467-473.
- Pincemail J., Lecomte J., Collart E., Castiaux J. P., et Defraigne J. O.** (2003) -Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 6 (5): 1.
- Pincemail, Boujean K. K., Cayeux et Defraigne J.O** (2002) -Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxydant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 :233-239.
- Quezel P. et Santa S.** (1963) -Nouvelle Flore de l'algerie et regions desertiques méridionales. *Ed. CNRS*, P: 590.
- R. et Cayota A. M.** (1999) -Peroxynitrite Inhibit T lymphocyte Activation and Proliferation by Promoting Impairment of Tyrosine Phosphorylation and Peroxynitrite Driven Apoptotic Death. *The American Association of Immunologists*, 162: 3356-3366.
- Rabaud C., Tronel., Fremont S., May T., Canton P. et Nicolas J.P.** (1997) -Radicaux libres et infection par le VIH. *Annales de biologie clinique*, 55 :556.
- Rahman A. R. et Choudhary M. L.,** (2001) -Bioactive Natural Products as a Potential Source of New Pharmacophores. *Pure and Applied Chemistry*, 73: 555-560.

- Rahman a. U., Choudhary M. I., Gilani a. H., Shahreen F. et Sever B.** (1992) –Alkaloids constituents of *Fumaria indica*. *Journal of Phytochemistry*, 63: 129-135.
- Rahman A., Farooq A., Chaudhary M.I., Gilani A.H., Shaheen F., Ali R. A., Nooreain F. et Sener B.** (1994) -A new Anticholinergic Steroidal alkaloid from *Fritillaria imperialis* of Turkish origin. *Planta Medica*, 60: 377-379.
- Richter G.** (1993) –Physiologie et Biochimie. Métabolisme des végétaux. Edition Presse p: 33.
- Shirwaikar A., Shirwaikar A., Rajendran K. et Punitha I.** (2006) -In Vitro Antioxidant Studies on the Benzyl Tetra Isoquinoline Alkaloid Berberine. *Biol.Pharm. Bull*, 29:1906-1910.
- Souséck D., Guedon T., Adam H., Bocharakova E., Taborska I. et Valkaandmanek V.**(1999) -Alkaloids and Organic Acids Content of eight *Fumaria*. *Phytochemical Analysis*, 10 p: 6-11.
- Suau R., Cabezud B., Rico R., Negera F. et Lopez-Romero J .M.** (2002) -Determination of Alkaloids contents in *Fumaria* Speies by GC –MS, 363 p: 363-367.
- Tahrouch S., Rapior S., Mondolot-Cosson L., Idrissi-Hassani L. A., Bessière J. M. et Andary. C.** (2002) -*PEGANUM HARMALA* : SOURCE COMBINÉE D'AROMES ET DE COLORANTS. *Reviews in Biology and Biotechnology*. 2: 33-37.
- Thanahashi T. et Zenk M.H.** (1985) -Isoquinoleine Alkaloids from cell Suspension of *Fumaria capreolata*. p: 96-99.
- Torrilles J., Guiérin M., et Previero A.** (1985) -Des structures simples aux potentialités pharmacologiques élevées" les B-carbolines. Origines, synthèses, propriétés biologiques. *Biochimie*, 67: 929-949.
- Tse SYH, Mak I.T. et Dickens B.F.** (1991) -Antioxidant properties of harmaine and b – carboline alkaloids. *Biochem Pharmacol*, 42:459–464.
- Tsuchiya H., Shimizu H. et Iinuma M.** (1999) -Beta-Carboline Alkaloids in Crude Drugs. 47: 440-443.
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M. T. D., Mazura M. et Telser J.** (2007) –*The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 :47.
- Valko M., Morivris H., et Cronin M.T.D.** (2005) -Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr.Med.Chem*, 12:1161-1168.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncola J., Izakovic M. et Mazura M.** (2006) -Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.

