

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre.....

N° de série.....

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie
Option : Biochimie Appliquée

Les avénathramides de l'avoine (*Avena sativa*) avant et après germination de la graine

Présenté par :

- BOUMELLA Hocine

Devant le jury :

- Président du jury : Prof. KHELIFI Douadi. (UFMC1)
- Examineur: Dr. BECHKRI Sakina. (UFMC1)
- Encadreur : Dr. BELLIL Inès. (UFMC1)

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

Au terme de ce travail, je remercie Dieu le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné le courage et la patience pour accomplir ce modeste travail.

je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Dr. BELLIL INES, Maître de conférences, pour avoir accepté d'encadrer ce mémoire, je la remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire.

Que Prof. HKELIFI DOUADI, trouve ici l'expression de mes respectueuses gratitude et le témoignage de mes profonds remerciements pour avoir accepté de présider ce jury

Je remercie le membre de jury Dr. BECHKRI Sakina, Maître de conférences, d'avoir bien voulu accepter d'examiner ce travail.

Liste des abréviations

- **AA** : Acide Anthranilique
- **AVA** : Avénanthramides
- **CID** : Collision-Induced Dissociation
- **ESI**: Electrospray Ionization
- **FAO** : Food and Agriculture Organization
- **FDA**: Food and Drug Administration
- **FTMS**: Fourier Transform Mass Spectromete
- **HCD** : Higher-Energy Collisional Dissociation
- **HR** : Humidité Relative
- **HZ**: Hertz
- **INCI** : La Nomenclature Internationale des Ingrédients Cosmétiques

- **IT** : Ion Trap
- **MS**:Mass Spectrometry
- **NF- κ** :Nuclear Transcription Factor Kappa
- **PA** : Acide phenylacénoïque
- **R** : Resolution
- **RP- UHPLC-PDA** : Reversed Phase Ultra High Performance Liquid Chromatography
Photodiode Array

Liste des figures

Fig 01 : Avoine vêtue (<i>Avena sativa</i>), gravure sur bois de Léonhart Fuchs, coloriée à la main.....	04
Fig 02 : photo d'une plante d' <i>Avena sativa</i> L	05
Fig 03 : Carte schématique représentant les zones céréalières de l'Algérie	08
Fig 04 : La production d'avoine en Algérie entre 1961-2014.....	09
Fig 05 : structure générale des β -glucanes	12
Fig 06 : Structure Chimique Des Avenanthramides	16
Fig 07 : Spectres ESI-IT-MS typiques des avenanthramides en mode négatif complet MS (A) et MS2 (B), et mode positif complet MS (C) et MS2 (D), démontré avec un standard de l'avenanthramide 2f	23
Fig 08 : Spectres de fragmentation HCD haute résolution (NCE = 35) des étalons d'avenanthramide 2p, 2c et 2f en mode d'ionisation négative obtenus par perfusion directe dans FTMS	25
Fig 09 : Spectre de fragmentation HCD haute résolution (NCE = 25) de m / z 324,08776 en mode négatif, qui a été provisoirement annoté comme avenanthramide 2pd	26
Fig 10 : voies de fragmentation des avénanthramides, des combinaisons de I à v avec α , β ou γ sont possibles.	28
Fig 11 : Chromatogrammes UHPLC-ESI-IT-MS en mode négatif d'extrait de semis d'avoine dans les plages m / z 200–1000 (en haut) et m / z 425–550 (en bas)	29
Fig 12 : Chromatogrammes UHPLC-PDA des extraits de graines d'avoine et de plantules enregistrés à 340 nm	31
Fig 13 : Teneur en avenanthramide des grains et des plantules d'avoine en μmol d'avenanthramides par 100 g de MS, basé sur la surface en UHPLC-PDA à 340 nm quantifiée en utilisant une courbe d'étalonnage de 2c	33

Liste des tableaux

Tableau 01 : composition chimique du grain d'avoine	11
Tableau 02 : nomenclature des AVAs selon Collins et Dimberg	17
Tableau 03 : Spectrométrie de masse haute résolution FTMS , mode d'ionisation négative et positive ESI-IT-MSn. Données spectrométriques et spectroscopiques UV-Vis des pics de glycoside avenanthramide provisoirement annotés	27
Tableau 04 : Annotations provisoires des pics d'avenanthramide (figure 16) et les données spectrométriques obtenues en utilisant le mode d'ionisation négative ESI-IT-MSn.....	30
Tableau 05 : Teneur en avéanthramides des grains d'avoine et des plantules en μmol d'avenanthramide pour 100 g de matière sèche	32

Sommaire

Titre	page
Introduction Générale	01

PARTIE I Revue bibliographique

Chapitre I :Avoine

I .1.Histoire	03
I.2..Description de la plante.....	04
I.3. Morphologie De La Plante.....	05
I.4. Origine génétique.....	06
I.5. Classification.....	06
I.6. Culture de l'avoine.....	07
I.6.1.Production mondiale	07
I.6.2.Production en Algerie.....	07
I.7. Utilisation.....	09
I.7.1.Historique d'utilisation d'avoine.....	09
A• Alimentation humaine.....	10
B• Alimentation des bétails « animaux ».....	10
1.8.Composition du grain d'avoine	11

ChapitreII :Les Avéanthramides

II .1.Définition	13
II.2 . Les effets protecteurs ;Utilisations médicales et de soins personnels	14

II.3.Nomenclature.....	16
II.4.Structures des avenanthramides.....	16
II.5.Concentration des avenanthramides.....	17
II.6.Biosynthèse.....	17
II.7.Stabilité chimique.....	18
II.8.Avenanthramides synthétiques.....	18

Partie II:Etude Et Analyse D'article

RESULTATS ET DISCUSSION

1.Materiel vegetal	19
2.Préparation de l'échantillon.....	19
2.1. Germination des grains d'avoine	19
2.2. Lyophilisation.....	20
2.3. Broyage.....	20
2.4. Délipidation.....	20
3. Extraction des avéanthramides.....	20
4. Séparation des avéanthramides par Chromatographie liquide à ultra-haute performance analytique en phase inverse	21
5. Détection des avéanthramides	22

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Ionisation et fragmentation des avenanthramides	23
I.1. Etude systématique des avenanthramides 2p, 2c et 2f.....	23
I.1.1 Détection des fragments.....	23
I.1.2. Identification des fragments	26

I.1.3. Avenanthramides à longue chaîne	26
I.1.4. Glycosides d'avenanthramide	27
I.2. Voies générales de fragmentation des avenanthramides.....	29
II. Identification des avenanthramides des semis d'avoine	30
III. Profil des avenanthramides des plants d'avoine.....	32
Conclusion	36
Références bibliographiques	37
Résumé	



INTRODUCTION

L'avoine (*Avena sativa* L.) a une longue histoire de consommation humaine et est considérée comme l'une des céréales à grains entiers les plus importants dans l'alimentation (**Jacobs et Gallaher, 2004; Slavin et al., 1999**) ; ses grains sont caractérisés par leur richesse en fibres solubles, b-glucanes, lipides, protéines et antioxydants (**J. Isidro-Sánchez, 2020**) dont les avenanthramides (AVA) font partie de ces derniers.

Les avenanthramides (AVA), un groupe de métabolites phénoliques secondaires, ont été signalés comme étant biodisponibles (**Chen et al., 2007; Koenig et al., 2011**) et possèdent des effets antioxydants et anti-inflammatoires. Par conséquent, les AVA peuvent être au moins partiellement responsables des bienfaits de l'avoine pour la santé (**Meydani, 2014**).

Une grande diversité des avenanthramides a été signalée dans plusieurs travaux où la nomenclature de ces composés était sur une base alphabétique (**Collins, 1989; Collins et Mullin, 1988**). Dimberg introduit plus tard une nomenclature plus systémique, entraînant un système où un nombre indiquant la sous-unité de l'acide anthranilique (AA) et la sous-unité de l'acide phénylalcénoïque (PA) entrant dans la composition des avenanthramides (**Bratt et al., 2003; Dimberg et al., 2001**). Un indice supplémentaire « d » (par exemple 2pd) est utilisé pour indiquer les sous-unités de PA à longue chaîne.

Les AVAs sont une famille de plus de 25 acides N-cinnamoylanthraniliques substitués, et leurs structures moléculaires contiennent une partie d'acide anthranilique conjuguée à une partie d'acide cinnamique via une liaison amide (**Bratt, et al., 2003; F.W. Collins, 1989; Jastrebova et al, 2006**). Les AVAs majeurs sont 2f, 2p et 2c (**Dimberg et al, 2009**). Selon les dernières recherches, le nombre d'AVAs connus a été largement augmenté en décrivant une variété de plusieurs glycosides et hexosides avec les AVAs (**Wu et al, 2018**).

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution utilisant l'ionisation par électro-spray couplée à la chromatographie à ultrahaute performance pour la séparation, la détection et l'identification des AVA (**Jastrebova et al., 2006**).

Dans ce contexte, et pour apprécier la diversité des avenanthramides de l'avoine, nous avons initié ce travail qui consiste en l'étude et l'analyse d'un article scientifique se rapportant à la question intitulé «Caractérisation par spectrométrie de masse des avenanthramides et amélioration de leur production par germination de l'avoine (*Avena sativa*) », réalisé par **De Bruijn et al 2019**. Le but de cet article est l'extraction, la

séparation, la détection et l'identification des AVAs des grains d'avoine avant et après germination en utilisant la chromatographie (UHPLC) à haute performance couplée à la spectrométrie ESI-IT et la spectrométrie ESI-FTMS.

Le présent mémoire est structuré en deux parties ; les données bibliographiques sont présentées dans la première partie de ce mémoire, avec une présentation générale de l'avoine en mettant l'accent sur les caractéristiques biochimiques, classification et production suivie par une présentation des avéanthramides. La deuxième partie se rapporte à l'analyse et l'étude de l'article scientifique et décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées ainsi que les étapes suivies dans l'exploitation des résultats et leur discussion. Une conclusion générale et des perspectives sont enfin données.



PARTIE I

Revue bibliographique

I. Avoine :

I.1. Histoire :

L'avoine cultivé ou le genre *Avena* venant du grec "Avea" signifiant "desiré" ;parfois appelée « avoine commune », « avoine byzantine » ou simplement « avoine »,est originaire du nord-est de l'Europe (Autriche et Russie) et des plateaux de l'Éthiopie et de la Chine.

La plus ancienne avoine cultivée a été découverte dans des grottes en Suisse et daterait de l'époque de l'âge de bronze (**Peer Schilperoord ,2017**), et en Égypte dans les vestiges de la 12^eème Dynastie, autour de 2000 ans avant J.-C., et devait probablement provenir de plantes sauvages, puisque l'avoine n'était pas encore cultivée à cette époque (**Wissam et Madiha, 2017**) .

L'avoine a été introduite en Amérique en 1609 sur les îles Elizabeth, sur les côtes de l'État du Massachusetts et Georges Washington, premier président des États-Unis d'Amérique, en aurait semé 234,71 hectares en 1786 (**Sirodot, 2016**).

Le plus ancien écrit sur l'avoine daté dans le 16^eème siècle par le botaniste et le medecin allemand Léonhart Fuchs ,en 1542 dans son ouvrage«Commentaires sur les histoires des plantes», qui a décrit l'avoine comme suit ;« *l'avoine est un herbier avec dentique au blé au niveau de son feuillage, de son chaume et de ses épillets. Les panicules sortent des gaines foliaires, leurs rameaux s'étalent en tous sens. Le fruit aigu est suspendu seul entre les glumes écartées comme des ailes. Chaque fruit a deux graines, directement adjacentes et légèrement coudées en direction l'une de l'autre. Le tout se présente comme une sauterelle. Les racines sont fasciculées.Lieu de culture: Cultivée partout en Allemagne, l'avoine sert davantage de fourrage aux chevaux qu'à l'alimentation humaine.*» (fig 01)(**Peer Schilperoord ,2017**).



Fig 01 : Avoine vêtue (*Avena sativa*), gravure sur bois de Léonhart Fuchs, coloriée à la main

Les écrits du dix-huitième siècle décrivent l'avoine comme étant principalement un aliment pour les chevaux et le bétail en Angleterre et dans d'autres régions d'Europe. Bien que l'avoine fût principalement utilisé pour l'alimentation des animaux, de 1500 à 1700, il était devenu une partie importante du régime alimentaire humain en Écosse, au pays de Galles, en Grande-Bretagne et en Irlande. Lorsque le blé et l'orge ont fait leur apparition dans le marché du continent Européen, la Grande-Bretagne et l'Asie de l'Est, l'avoine et le seigle étaient considérés comme des mauvaises herbes. En effet, la domestication de l'avoine est survenue beaucoup plus tard que celle du blé et de l'orge (**Murphy et Hoffman, 1992**).

I.2. Description de la plante

L'Avoine est une plante herbacée annuelle, aux tiges (chaumes) dressées et feuilles linéaires panicules lâches d'épillets composées de trois fleurs donnant les grains, aux inflorescences en panicules lâches, et des épillets retombants (**L.Bremness, 1999**).

L'avoine est cultivée comme céréale ou comme plante fourragère à couper en vert ; ses pousses tendres et sucrées plaisent aux animaux de la ferme. Elle fait partie des céréales à paille et est utilisée principalement en alimentation animale (fig 02).



Fig 02 :photo d'une plante d'*Avena sativa* L (telabotanica.org)

I.3. Morphologie De La Plante

La plante est facilement identifiable, c'est une monocotylédone à tige cylindrique (cauline) de 25 à 150 cm de haut, au port dressé (tela-botanica.org, 2013)

L'avoine a des fleurs hermaphrodites autopollinisées par le vent. Elles sont arrangées en épillets de 16 à 24 mm à pédoncules barbus, retombants et protégés par deux glumes nervurées presque égales et dépassant la fleur. Les inflorescences sont des panicules lâches. Elles mesurent 8 à 30 cm de long, portant des épillets de deux à trois fleurs, mesurant 20 à 25 mm de long (tela-botanica.org, 2013) Les feuilles glabres, longues et effilées font 2 à 10 mm de large et engainent les tiges. Elles présentent une ligule blanche de 2 à 5 mm sans oreillettes au niveau de leur insertion sur la tige (tela-botanica.org, 2013)

Le grain est un caryopse vêtu entouré de glumelles non adhérentes, mais qui restent fermées. Le lemma est induré, sauf au sommet, et adhère au grain, un caryopse indéhiscent à graine unique est soudé au péricarpe, sauf pour *Avena nuda*, variantes dites « à grains nus » (tela-botanica.org, 2013)

L'avoine peut produire des racines adventives au niveau des noeuds. Son système racinaire fasciculé est relativement puissant, pouvant s'enraciner jusqu'à plus de 1,5 m (tela-botanica.org, 2013)

I.4. Origine génétique

Avena sativa L. est la seule espèce, d'un genre comprenant environ 33 espèces distribuées. Comme le genre *Triticum*, le genre *Avena* est représenté par des espèces diploïdes ($2n=14$), tétraploïdes ($2n=28$) et hexaploïdes ($2n=42$). Le schéma évolutif et les mécanismes responsables de l'évolution de la polyploïdie sont essentiellement les mêmes que ceux décrits pour le blé. Contrairement au blé, le processus de domestication et de culture de l'avoine n'implique que les espèces hexaploïdes.

Deux autres espèces, *A. byzantina* (avoine rouge) et *A. nuda* sont mentionnées dans la littérature comme ayant été cultivées dans les premiers temps en Méditerranée orientale. Ces taxons sont maintenant considérés comme faisant partie d'*Avena sativa* étant donné qu'ils partagent le même génome. Leur grande similarité génétique avec *A. sativa* ne justifie pas de leur donner un statut spécifique (Sirodot,2016 ; Madiha et Wissam 2017).

I.5. Classification

Selon Feillet (2000) l'avoine est une plante annuelle herbacée monocotylédone :

- Règne : *Plantae*
- Sous-règne : *Tracheobionta*
- Division: *Magnoliophyta*
- Classe : *Liliopsida*
- Sous-classe : *Commelinidae*
- Ordre : *Cyperales*
- Famille : *Poaceae*
- Sous-famille : *Pooideae*
- Tribu : *Aveneae*
- Genre : *Avena*
- Espèce : *Avena sativa*

I.6. Culture de l'avoine

I.6.1. Production mondiale

La production mondiale d'avoine représente près de 800 kilogrammes par seconde, soit 25 millions de tonnes par an cultivée sur 10,6 millions d'hectares. L'Union européenne est la 1ère productrice d'avoine devant la Russie et le Canada. Mais ces deux derniers consomment l'essentiel de leur production. campagne 2011-2012 (**FAO ,2012**)

Globalement, la production annuelle est très inférieure à celles de blé, de maïs, ou même d'orge (**Planetoscope, 2012**).

La production mondiale d'avoine a beaucoup baissé dans les 50 dernières années, passant de 50 millions de tonnes dans les années 1960 à 20 millions de tonnes en 2010. L'avoine a cessé d'être l'aliment de choix pour animaux, maintenant remplacée par le maïs et l'orge.

Les pays à climat froid et à culture extensive sont les plus importants producteurs d'avoine au monde. Le Canada est le premier exportateur mondial (2,1 millions de tonnes), et les états unis le plus grand importateur (**FAOSTAT,2015**).

I.6.2. Production en Algérie

La culture des céréales a été, et restera l'élément essentiel de l'agriculture algérienne. Une superficie de 2 448 200 hectares lui est consacrée. Les céréales constituent la composante principale des productions végétales en Algérie, elles couvrent près de 80% de la surface agricole utile (SAU) et intéressent la presque totalité des exploitations agricoles.

La superficie céréalière nationale se situe dans ses deux tiers à l'intérieur du pays (**Belaid, 1986 ; Feliachi, 2002**), pratiquement dans toutes les régions des hauts plateaux situées dans les zones semi-arides et subhumides (isohyète 300 à 450 mm) et des grandes plaines

intérieures littorales et sub-littorales (isohyète 450 à 600 mm/an) (Fig 03).

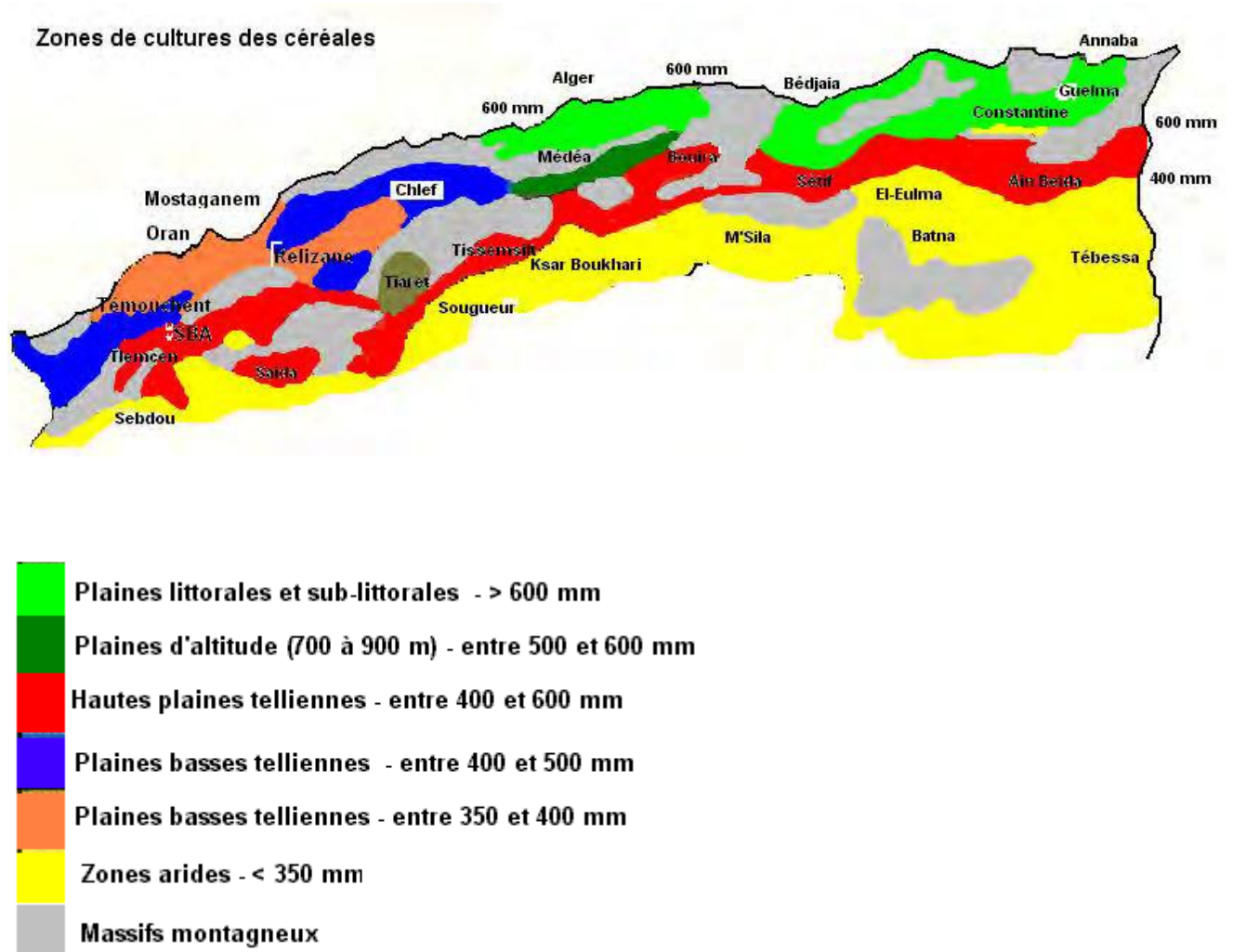


Figure 03 : Carte schématique représentant les zones céréalières de l'Algérie (Belaid, 1986)

En Algérie, l'avoine vient en quatrième position avec une superficie moyenne de l'ordre de 68095,5 ha après le blé dur qui occupe une superficie moyenne de 1314014 ha très importants par rapport aux autres céréales, et a la surface destinée à la céréaliculture (**Ministère de l'agriculture, 2016**). Le rendement moyen de l'avoine est de 11qx par hectare entre 2000_2006.

Pour l'ensemble de la période 1961-2014, une moyenne annuelle de 59 644,07 T a été enregistrée. Le changement enregistré entre la première et la dernière année est de 144 %. C'est en 1991 qu'on enregistre la valeur la plus élevée (128 142T) et c'est en 1966 qu'on enregistre la valeur la plus basse (6 521T) (Fig04). Sur la base des données disponibles, on peut estimer qu'en 2025 la valeur devrait osciller autour de 58 138 T (**FAO, ONU,2014**).

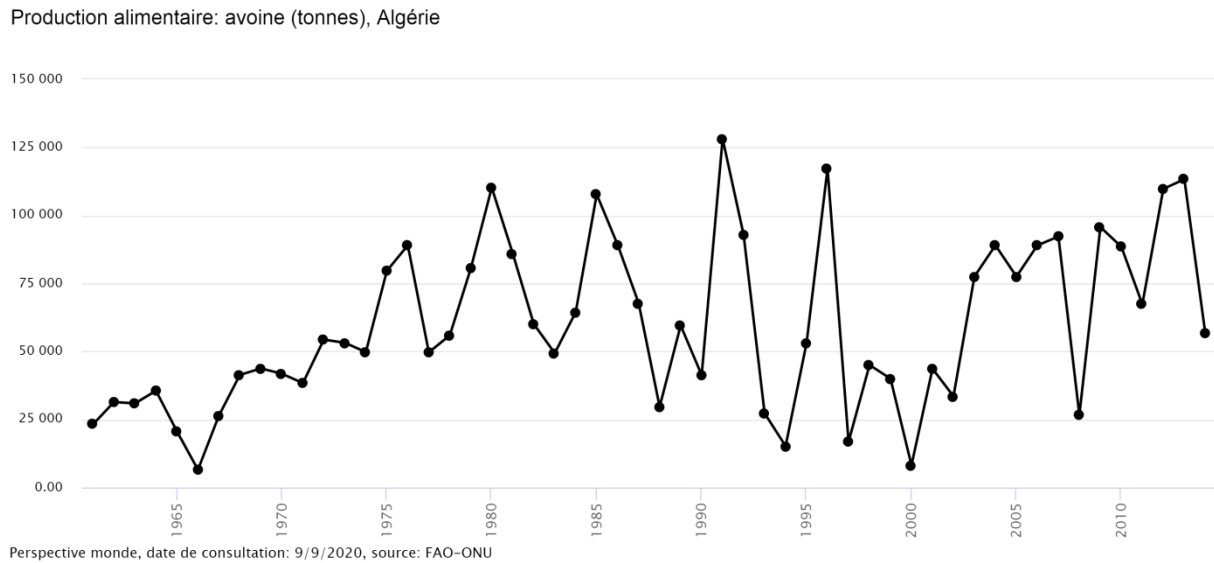


Fig 04 : La production d'avoine en Algérie entre 1961-2014(FAO,2014)

I.7. Utilisation

I.7.1. Historique d'utilisation d'avoine

L'avoine est utilisée à des fins de soins personnels depuis l'antiquité. En effet, la folle avoine (*Avena sativa*) était utilisée dans les soins de la peau en Égypte et dans la péninsule arabique en 2000 avant JC . Les bains d'avoine étaient un traitement courant de l'insomnie, de l'anxiété et des maladies de la peau telles que l'eczéma et les brûlures. À l'époque romaine, son utilisation comme médicament pour les problèmes dermatologiques a été signalée par Pline, Columella et Theophrastus (Melardi , 2013) . Au XIXe siècle, les bains d'avoine étaient souvent utilisés pour traiter de nombreuses affections cutanées, en particulier les éruptions inflammatoires prurigineuses. Dans les années 1930, la littérature a fourni des preuves supplémentaires de l'action nettoyante de l'avoine ainsi que de sa capacité à soulager les démangeaisons et à protéger la peau.