Vergely C. et Rochette L. (2003) -Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique cardiologie*, 1: 133.

Wichtl .M. et Anton R. (2003) –Plantes thérapeutiques. *Ed. Tec et Doc*, 229-230.

Xiao X., Liu J., Hu J., Zhu X., Yang H., Wang C. et Zhang Y. (2008) -Protective effects of protopine on hydrogen peroxide-induced oxidative injury of PC12 cells via Ca²⁺ antagonism and antioxidant mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 591: 21–27.

Zheng X., Zhang Z., Chou G., Wu T., Cheng X., Wang C. et Wang Z. (2009) Acetylcholinesterase Inhibitive Activity-Guided Isolation of Two New Alkaloids from Seeds of *Peganum Nigellastrum* Bunge by an In Vitro TLC- Bioautographic Assay. *Archives of Pharmacal Research*, 32: 1245-1251.

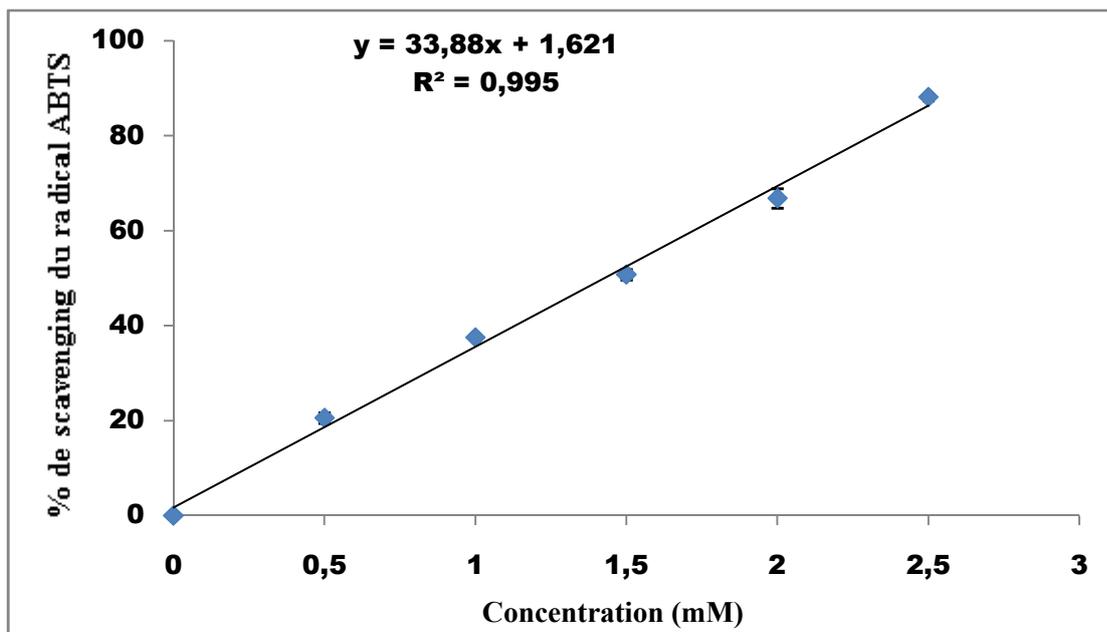
Annexes

Appareillage

- Blance analytique (KERN_{KB}), Max = 510g, d=0,01g ;
- Blance de précision (SARTORIUS), Max=61g, d=0,1mg ;
- Centrifugeuse de marque Sigma 5,6 ×1000 rpm ;
- Etuve de marque BINDER ;
- Micropipettes de 1000 µl, 50 µl, éprouvettes, entonnoir, erlenmeyer, béchers, tubes à essais.
- pH mètre (extech) ;
- Spectrophotomètre à UV;
- Spectrophotomètre visible ;
- Vortex (VELP scientifica) ;