A• Alimentation humaine

L'utilisation de l'avoine dans l'alimentation est surtout d'origine anglo-saxonne ou Nord européen sous forme de flocon ou farine, des biscuits, et la préparation de certaines boissons alcoolisées.

Les produits d'avoine plus récents sont le lait d'avoine (un lait végétal), le son d'avoine recommandé dans le cadre de certains régimes amaigrissants. En 2003, la farine d'avoine colloïdale a été officiellement approuvée comme protecteur cutané par la FDA (**Baumann LS, 2007**). Cependant, peu de réflexion avait été donnée à l'ingrédient actif de l'avoine responsable de l'effet anti-inflammatoire jusqu'à ce qu'une plus grande attention ait été accordée aux avenanthramides, qui ont été isolés et caractérisés pour la première fois dans les années 1980 par Collins (**Dimberg et al 1992 ; Carder et al 2013**).

B• Alimentation des bétails « animaux »

En fourrage, lorsque la plante est récoltée avant l'épiaison, elle constitue un bon aliment pour les ruminants. On peut la cultiver en mélange avec une légumineuse (comme la vesce), ce qui améliore sa teneur en protéines.

Le grain, peut être utilisé en alimentation animale, mais il est moins apprécié que le blé. L'avoine en grains était autrefois très utilisée pour l'alimentation des chevaux, à cause de son "pouvoir excitant" (dont l'origine n'est pas établie), qui était censé stimuler les animaux. Elle est encore utilisée pour les chevaux de sport. Sa valeur énergétique est cependant bien moindre que celle du blé ou de l'orge.

1.8. Composition du grain d'avoine

La composition chimique du grain d'avoine est représentée dans le tableau 01.

Tableau01 : composition chimique du grain d'avoine (**J I-Sánchez et al, 2020**).

Composant	Valeur moyenne%	Interval%
Amidon	51.1	44-61
Protéines	15.2	11-20
Humidité	10.0	9-14
Fibres	8.9	7-11
Lipides	7.6	5-10
B-Glucane	4.2	2.2-6.6
Sucres Libres	1.1	0.9-1.3

Les principaux composants sont :

- **Les protéines** : Les quatre principales protéines du grain d'avoine sont l'albumine, la globuline, la prolamine, et la glutéline, elles sont différentes de celles des autres céréales par leur concentration. L'albumine et la globuline sont les principales protéines de stockage de l'avoine qui ont le plus haut équilibre des acides aminés essentiels pour le corps humain et spécialement riches en Lysine, tandis que la prolamine est la moins concentrée (Singh et al. 2013). Des études récentes ont démontré que l'avoine peut être tolérée par la plupart des personnes souffrant de la maladie cœliaque (J I-Sánchez et al,2020).
- **Les lipides** : sont principalement stockés dans l'endosperme et se caractérisent par la teneur (> 80%) en acides gras insaturés. Ces lipides confèrent la stabilité et la longévité, et ne sont pas seulement impliqués dans les propriétés de la saveur et le collage du grain d'avoine mais déterminent également sa teneur énergétique et ses qualités nutritionnelles (Zhou et al. ,1999a). L'avoine est particulièrement riche en acides gras insaturés comme l'oléique (C 18: 1) et acide linoléique (C 18: 2), comptant pour environ 40 et 36% du total de l'huile contenue (Halima et al.,2015). Les niveaux les plus élevés d'acide insaturé ainsi que les faibles quantités de graisses saturées peuvent réduire le risque cardiaque dans les maladies vasculaires, la teneur élevée en huile et en fibres induit une sensation durable de satiété qui aide à perdre du poids(J I-Sánchez et al,2020).
- **Fibres** : sont des polysaccharides non amyliques et parmi lesquels un constituant propre à l'avoine qui est le ***β-glucane***; c'est des polysaccharides non amyliques formés par des glucoses reliés par des liaisons β (1-3) - (1-4) (fig 05) situés dans les parois cellulaires de l'endosperme et de l'aleurone (Butt et al,2008; Clemens et Van Klinken ,2014) (Fig 05).

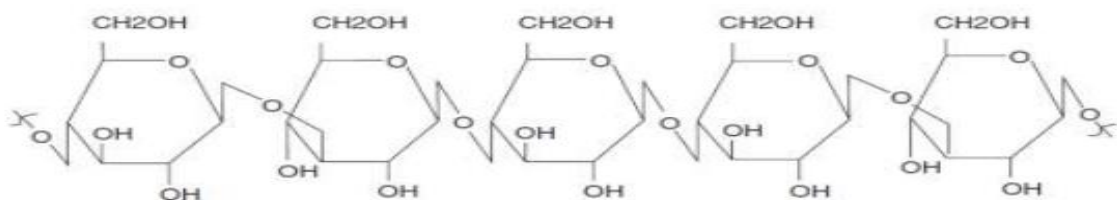


Fig 05 : structure générale des β -glucanes.

Les *β -glucanes* améliorent la dégradation des aliments en retardant la vidange de l'estomac avec un effet amortisseur sur l'oscillation du glucose dans l'intestin grêle et le sang provoquant un effet hypocholestérolémiant et améliorant l'équilibre de la microflore intestinale (**Frid et al. ,2017; Khan et al.,2018**). Ils modèrent la glycémie et réponse de l'insuline. En raison de sa viscosité, l'absorption du glucose et des stérols retarde la contribution à une atténuation des taux plasmatiques de glucose et d'insuline postprandiaux (**Butt et al.,2008**).

- **Les composants antioxydants :** L'avoine contient également une gamme variée de composés phénoliques, y compris ceux liés à un ester conjugués de glycérol, conjugués d'alkyle à liaison ester, glycérides à liaison éther et ester, acides anthraniliques et avenanthramides (AVA) (**Gramza-Michalowska et al., 2018**).

La fraction de son contient également des polyphénols, dont les avenanthramides sont particulièrement bien connus pour leur activité antioxydante et leurs effets retardateurs sur l'artériosclérose et l'inflammation. D'autre part, les antioxydants de l'avoine peuvent également contribuer à la stabilité et au goût des produits alimentaires (**Peterson ,2001**).

L'avoine est une source importante de composants antioxydants tels que les tocots, les acides phénoliques et avenanthramides (**Chen et al., 2008**). Les tocophérols, les tocotriénols et la vitamine E sont les principaux tocots présents dans l'avoine et leur concentration dépend de l'emplacement et du génotype (**Peterson et Qureshi ,1993**).

II. Les Avenanthramides

II .1. Définition :

Les avenanthramides sont un groupe d'alcaloïdes phénoliques trouvés principalement dans l'avoine (*Avena sativa*), mais également présents dans les œufs de papillon du chou blanc (*Pieris brassicae* et *P. rapae*) (**Blaakmeer et al.,1994**) et dans l'œillet infecté par des champignons (*Dianthus caryophyllus*). Un certain nombre d'études démontrent que ces produits naturels ont des activités anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-démangeaisons, anti-irritantes et antiathérogènes (**Koenig et al. ,2011**). Les extraits de noyau d'avoine avec des niveaux standardisés d'avenanthramides sont utilisés pour les produits de soin de la peau, des cheveux, des bébés et du soleil. Le nom «avenanthramides» a été inventé par Collins lorsqu'il a signalé la présence de ces composés dans les grains d'avoine (**Collins et**

Mullin,1988) .On a découvert plus tard que trois avenanthramides étaient les amides à anneau ouvert des avénaluminés I, II et III, qui étaient auparavant signalées comme des phytoalexines d'avoine par Mayama et ses collègues (**Mayama S et al.,1981**).

Depuis lors, de nombreux congénères ont été caractérisés et purifiés et il est connu que les Avenanthramides ont des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-athérosclérotiques et peuvent être utilisés comme traitement pour les personnes souffrant de maladies inflammatoires, allergiques ou cardiovasculaires. En 1999, des études réalisées par l'Université Tufts ont montré que les avenanthramides sont biodisponibles et restent bioactifs chez l'homme après consommation. Des études plus récentes réalisées par l'Université du Minnesota ont montré que les activités antioxydantes et anti-inflammatoires peuvent être augmentées par la consommation de 0,4 à 9,2 mg / jour d'avenanthramides pendant huit semaines (**Chatel et al.,2013**).La Nomenclature Internationale des Ingrédients Cosmétiques (INCI) désignait à l'origine un extrait d'avoine avec un niveau normalisé d'Avenanthramides comme «extrait de noyau d'*Avena sativa*», mais récemment, ils ont également accepté le nom INCI «**Avenanthramides**» pour décrire un extrait contenant 80% de ces alcaloïdes phénoliques d'avoine (**Chatel et al.,2013 ;Flower.J. ,2007**).

II.2 . Les effets protecteurs ;Utilisations médicales et de soins personnels

- **Activité anti-inflammatoire et anti-démangeaisons**

Les études réalisées par Sur (2008) fournissent des preuves que les avenanthramides réduisent considérablement la réponse inflammatoire est une réaction complexe et d'autoprotection qui se produit dans le corps contre les substances étrangères, les dommages cellulaires, les infections et les agents pathogènes. Les réponses inflammatoires sont contrôlées par un groupe appelé cytokines qui est produit par les cellules inflammatoires (**Kim et al,2012**) . De plus, l'expression des cytokines est régulée par l'inhibition du facteur de transcription nucléaire Kappa B (NF-κB) (**Chu et al, 2013**).De nombreuses études ont démontré que les Avenanthramides peuvent réduire la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 et le MCP-1 en inhibant l'activation de NF-κB qui est responsable de l'activation des gènes de la réponse inflammatoire. Ainsi, ces polyphénols d'avoine interviennent dans la diminution de l'inflammation en inhibant la libération de cytokines (**Sur et al ,2008**). De plus, il a été constaté que les avenanthramides inhibent l'inflammation neurogène, qui est définie comme une inflammation déclenchée par le système

nerveux qui provoque une vasodilatation, un œdème, une chaleur et une hypersensibilité (Meggs W J,1993).En outre, les avenanthramides réduisent considérablement la réponse aux démangeaisons et son efficacité est comparable à l'effet anti-démangeaison produit par l'hydrocortisone (Sur et al,2008).

- **Réduction des rougeurs**

Les Avenanthramides ont une activité antihistaminique efficace; il réduit considérablement les démangeaisons et les rougeurs par rapport aux zones non traitées (Marmouzi,2018) .

- **Activité antioxydante**

Les Avenanthramides sont connus pour avoir une activité antioxydante puissante, agissant principalement en donnant un atome d'hydrogène à un radical. Un antioxydant est «toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celles d'un substrat oxydable, retarde ou empêche de manière significative l'oxydation de ce substrat» (Halliwell, 1990). Ces composés phytochimiques sont capables de lutter contre le stress oxydatif présent dans l'organisme, responsable du cancer et des maladies cardiovasculaires. (Adom et Liu ,2002) Parmi les avenanthramides, il existe différentes capacités antioxydantes, où C a la plus grande capacité, suivi de B et A)(Chu .Y,2014) , les AVA ont été caractérisés comme antioxydants à la fois *in vitro* (Bratt et al., 2003;Dimberg et al., 1993; Fagerlund et al., 2009; Peterson et al., 2002) et *in vivo* (Chen et al., 2007), alors que dans un contexte alimentaire, les AVA ont été liée au goût frais de l'avoine (Molteberg et al., 1996).

- **Complément alimentaire**

Les avenanthramides extraits de l'avoine présentent de puissantes propriétés antioxydantes *in vitro* et *in vivo*, et selon les études de Dimberg (1992), son activité antioxydante est plusieurs fois supérieure à celle d'autres antioxydants tels que l'acide caféique et la vanilline. (Dimberg et al.,1992) Aven-C est l'un des avenanthramides les plus importants présents dans l'avoine, et il est responsable de l'activité antioxydante de l'avoine. Les effets de l'extrait d'avoine enrichi en Avenanthramide ont été étudiés chez l'animal, et un régime alimentaire de 20 mg d'Avenanthramide par kilogramme de poids corporel chez le rat s'est avéré augmenter l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) dans les muscles squelettiques, le foie et les reins En outre, un régime à base d'Avenanthramides améliore l'activité de la glutathion peroxydase dans les muscles cardiaques et squelettiques, protégeant l'organisme des dommages oxydatifs.

II.3.Nomenclature

Les Avenanthramides consistent en un conjugué de l'un des trois phénylpropanoïdes (acide p-coumarique, férulique ou caféique) et d'acide anthranilique (ou d'un dérivé hydroxylé et / ou méthoxylé de l'acide anthranilique) Collins et Dimberg ont utilisé un système de nomenclature différent pour décrire les Avenanthramides dans leurs publications. Collins a attribué un système qui classe les avenanthramides à l'aide de descripteurs alphabétiques, tandis que Dimberg a attribué des lettres majuscules au dérivé d'anthranilate et des minuscules au phénylpropanoïde qui l'accompagne, comme «c» pour l'acide caféique, «f» pour l'acide férulique ou «p» pour acide anthranilique acide p-coumarique. Plus tard, le système de Dimberg a été modifié pour utiliser un descripteur numérique de l'acide anthranilique (**Chu Y,2014**).Les avenanthramides suivants sont les plus abondants dans l'avoine: Avenanthramide A (également appelé 2p, AF-1 ou Bp), avenanthramide B (également appelé 2f, AF-2 ou Bf), avenanthramide C (également appelé 2c, AF-6 ou Bc), avenanthramide O (également appelé 2pd),avenanthramide P (également appelé 2fd) et avenanthramide Q (également appelé 2cd)(tableau 02).

II.4.Structures des avenanthramides

Tous les AVA ont le même squelette chimique de base, mais ils diffèrent par le nombre et position des groupes hydroxyle et méthoxy dans les deux systèmes cycliques aromatiques (fig06) .

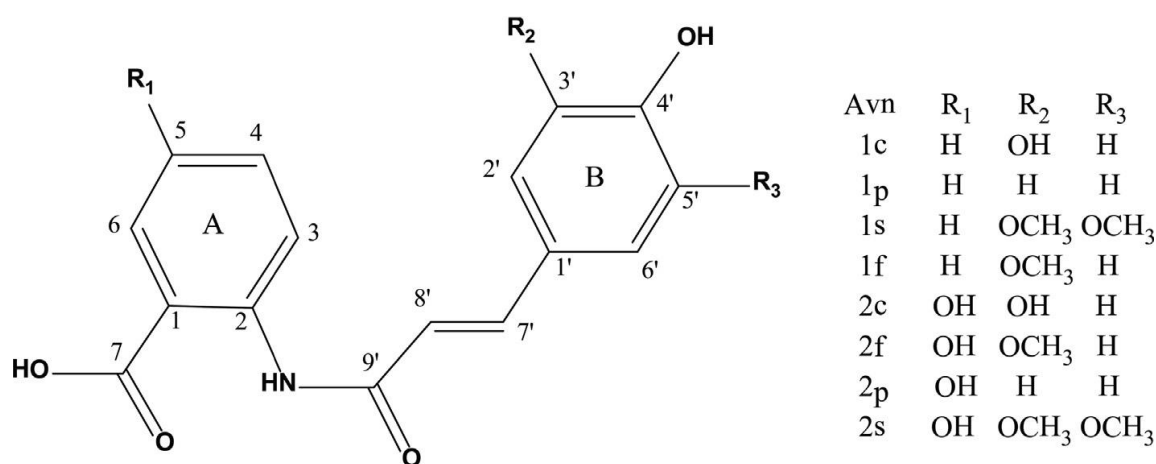


Fig06 :Structure Chmique Des Avenanthramides

Tableau02 :Nomenclature des AVAs selon Collins et Dimberg

COLLINS	DIMBERG ORIGINAL	Dimberg modifié	n	R ¹	R ²	R ³
A	Bp	2p	1	H	H	OH
B	Bf	2f	1	OCH ₃	H	OH
C	Bc	2c	1	OH	H	OH
O		2pd	2	H	H	OH
P		2fd	2	OCH ₃	H	OH

II.5. Concentration des avenanthramides

Les concentrations totales de 2p, 2f et 2c rapportées dans la littérature se situent entre 2 et 300 mg kg⁻¹. Dans le gruau, la plupart des AVAs sont concentrés dans la fraction de son, mais leur localisation tissulaire précise n'est pas connue. De nombreux composés phénoliques sont généralement présents sous forme conjuguée, souvent sous forme de glycosides. Cependant, rien n'indique actuellement que les AVA sont présents sous forme de composés liés. La teneur augmente pendant la germination (**Bryngelsson et al., 2002b; Skoglund et al., 2008**)

II.6. Biosynthèse

Il existe des preuves que la quantité d'avenanthramides trouvée dans les grains est liée au génotype, à l'environnement, à la campagne et à l'emplacement de la récolte, et aux tissus (**Matsukawa et al., 2000**). Les facteurs environnementaux ne sont pas clairement connus, mais on pense que des niveaux inférieurs d'avenanthramides sont produits dans l'avoine quand ils sont cultivés dans un environnement sec, ce qui défavorise la rouille couronnée, une sorte de champignon qui stimule la production d'avenanthramides dans les grains d'avoine. .

II.7. Stabilité chimique

- pH

Les Avenanthramides ne sont pas tous sensibles au pH et à la température. Cela a été bien illustré dans une étude menée sur les avenanthramides A, B et C (**Chu Y, 2014**). Dans cette étude, il a été trouvé que la concentration d'Avenanthramide A (2p) était essentiellement

inchangée dans le tampon phosphate de sodium après trois heures à température ambiante ou à 95°C. Les Avenanthramides B (2f) semblent être plus sensibles à la température plus élevée à pH 7 et 12. Les Avenanthramides C (2c) ont subi une réorganisation chimique à pH 12 aux deux températures et ont diminué de plus de 85% à 95 ° C, même à pH 7 (**Dimberg et al., 2001**).

- UV

Les Avenanthramides sont également affectés par la lumière ultraviolette (UV). Dimberg a découvert que les trois avenanthramides testés (A, B et C) restaient dans la conformation trans après 18 heures d'exposition à la lumière UV à 254 nm. D'autre part, Collins a signalé que les avenanthramides s'isomérisent lors d'une exposition à la lumière du jour ou aux rayons UV. (**Chu .Y,2014**).

II.8.Avenanthramides synthétiques

Les Avenanthramides peuvent être synthétisés artificiellement. Les Avenanthramides A, B, D et E ont été synthétisés par Collins (1989), en utilisant des méthodes de chromatographie et en adaptant la procédure de Bain et Smalley (1968) (**Bain D et Smalley K,1968**). Les quatre substances synthétiques étaient identiques à celles extraites de l'avoine (**F.W.Collins,1989**) et peuvent contribuer aux effets de promotion de la santé.

Partie II

Etude et analyse d'article scientifique

« Food Chemistry 277 (2019) 682–690 »

1. Matériel végétal

Cette étude a porté sur l'espèce *Avena sativa* L. Les grains d'avoine ont été achetés chez Vreeken's Zaden (Dordrecht, Pays-Bas), ils étaient par la suite nettoyés et triés avant de passer à la germination.

2. Préparation de l'échantillon

2.1. Germination des grains d'avoine

La germination est l'ensemble des phénomènes par lesquels la plantule commence une vie active et se développe grâce aux réserves contenues en son albumen, en d'autre terme c'est le passage de l'état de vie ralentie à l'état de vie active (**Lafon et al.,1998**).

La méthode de germination utilisée dans cette étude est celle de (**xie et al.,2017**) avec une légère modification. Les grains d'avoine ont été d'abord stérilisés en surface par lavage avec de l'éthanol à 70 % (v/v), puis un rinçage avec de l'eau pure. Les grains sont par la suite immergés dans une solution d'hypochlorite à 1,4% (p / v) pendant 20 min, et enfin rincés quatre fois avec de l'eau pure. Les grains sont mis à la germination dans l'obscurité dans un germoir à deux réservoirs à l'échelle pilote (Custom Laboratory Products, Keith, Royaume-Uni). La procédure de nettoyage, les plateaux et la configuration du germinateur étaient les mêmes que ceux décrits par (**De Bruijn et al., 2016**). Environ 150 g de grains d'avoine stérilisés ont été placés dans l'un des cinq compartiments des plateaux germinateurs recouverts de papier filtre cellulosique (Whatman 595 ½, plié 320 mm). Le programme du germoir est réglé comme suit ; trempage pendant 20 h à 20 °C (aération 1 min toutes les 10 min), suivie d'une germination pendant 72 h à 25 °C (humidité relative HR ≥ 99%). Après les premières 72 heures de germination, les plants d'avoine ont été incubés encore pendant 96 h à 30 °C (HR ; 70–80%). A la fin de l'expérience, les plantes ont été congelées et conservées à -20 °C jusqu'au traitement ultérieur.

2.2. Lyophilisation

Comme la teneur en eau des feuilles est très élevée et varie considérablement d'un échantillon à l'autre, une lyophilisation des échantillons avant l'extraction est toujours recommandée (**Dimberg et al, 2009**). Les plantules d'avoine congelées ont été directement lyophilisées, les lyophilisats sont par la suite conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

2.3. Broyage.

Généralement, les échantillons doivent être broyés pour augmenter l'efficacité du processus d'extraction. Une chaleur au moment de la procédure peut être développée et dégagée, mais comme les AVA sont relativement stables à la chaleur, les pertes possibles dues au broyage sont probablement minimales (**Dimberg et al., 2009**).

Les échantillons secs ont été placés dans des bocaux de broyage de 50 ml (remplis d'environ $\frac{1}{3}$ de leur volume par l'échantillon) avec six billes en acier inoxydable (diamètre 12 mm) et broyés pendant 180 s à une fréquence de 30 s^{-1} à l'aide d'un moulin à billes.

L'échantillon en poudre résultant a été mélangé avec du sable de quartz sans graisse (0,3–0,9 mm, Büchi) et extrait à l'aide d'un Extracteur de vitesse. Les conditions de fonctionnement étaient de 100 bars et 40°C .

2.4. Délipidation

Les échantillons (environ 400 mg) ont été d'abord dégraissés par deux cycles d'extraction consécutifs (10 min chacun) avec du n-hexane. 2 ml d'hexane ont été ajoutés à $20,0 \pm 0,1$ mg d'échantillons d'avoine moulue pour la délipidation. Les solutions ont été vortexées pendant 30 secondes puis séchées sous vide par l'évaporateur rotatif.

3. Extraction des avénanthramides

L'extraction se fait avec la méthode de (**Oraby et al., 2017**) avec une légère modification.

un gramme de l'échantillon (grains d'avoine ou grains germés) est pesé dans un tube à bouchon à vis de 30 ml (échantillons en double), puis 20 ml d'éthanol aqueux à 80% (v / v) acidifié par l'acide acétique (pH 2) est ajouté dans le tube. Ce dernier est incubé dans un bain-marie à 50°C pendant 20 min, en remuant de temps en temps puis centrifugé à $2\,500 \text{ tr / min}$ pendant 10 min. Le surnageant est décanté dans un ballon évaporateur de 250 ml, la procédure de centrifugation et d'évaporation est répétée deux fois, puis les surnageants récupérés à deux reprises sont mélangés et évaporés sous vide dans un évaporateur rotatif à 50°C . Le résidu est par la suite récupéré par 2 mL de méthanol et transféré dans un tube Eppendorf. Une sonication de 20 min a été réalisée. L'échantillon est dilué dans de l'eau ultra pure dans un tube Eppendorf et centrifugé à $16\,000 \text{ tr / min}$ pendant 10 min. Enfin,

avant de passer à l'étape de séparation par UHPLC, l'extrait contenant les avénanthramides a été filtré

4. Séparation des avénanthramides par Chromatographie liquide à ultra_haute performance analytique en phase inverse (RP-UHPLC-PDA)

L'UHPLC fournit une meilleure résolution que la HPLC traditionnelle en raison de la longueur de colonne plus courte et des particules inférieures à 2 microns dans les colonnes, et les systèmes UHPLC ont des pompes spécialisées qui peuvent faire face aux pressions plus élevées (1000Bars). L'UHPLC offre un débit plus élevé et des temps d'exécution plus rapides que la HPLC traditionnelle. La LC est généralement combinée à la spectrométrie de masse, et les faibles débits et l'absence de division du flux de l'UHPLC permettent une ionisation accrue de la source pour de meilleurs résultats (**Gita Chawla et Chanda Ranjan,2016**).

Les échantillons ont été séparés sur un Thermo Système Accela UHPLC équipé d'une pompe, un dégazeur, un échantillonneur automatique et un détecteur à barrette de photodiodes (PDA). Le débit était de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ à une température de colonne de 45 ° C. Les éluants utilisés étaient l'eau (A) et le méthanol (B), tous les deux à 0,1% (v / v) dans l'acide formique. La colonne utilisée était une Acquity UPLC BEH C18 (150 mm \times 2,1 mm d.i., 1,7 μm). La détection des longueurs d'onde par l'UV – Vis a été définie dans la plage de 200 à 600 nm et les données ont été enregistrées à 20 Hz.