Produit chimique utilisés

- Acide chlorhydrique (HCL) (prolabo) ;
- Acide trichloracétique (TCA) ;
- Acide : Sodium dihydrogène-phosphate 1-hydrate (NaH₂PO₄-H₂O) ;
- Acide : sodium dihydrogène phosphate 1-hydrate (H₂KPO₄) ;
- Base :Disodium hydrogenphosphate anhydre (Na₂HPO₄) ;
- Base : di-potassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄) ;
- Chlorure de sodium (NaCl) ;
- Chlorure ferreux (FeCl₂) ;
- Chlorure ferrique (FeCl₃) (prolabo) ;
- Ethanol (prolabo),
- chloroforme,
- dichloromethane,
- ammoniaque ;
- K₃Fe(CN)₆ (ferricyanure de potassium);
- Standards (acide caféique, BHA, Trolox) de marque sigma ;
- Thiocyanate d'ammonium;



La courbe d'étalonnage de trolox.

Résumé :

Fumaria capreolata (Fumariacées) et *peganum harmala* (Zygophyllacées) font partie des plantes médicinales les plus utilisées en médecine traditionnelle. Ce sont des plantes riches en métabolites secondaires notamment les alcaloïdes, qui leur confèrent plusieurs propriétés pharmacologiques. Dans ce travail nous avons appliqué des méthodes *in vitro* pour étudier l'effet antioxydant des deux plantes à savoir le pouvoir réducteur, l'effet scavenger du radical DPPH, ABTS et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), chélation du Fer et le test d'hémolyse. A une concentration de 0,8mg/ml, Le meilleur pouvoir réducteur a été obtenu par l'extrait de *F. Capreolata*. ATF (0,57 UA) par contre les extraits de *P.harmala* ont donné un faible pouvoir réducteur (de 0,1 à 0,18 UA). Tandis que leur effet sur le radical ABTS, on note que le seul extrait ATSE possède un fort effet scavenger avec un pourcentage de 71,39%, par contre les autres extraits notamment celui de ATF où leur pourcentage est inférieur 41%. Les extraits des deux plantes ont exhibé un très bon effet scavenger sur le H₂O₂ à une concentration de 100µg/ml avec un pourcentage qui est supérieur à 90% pour les extraits de *P. harmala* et de 78,89% pour l'extrait de *F. capreolata*. Le test d'hémolyse sur les deux plantes démontre qu'il n'y a aucune toxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges à des concentrations de (0,2-1mg/ml), à l'exception de l'extrait ATPa de *peganum* qui exerce une hémolyse à partir de 0,4mg/ml.

Mot clés : *F.capreolata*, *P.harmala*, Alcaloïde, Activité antioxydante.

Abstract:

Fumaria capreolata (Fumariaceae) and *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) are among the most commonly used medicinal plants in traditional medicine. These plants are rich in secondary metabolites such as alkaloids, which give them several pharmacological properties. In this work we applied *in vitro* methods to study the antioxidant effect of two plants namely reducing power assay, DPPH, ABTS and hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging assay, Iron chelation and hemolysis test. At a concentration of 0.8 mg / ml, best reducing power was obtained with the extract of *F. Capreolata*, ATF (0.57 AU). In contrast, the extract of *P. harmala* gave a low reducing power (from 0.1 to 0.18 AU). While their effect on the ABTS, we noted that the only extract ATSE has a strong scavenger effect with 71.39%, in contrast, the other extract particularly ATF which their percentage is less than 41%. The extracts of both plants exhibited a very good effect on the H₂O₂ scavenger at a concentration of 100µg/ml with a percentage that is greater than 90% for extracts of *P. harmala* and 78.89% for the extract of *F. capreolata*. The hemolysis test of both plants showed that there is no toxicity of the extracts on the red blood cells at concentrations of (0.2 to 1mg/ml), with the exception of the extract ATPa of *peganum* which trained hemolysis from 0.4 mg/ml.

Key words: *F.capreolata*, *P.harmala*, Alkaloids, Antioxydant activity.