En raison de l'indisponibilité des normes, toutes les quantifications étaient basées sur une courbe d'étalonnage de l'avenanthramide 2c (1,2 à 158,6 μM , $R_2 = 0,9996$). Le contenu en avenanthramides est exprimé en équivalents molaires car les équivalents molaires de 2c devraient donner une approximation raisonnable, surtout que les coefficients d'extinction molaire de divers avenanthramides rapportés dans la littérature sont similaires (par exemple 2p, 28.184M⁻¹ cm⁻¹ à 339 nm; 1p, 29.512 M⁻¹ cm⁻¹ à 329 nm) (**Collins, 1989**). Les moyennes et écarts types sont calculés sur la base de deux expériences de germination indépendantes .

5. Détection des avénanthramides par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure

chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Le spectromètre de masse, initialement conçu par le Britannique Joseph John Thomson, comporte une **source d'ionisation** suivie d'un ou plusieurs **analyseurs** qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z , d'un **détecteur** qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un **système informatique** pour traiter le signal. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z , où m représente la masse et z la valence (ou m/q , q représentant la charge) des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe de ordonnées.

Pour obtenir une sélectivité et une sensibilité plus élevées, les AVA peuvent être séparés en un système UHPLC couplé à un spectromètre de masse, utilisant l'ionisation par électrospray (**Okazaki et al., 2004b; Jastrebova et al., 2006**). Les modes d'ions positifs et négatifs peuvent être utilisés, car les AVA sont capables de former des ions protonés $[M + H]^+$ et déprotonés $[M-H]^-$ en raison de groupes dans leur structure chimique. Les Tampons volatils tels que l'acide acétique ou l'acide formique doivent être utilisés pour la préparation de la phase mobile (**Dimberg et al., 2009**).

Dans cette étude, deux types de spectrométrie sont utilisés ; spectrométrie de masse à piège ionique à ionisation par électrospray (ESI-IT-MS) et spectrométrie de masse hybride quadripolaire-orbitrap à ionisation électrospray (ESI-FTMS).

I. Ionisation et fragmentation des avenanthramides

I.1. Etude systématique des avenanthramides 2p, 2c et 2f

I.1.1 Détection des fragments :

L'ionisation et la fragmentation des avenanthramides (AVA) ont été étudiées avec les normes authentiques de 2p, 2c et 2f. Les spectres MS typiques et les spectres CID MS² obtenus sont représentés sur la figure 07, avec l'avenanthramide 2f comme exemple. La plupart des avenanthramides ont été détectés avec plusieurs adduits dans les deux modes d'ionisation négative et positive.

- **Dans le mode d'ionisation négative (NI)** un pic était généralement détecté qui est supérieur au $[MAv - H]^-$, un adduit $[MAv + FA + Na-2H]^-$ correspondant à un acide formique (FA) et une **dimérisation** a été observée avec $[2MAv - H]^-$ et $[2MAv + Na-2H]^-$ (figure 07 A).

La fragmentation en mode NI a fourni plus d'informations structurales par la détection de la sous-unité d'acide anthranilique (AA) sous forme d'un fragment d'isocyanatobenzoate $[MAA - H + CO - H_2]^-$ et l'acide phénylalcénoïque (PA) sous forme d'un fragment d'oxo-indénolate $[MPA - H - H_2O]^-$, ce dernier est généralement à faible intensité (Wise,2011). La perte du groupement acide carboxylique sous forme de CO₂ $[MAv - H - CO_2]^-$ a également été observée, souvent à haute intensité (Fig 07 B).

- **En mode d'ionisation positive (PI)** : Un pic était généralement détecté plus haut que le $[MAv + H]^+$, correspondant à un adduit sodé $[MAv + Na]^+$ et une **dimérisation** a été observée avec $[2MAv + H]^+$ et $[2MAv + Na]^+$.

La fragmentation en mode PI a permis la détection de la sous-unité de l'acide phénylalcénoïque (PA) sous forme de fragment d'ion acylium $[MPA + H - H_2O]^+$, qui était toujours le principal et généralement le seul fragment (Fig07, C et D).

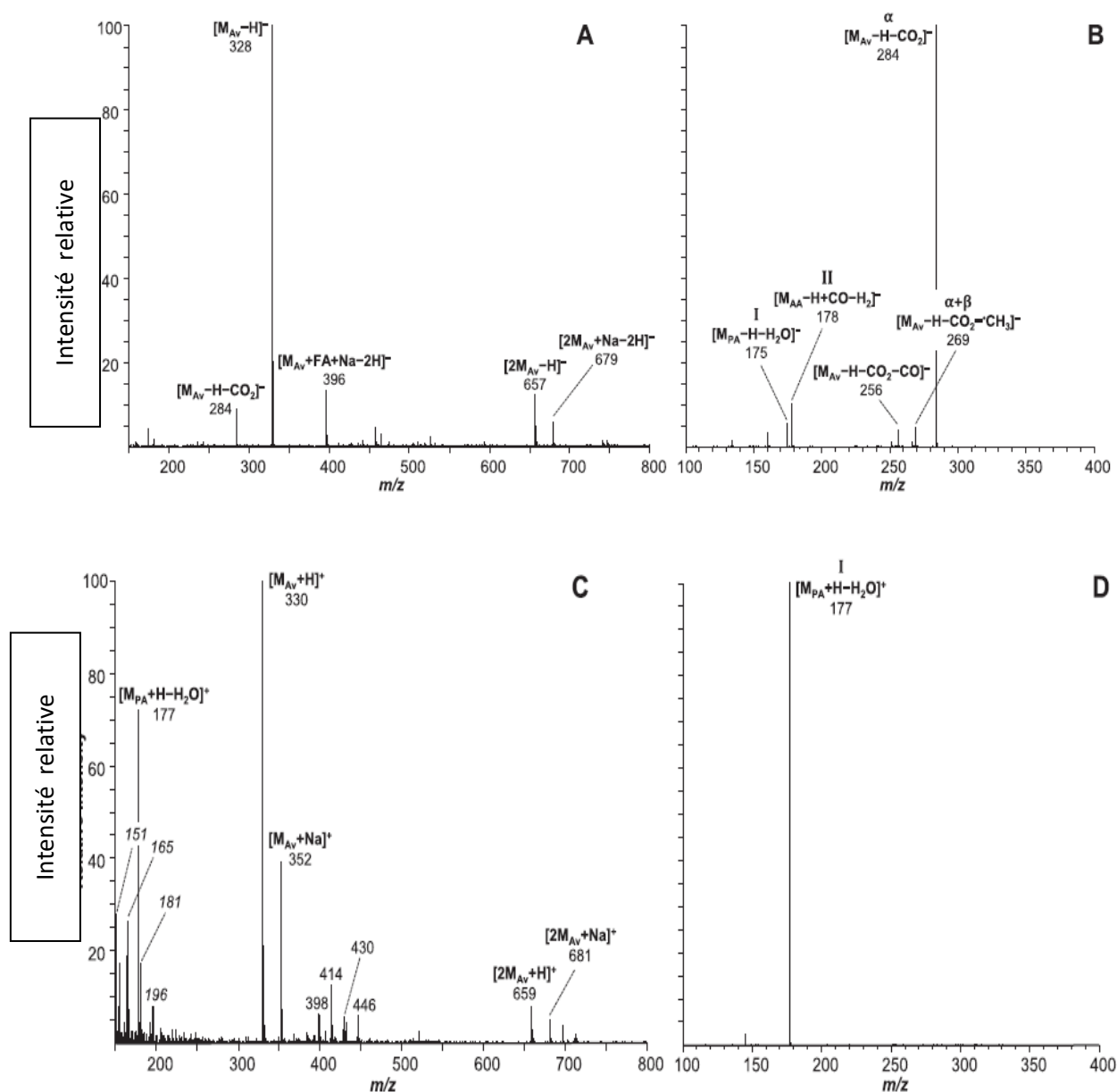


Fig07 : Spectres ESI-IT-MS typiques des avenanthramides en mode négatif complet MS (A) et MS2 (B), et mode positif complet MS (C) et MS2 (D), démontré avec un standard de l'avenanthramide 2f. Les étiquettes de pic montrent la voie de fragmentation correspondante, l'adduit (fragment) et m / z. Les pics marqués avec m / z en italique sont connus pics de fond de l'analyse LC-MS. FA, acide formique; Av, avenanthramide; PA, acide phénylalcénoïque; AA, acide anthranilique.

Xie et ses collègues ont signalé une plus grande variété de fragments en mode d'ionisation positive, cependant, ils ont utilisé un spectromètre de masse triplequadrupôle avec des paramètres différents (Xie et al., 2017). La formule moléculaire des fragments en mode PI, MS² a été confirmée par spectrométrie de masse haute résolution avec fragmentation HCD (Fig 08).

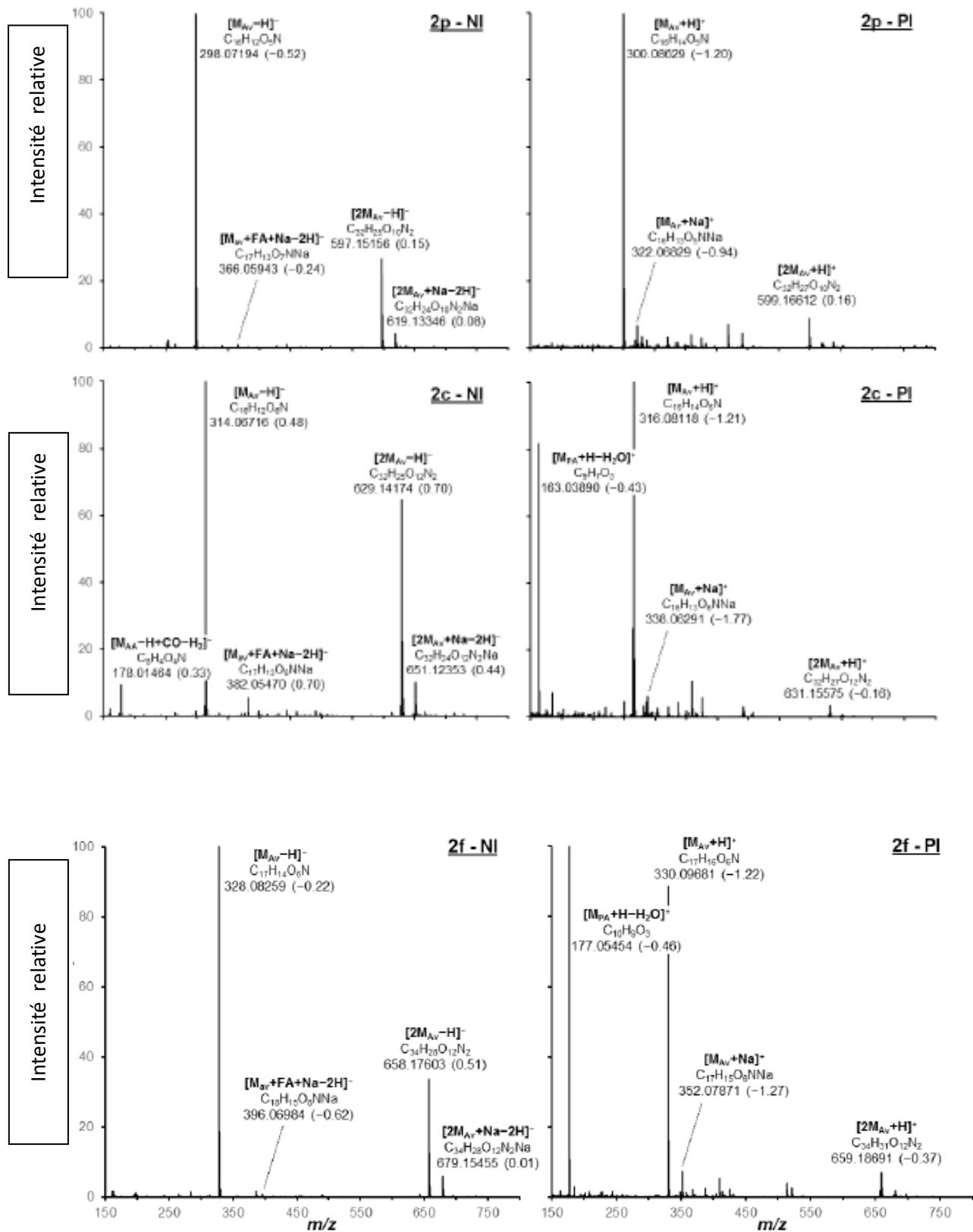


Fig08: Spectres de fragmentation HCD haute résolution (NCE = 35) des étalons d'avenanthramide 2p, 2c et 2f en mode d'ionisation négative obtenus par perfusion directe dans FTMS. Les marqueurs de pic montrent la voie de fragmentation correspondante, l'adduit de fragment avec sa formule moléculaire et son m/z mesuré avec l'erreur (en ppm) entre parenthèses. Av, avenanthramide; AA, acide anthranilique; PA, acide phénylalcénoïque; NCE, énergie de collision normalisé

I.1.2. Identification des fragments

Pour mieux détecter et analyser plusieurs autres fragments, la spectrométrie de masse à haute résolution ESI-FTMS HCD a été utilisée et qui donne une très grande variété de spectres selon les données rapportées par (Wise,2011) .

I.1.3. Avenanthramides à longue chaîne

Pour obtenir des informations supplémentaires sur la fragmentation des avenanthramides avec des sous-unités PA à longue chaîne (dérivées de l'acide avénaluminique), l'extrait des semis a été criblé pour la présence de la longue chaîne équivalent de 2p, à savoir 2pd ($C_{18}H_{15}NO_5$, [MAv-H] - m / z calc.324.08775). L'annotation du spectre de fragmentation HCD a confirmé que des fragmentations similaires ont été observées comme pour les avenanthramides à chaîne courte, avec l'ajout de plusieurs fragments liés à la chaîne la plus longue (fig09).

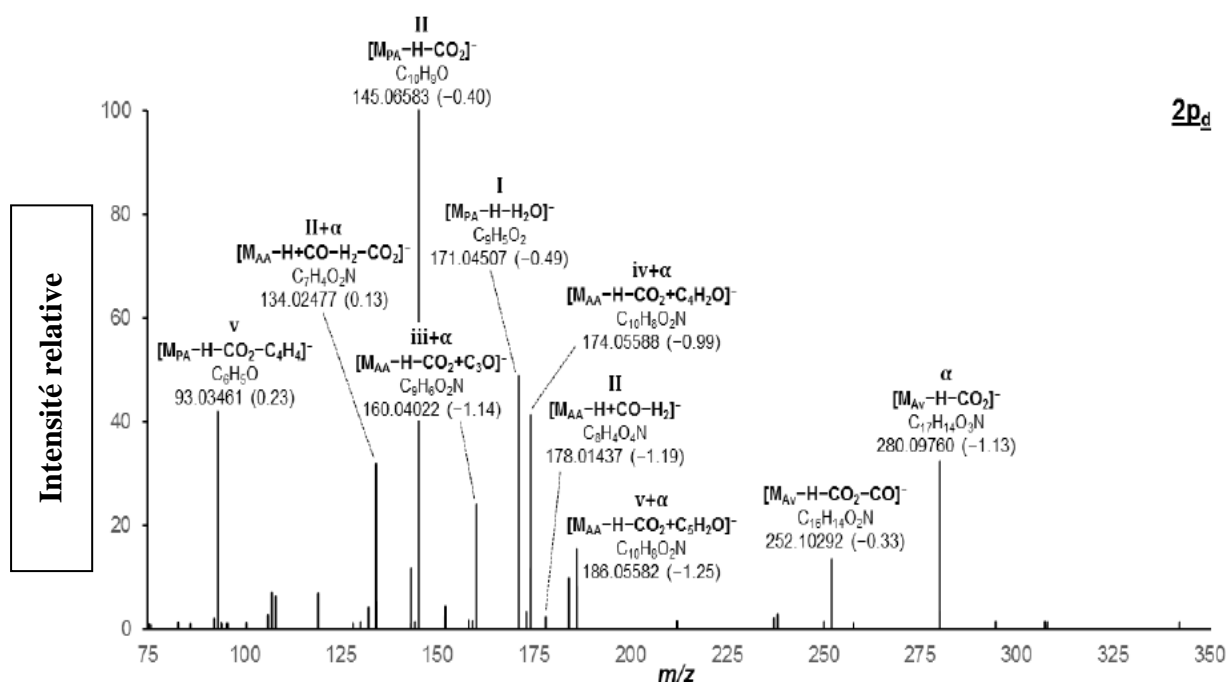


fig09 : Spectre de fragmentation HCD haute résolution (NCE = 25) de m/z 324,08776 en mode négatif, qui a été provisoirement annoté comme avenanthramide 2pd. Les étiquettes de pic montrent la voie de fragmentation correspondante. L'adduit de fragment avec sa formule moléculaire et son m/z mesuré avec l'erreur (en ppm) entre parenthèses. Ce spectre a été enregistré à une résolution de 35 000 au cours d'une analyse chromatographique de l'extrait d'avoine. Av, avenanthramide; AA, acide anthranilique; PA, acide phénylalcénoïque.

I.1.4. Glycosides d'avenanthramide

Les glycosides de plusieurs avenanthramides ont été détectés qui, en raison de leur polarité plus élevée, sont toujours élués avant l'aglycone. Les glycosides ont été caractérisés dans le mode d'ionisation négative par un fragment général correspondant à une perte neutre d'anhydrohexose résultant en un fragment correspondant au m/z du aglycone $[MAv-H]^-$, ces glycosides sont représentés par **G** dans le chromatogramme qui varie de G_1 à G_{13} et qui sont identifiés par spectrométrie à haute résolution ESI-FTMS et présentés dans le tableau 03.

Dans PI, le fragment d'ion acylium résultant du PA $[MPA + H - H_2O]^+$ était presque toujours le fragment principal. Combiné avec les spectres **NI MS**³, cela a permis l'attribution du PA et de AA aux sous-unités de l'aglycone

Tableau03: Spectrométrie de masse haute résolution FTMS, mode d'ionisation négative et positive ESI-IT-MSn. Données spectrométriques et spectroscopiques UV-Vis des pics de glycoside avenanthramide provisoirement annotés.

Peak no.	Rt (min)	Av-glycoside ^c	Molecular formula	FTMS negative mode			ESI-IT-MS ^a negative mode				ESI-IT-MS ^a positive mode		
				m/z calc.	m/z meas.	Error (ppm)	Fragments (rel. int.) ^a			Fragments (rel. int.) ^b			
							γ	II(+ γ)	$\alpha+\gamma$	Other fragments	[M _w +H] ^a	I(+ γ)	Other fragments
G1	4.29	5f - hex	C ₂₃ H ₂₅ NO ₁₂	506.13040	506.13041	0.02	<u>344</u>	194 (40)	300 (15)	150 (5), 356 (21)	508	<u>177</u>	346 (56), 314 (16), 152 (15)
G2	4.37	2c - hex	C ₂₁ H ₂₃ NO ₁₁	476.11983	476.11993	0.19	314 (74)	178 (94)	n.d.	161 (7), 296 (6), 135 (10), 297 (47), <u>323</u>	478	<u>163</u>	325 (40)
G3	4.60	5cd - hex	C ₂₄ H ₂₅ NO ₁₂	518.13040	518.13031	-0.17	<u>356</u>	194 (7)	312 (25)	176 (11), 220 (13)	520	<u>189</u>	351 (19), 358 (16)
G4	5.54	5fd - hex	C ₂₅ H ₂₇ NO ₁₂	532.14605	532.14647	0.79	370 (17)	n.d.	326	514 (18), 352 (9)	534	<u>203</u>	365 (17)
G5	6.00	3f - hex	C ₂₄ H ₂₇ NO ₁₂	520.14605	520.14618	0.25	358 (81)	<u>208</u>	314 (28)	299 (8), 149 (5), 164 (5), 175 (9)	522	<u>177</u>	166 (69), 328 (35), 339 (29), 321 (13)
G6	6.30	5cd - hex	C ₂₄ H ₂₅ NO ₁₂	518.13040	518.13075	0.67	<u>356</u>	194 (20)	312 (85)	338 (18), 472 (11), 176 (33), 220 (39), 474 (8)	520	<u>189</u>	351 (48), 271 (24), 358 (20)
G7	6.95	3f - hex	C ₂₄ H ₂₇ NO ₁₂	520.14605	520.14617	0.23	358 (26)	208 (18)	314 (12)	<u>370</u> , 175 (5)	522	<u>504</u>	486 (18), 177 (17)
G8	7.03	3cd - hex	C ₂₅ H ₂₇ NO ₁₂	532.14605	532.14625	0.37	370 (2)	n.d.	n.d.	<u>352</u>	534	n.d.	
G9	7.15	5pd - hex	C ₂₄ H ₂₅ NO ₁₁	502.13548	502.13599	1.01	<u>340</u>	194 (12)	296 (34)		504	<u>173</u>	342 (27)
G10	8.05	5fd - hex	C ₂₅ H ₂₇ NO ₁₂	532.14605	532.14627	0.41	<u>370</u>	194 (7)	326 (30)		534	<u>203</u>	
G11	8.33	2cd - hex	C ₂₄ H ₂₅ NO ₁₁	502.13548	502.13598	0.99	<u>340</u>	178 (11)	n.d.	322 (27), 323 (12)	504	<u>189</u>	351 (71), 342 (16)
G12	8.97	5pd - hex isomer	C ₂₄ H ₂₅ NO ₁₁	502.13548	502.13602	1.07	340 (90)	194 (10)	<u>296</u>	356 (61), 456 (47), 458 (17)	504	n.d.	
G13	9.95	5fd - hex isomer	C ₂₅ H ₂₇ NO ₁₂	532.14605	532.14622	0.31	370 (82)	194 (9)	<u>326</u>	356 (40), 330 (6), 488 (12)	534	<u>203</u>	516 (22)
G14	12.23	5fd - hex isomer	C ₂₅ H ₂₇ NO ₁₂	532.14605	532.14615	0.19	<u>370</u>	194 (4)	326 (19)		534	<u>203</u>	372 (11)
G15	12.73	5fd - hex isomer	C ₂₅ H ₂₇ NO ₁₂	532.14605	n.d.		<u>370</u>	194 (5)	326 (23)		534	n.d.	

hex, hexose; n.d., non détecté

^a Des fragments de γ (perte neutre 162 u correspondant à l'anhydrohexose) [MAv - H] -, II (+ γ) [MAA - H + CO - H2] -, et $\alpha + \gamma$ [MAv - H - CO2] - sont représentés si l'intensité relative était ≥ 1 et d'autres fragments si l'intensité relative ≥ 5 . Le fragment le plus intense est souligné.

^b Les fragments de I (+ γ) [MPA + H - H2O] + sont représentés si l'intensité relative était ≥ 1 et celle des autres fragments si l'intensité relative ≥ 15 . Le fragment le plus intense est souligné.

^cL'annotation de l'aglycone a été confirmée par une combinaison de NI et de PI MS2 et, si possible, de NI MS3.

Dans ce travail, seulement les avenanthramides-hexosides ont été détectés, néanmoins, l'apparition possible d'autres types de glycosides ne peuvent être exclus. Basé sur les travaux de Wu et ses collaborateurs, la majorité des glycosides sont des O-glucosides attachés à l'anneau aromatique de la sous-unité de l'acide phénylalcénoïque (PA) (Wu et al., 2018). La comparaison des données spectrales des glycosides obtenues avec celles obtenues par Wu et ses collaborateurs qui ont confirmé leur structure par spectroscopie RMN, laisse penser que le

pic G2 est la 2c-3'-O-glc (c'est-à-dire qu'il est attaché sur la position méta du cycle acide caféique) (Wu et al.,2018).

I.2. Voies générales de fragmentation des avenanthramides

La voie I donne presque exclusivement $[MPA - H - H_2O]^-$ (NI) ou $[MPA + H - H_2O]^+$ (PI) avec m/z correspondant à l'anhydro-pennsylvanie. Le fragment AA correspondant à $[MAA - H]^-$ est rarement observé, indiquant que la charge est préférentiellement située sur le PA pour ce clivage. La voie II donne le fragment isocyanatobenzoate $[MAA - H + CO - H_2]^-$ et le fragment PA $[MPA - H - CO_2]^-$ avec m/z correspondant au décarboxy-PA.

Les voies de fragmentation mineures liées à la chaîne énamide sont indiquées par des chiffres romains minuscules (iii à v) (Fig 10), où iv et v ne sont applicables que dans les dérivées à chaîne longue (Fig 10). Les avenanthramides à longues chaînes peuvent être annotés en utilisant le même diagnostic des voies de fragmentation (I et II) comme leurs équivalents à chaîne courte.

Des fragments ont été fréquemment observés. Ces clivages étaient marqués par des lettres grecques : α pour la perte du fragment acide carboxylique de la sous-unité de l'AA sous forme de CO_2 et β pour la perte d'un groupe méthyle sous forme de $-CH_3$. Ce dernier se produisait uniquement si un groupe méthoxy était présent. La perte d'anhydrohexose due à un glycoside avenanthramide est marquée par la lettre grecque γ (fig10).

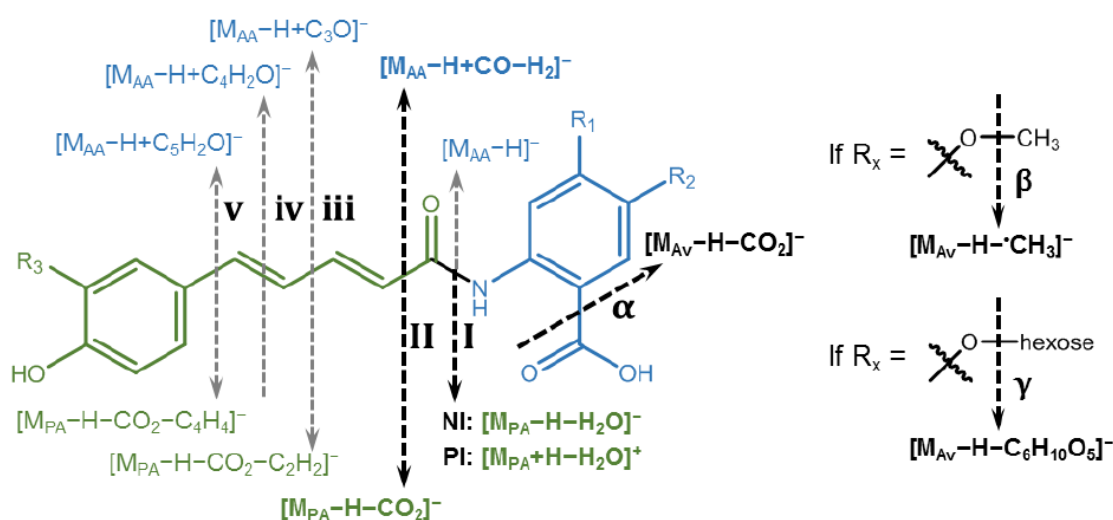


Fig10 : voies de fragmentation des avénanthramides, des combinaisons de I à v avec α , β ou γ sont possibles.

II. Identification des avenanthramides des semis d'avoine :

En utilisant les voies de fragmentation établies (Fig.10), les avenanthramides détectés dans l'extrait de semis d'avoine étaient annotés dans la figure 11 et le tableau 04

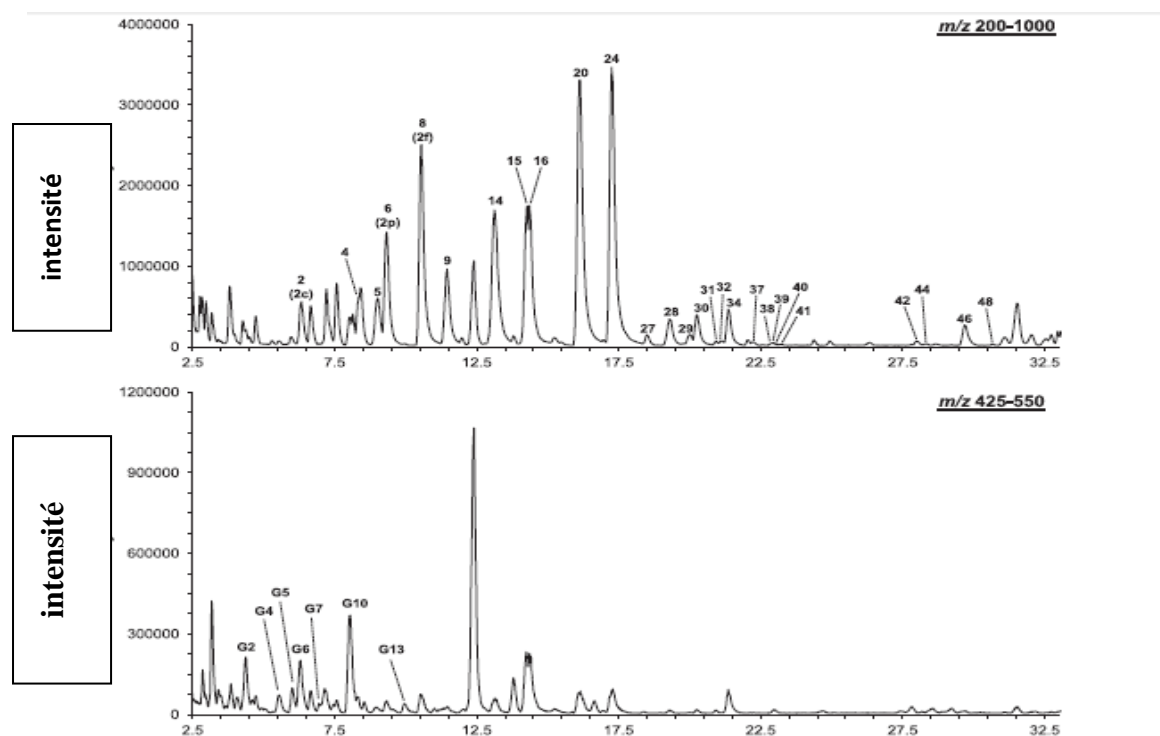


Fig11. Chromatogrammes UHPLC-ESI-IT-MS en mode négatif d'extrait de semis d'avoine dans les plages m/z 200–1000 (en haut) et m/z 425–550 (en bas). Pics marqués d'un nombre indique les aglycones d'avenanthramide et ceux marqués avec «G» plus un nombre indiquent les glycosides d'avenanthramide Tous les pics détectés ne sont pas visibles sur cette figure.

En utilisant cette approche, 28 des 30 (combinaisons de cinq AA avec six PA) des avenanthramides naturels (Wise, 2013) ont été détectés dans l'extrait de semis d'avoine (tableau 04, figure 11). Les avenanthramides avec un 5'-acide hydroxy ou 4-hydroxy anthranilique (c'est-à-dire 2 ou 4, respectivement) ont la même masse et les mêmes fragments En se basant sur les données de l'éluion et sur les normes analytiques utilisées dans ces travaux (Wise, 2011; Wu et al.,2018), il a été supposé que l'isomère 2 était toujours élué avant l'isomère 4.

Une co-éluion partielle avec le pic 37 qui a le même m/z pourrait avoir influencé les fragments détectés. La fragmentation correspondant à β n'était pas attendue pour ce composé.

Tableau 04. Annotations provisoires des pics d'avenanthramide (figure 11) et les données spectrométriques obtenues en utilisant le mode d'ionisation négative ESI-IT-MSn.

Peak no.	Rt (min)	Avenanthramide	[M _{AV} -H] ⁻	Diagnostic fragments (relative intensity) ^a				Small NL Fragments (rel. int.)			Other fragments (rel. int.)		
				I	II	II+α	II	α	β	α+β	iii+α	v+α	Other fragments ^b
				[M _{AV} -H-H ₂ O] ⁻	[M _{AV} -H-CO-H ₂] ⁻	[M _{AV} -H-CO-H ₂ -CO ₂] ⁻	[M _{AV} -H-CO ₂] ⁻	[MAV-H-CO ₂] ⁻	[M _{AV} -H- ¹³ CH ₃] ⁻	[M _{AV} -H-CO ₂ - ¹³ CH ₃] ⁻	[M _{AV} -H-CO ₂ -CO] ⁻	[M _{AV} -H-CO ₂ -C ₂ H ₃ O] ⁻	
1	4.92	5c	330	161 (2)	<u>194</u>	150 (8)	n.d.	286 (72)	n.a.	n.a.	176 (12)	n.a.	220 (10)
2	6.33	2c ^c	314	161 (8)	<u>178</u>	134 (4)	135 (3)	n.d.	n.a.	n.a.	n.d.	n.a.	
3	7.28	5p	314	145 (5)	<u>194</u>	150 (25)	119 (1)	270 (94)	n.a.	n.a.	176 (6)	n.a.	242 (6)
4	8.35	5f	344	175 (3)	194 (64)	150 (20)	149 (1)	<u>300</u>	n.d.	285 (3)	176 (2)	n.a.	168 (4), 164 (4)
5	9.01	5c _d	356	187 (3)	194 (23)	150 (6)	161 (2)	312 (77)	n.a.	n.a.	176 (57)	202 (3)	<u>220</u>
6	9.33	2p ^c	298	145 (15)	178 (39)	134 (4)	119 (1)	<u>254</u>	n.a.	n.a.	160 (14)	n.a.	226 (14), 236 (12)
7	9.52	4c ^d	314	161 (2)	<u>178</u>	134 (5)	135 (1)	270 (10)	n.a.	n.a.	160 (1)	n.a.	
8	10.55	2f ^c	328	175 (6)	178 (10)	134 (2)	n.d.	<u>284</u>	<1	269 (4)	160 (4)	n.a.	256 (4)
9	11.46	2c _d	340	187 (23)	<u>178</u>	134 (12)	161 (21)	296 (1)	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	
10	11.55	5c _d Z isomer	356	187 (4)	194 (33)	150 (7)	161 (2)	<u>312</u>	n.a.	n.a.	176 (46)	202 (3)	220 (67), 338 (9)
11	11.90	5c _d Z isomer	356	187 (4)	194 (17)	150 (6)	161 (2)	<u>312</u>	n.a.	n.a.	176 (21)	202 (1)	220 (21)
12	12.98	3p	328	145 (12)	208 (90)	164 (7)	149 (3)	<u>284</u>	313 (12)	269 (32)	190 (1)	n.a.	268 (24), 176 (19)
13	12.99	4p ^d	298	145 (28)	<u>178</u>	134 (29)	119 (3)	254 (83)	n.a.	n.a.	160 (8)	n.a.	148 (6), 226 (11), 236 (9)
14	13.12	5p _d	340	171 (2)	194 (16)	150 (5)	145 (1)	<u>296</u>	n.a.	n.a.	176 (6)	202 (6)	
15	14.28	5f _d	370	201 (1)	194 (9)	150 (4)	n.d.	<u>326</u>	n.d.	311 (2)	176 (2)	202 (3)	
16	14.35	3f	358	175 (8)	208 (38)	164 (3)	149 (5)	<u>314</u>	343 (15)	299 (39)	190 (1)	n.d.	176 (33), 298 (28)
17	14.35	4f ^d	328	175 (15)	178 (38)	134 (15)	149 (2)	<u>284</u>	313 (2)	269 (8)	160 (7)	n.a.	256 (9), 148 (6)
18	15.23	3c _d	370	187 (6)	<u>208</u>	164 (8)	161 (13)	326 (49)	n.d.	n.d.	190 (1)	n.d.	194 (4), 149 (4)
19	15.47	5p _d Z isomer	340	171 (1)	194 (19)	150 (5)	145 (1)	<u>296</u>	n.a.	n.a.	176 (4)	n.d.	
20	16.14	2p _d	324	171 (9)	178 (14)	134 (2)	145 (3)	<u>280</u>	n.a.	n.a.	160 (5)	186 (17)	174 (14)
21	16.79	5p _d Z isomer	340	171 (1)	194 (16)	150 (5)	145 (1)	<u>296</u>	n.a.	n.a.	176 (4)	202 (1)	
22	16.95	5f _d Z isomer	370	201 (1)	194 (9)	150 (3)	175 (1)	<u>326</u>	n.d.	n.d.	176 (1)	n.d.	208 (6), 187 (4)
23	17.09	1c	298	161 (10)	<u>162</u>	118 (2)	135 (5)	254 (1)	n.a.	n.a.	n.d.	n.a.	284 (8)
24	17.26	2f _d	354	201 (7)	178 (9)	134 (2)	175 (3)	<u>310</u>	n.d.	295 (8)	160 (3)	186 (14)	174 (17)
25	17.46	5f _d Z isomer	370	201 (1)	194 (7)	150 (4)	175 (1)	<u>326</u>	n.d.	n.d.	176 (1)	202 (1)	187 (6), 338 (5)
26	17.57	2p _d / 4p _d isomer	324	171 (43)	<u>178</u>	134 (10)	145 (10)	280 (22)	n.a.	n.a.	160 (1)	186 (4)	
27	18.50	2p _d / 4p _d isomer	324	171 (44)	<u>178</u>	134 (10)	145 (10)	280 (12)	n.a.	n.a.	160 (1)	186 (2)	
28	19.29	4f _d	354	201 (60)	<u>178</u>	134 (14)	175 (16)	310 (18)	n.d.	295 (2)	160 (4)	186 (4)	322 (9), 152 (4)
29	20.00	2p _d Z isomer	324	171 (30)	178 (67)	134 (19)	145 (9)	<u>280</u>	n.a.	n.a.	160 (7)	186 (14)	174 (7), 252 (6)
30	20.26	3p _d	354	171 (8)	208 (31)	164 (2)	145 (4)	<u>310</u>	339 (11)	295 (37)	190 (2)	216 (2)	201 (4), 294 (15)
31	20.92	3f _d Z isomer	384	201 (24)	208 (22)	164 (6)	175 (8)	340 (49)	<u>369</u>	325 (98)	190 (3)	216 (8)	202 (18), 189 (7), 324 (7)
32	21.11	2f _d Z isomer	354	201 (17)	178 (26)	134 (10)	175 (6)	<u>310</u>	339 (3)	295 (9)	160 (4)	186 (12)	174 (8), 308 (7), 285 (6), 282 (5)
33	21.25	2p _d / 4p _d isomer	324	171 (29)	<u>178</u>	134 (17)	145 (9)	280 (62)	n.a.	n.a.	160 (2)	186 (5)	174 (4), 306 (6), 309 (6), 281 (5)
34	21.36	3f _d	384	201 (8)	208 (20)	164 (2)	175 (5)	<u>340</u>	369 (12)	325 (50)	190 (1)	216 (1)	324 (13)
35	21.50	1p	282	145 (41)	162 (85)	118 (7)	119 (7)	<u>238</u>	n.a.	n.a.	144 (7)	n.a.	235 (22), 210 (13), 220 (12)
36	22.06	1c _d ^a	324	187 (33)	<u>162</u>	118 (5)	161 (34)	280 (49)	309 (16)	n.d.	n.d.	n.d.	178 (46), 171 (15)
37	22.24	2p _d / 4p _d isomer	324	171 (31)	<u>178</u>	134 (15)	145 (8)	280 (42)	n.a.	n.a.	160 (1)	186 (1)	
38	22.90	2f _d Z isomer	354	201 (38)	178 (92)	134 (20)	175 (13)	<u>310</u>	n.d.	295 (5)	160 (4)	186 (5)	174 (4), 187 (25), 208 (12), 308 (13), 322 (13)
39	22.97	1f	312	175 (17)	162 (24)	118 (3)	149 (3)	<u>268</u>	297 (1)	253 (7)	144 (4)	n.a.	240 (4), 269 (6)
40	23.04	3f _d Z isomer	384	201 (25)	<u>208</u>	164 (9)	175 (10)	340 (25)	369 (4)	325 (9)	n.d.	n.d.	352 (30), 149 (8), 338 (4)
41	23.22	3f _d Z isomer	384	201 (21)	<u>208</u>	164 (10)	175 (9)	340 (21)	369 (6)	325 (7)	n.d.	n.d.	352 (37), 149 (8), 193 (4)
42	27.99	1p _d Z isomer	308	171 (54)	<u>162</u>	118 (6)	145 (19)	264 (11)	n.a.	n.a.	144 (1)	170 (1)	240 (4)
43	28.26	6f	342	175 (13)	192 (42)	148 (6)	149 (4)	<u>298</u>	327 (2)	283 (10)	174 (2)	n.a.	270 (4), 160 (5)
44	28.33	1p _d Z isomer	308	171 (49)	<u>162</u>	118 (5)	145 (19)	264 (11)	n.a.	n.a.	144 (1)	n.d.	240 (6)
45	29.06	1f _d Z isomer	338	201 (75)	<u>162</u>	118 (10)	175 (40)	294 (25)	n.d.	279 (7)	n.d.	n.d.	292 (9), 306 (14), 271 (13), 270 (13)
46	29.68	1p _d	308	171 (29)	162 (43)	118 (4)	145 (14)	<u>264</u>	n.a.	n.a.	144 (4)	170 (10)	158 (6), 236 (6), 93 (4)
47	29.90	1f _d Z isomer	338	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
48	30.71	1f _d	338	201 (29)	162 (27)	118 (3)	175 (13)	<u>294</u>	n.d.	279 (17)	144 (2)	170 (9)	158 (9), 266 (6), 295 (6), 269 (5), 123 (4)
49	32.86	1p _d Z isomer	308	171 (47)	<u>162</u>	118 (5)	145 (18)	264 (8)	n.a.	n.a.	n.d.	170 (1)	289 (6), 239 (4), 240 (4), 261 (4)

L, perte neutre; n.d. non-déecté; n.a., sans objet

a Le seuil d'intensité relative pour les fragments diagnostiques, les petits fragments NL et ceux correspondant à $i + \alpha$ et $ii + \alpha$ était ≥ 1 , pour les autres fragments, il était ≥ 4 .

b Les autres fragments comprennent ceux correspondant aux voies de fragmentation iii, iv, v et divers fragments.

c Annotation confirmée avec la norme.

d Annoté comme 4 par comparaison avec les standards analytiques de 2c, 2p et 2f et une étude précédente (Wise, 2011), qui a montré que 4 élues après 2.

III. Profil des avenanthramides des plants d'avoine

Pour obtenir une indication des quantités d'avenanthramides dans l'avoine semis, les avenanthramides ont été quantifiés à l'aide d'une courbe d'étalonnage de 2c à 340 nm. Un chromatogramme typique UHPLC-PDA à 340 nm de l'extrait des grains et du semis est illustré dans la figure 12.

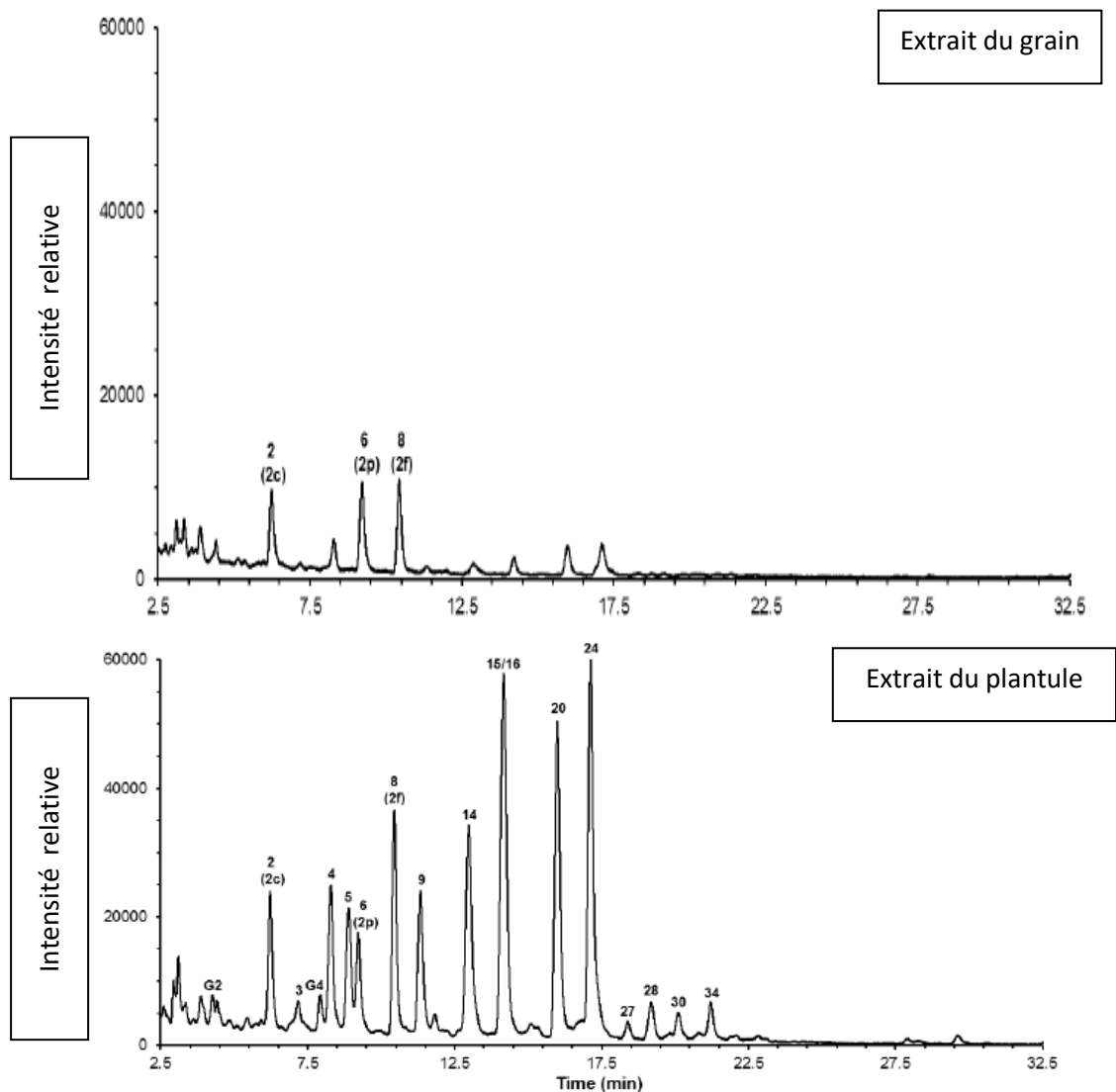


Figure 12 : Chromatogrammes UHPLC-PDA des extraits de graines d'avoine et de plantules enregistrés à 340 nm .

L'extrait des grains d'avoine ne contenait que de petites quantités d'avenanthramides représentés principalement (> 70%) par 2p, 2c et 2f (Fig.12, tableau 05). La teneur en avenanthramides a augmenté après germination, résultant en des quantités environ 25 fois plus importantes trouvées dans les plantules d'avoine (Fig 13, Tableau 05) .

Tableau 05 : Teneur en avenanthramides des grains d'avoine et des plantules en μmol d'avenanthramide pour 100 g de matière sèche.

Pic n ^o	Av	$\mu\text{mol Av en 2c équivalents pour 100 g MS,}$ moyenne (\pm ET)	
		Grains	plantules
G2	2c-hex	<LOQ	2 (\pm 0.2) ^c
2	2c	2.2 (\pm 0.03)	12.4 (\pm 0.9) ^d
3	5p	<LOQ	4 (\pm 0.9) ^c
G4	5f _d -hex	n.d.	2.3 (\pm 0.9)
4	5f	<LOQ	10.5 (\pm 2.2) ^c
5	5c _d	n.d.	9.2 (\pm 2.5)
6	2p	2.5 (\pm 0.04)	11.6 (\pm 1.5)
8	2f	2.4 (\pm 0.04)	22.1 (\pm 2.3)
9	2c _d	<LOQ	13.5 (\pm 0.8)
14	5p _d	<LOQ	24.9 (\pm 2.0)
15/16	5f _d /3f	<LOQ	36 (\pm 6.5)
18	3c _d	n.d.	1.6 (\pm 0.1) ^e
20	2p _d	1.1 (\pm 0.14)	43.5 (\pm 9.4)
24	2f _d	1.4 (\pm 0.03) ^c	41.7 (\pm 2.5)
27	2p _d /4p _d	<LOQ	1.8 (\pm 0.1) ^f
28	4f _d	<LOQ	3.2 (\pm 0.8)
30	3p _d	<LOQ	3.7 (\pm 0.7)
34	3f _d	n.d.	3.8 (\pm 0.3)
Total		9.6\pm0.14	246.7\pm6.6

Des études antérieures ont également montré une augmentation de la teneur en avenanthramides lors de la germination (Skoglund et al., 2008). Skoglund et ses collaborateurs ont utilisé des conditions de croissance différentes, à savoir un temps de trempage plus court de leurs graines (10–14 vs 20 h) et la phase de germination a été réalisée

à une température et durée plus basses (120 h à 16 ° C ou 72 h à 20 ° C vs 96 h à 30 ° C) (Skoglund et al., 2008).

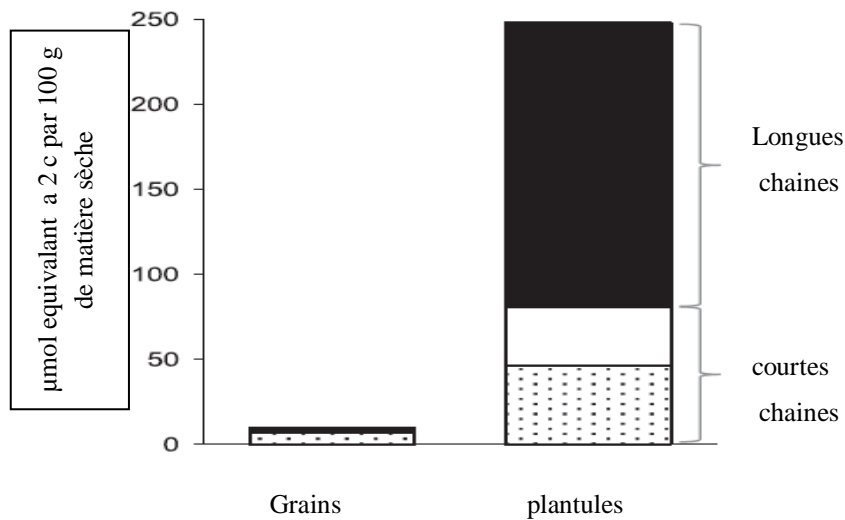


Fig13 : Teneur en avenanthramide des grains et des plantules d'avoine en μmol d'avenanthramides par 100 g de MS, basé sur la surface en UHPLC-PDA à 340 nm quantifiée en utilisant une courbe d'étalonnage de 2c. **Pointillé**, 2p + 2c + 2f; **blanc**, autre avenanthramides à courtes chaines ;**noir** :avenanthramides à chaines longues ;**MS** :matière sèche.

Généralement, le processus de germination augmente la valeur nutritionnelle des céréales (Wu 1983; Tian et al., 2010). Surtout dans l'avoine, la germination a été rapporté pour augmenter la biodisponibilité des protéines en raison de l'augmentation de la teneur en acides aminés libres (Tian et al., 2010). Plusieurs études ont montré une augmentation d'environ 20% de la teneur en AVA dans les grains d'avoine après le processus de germination (Bryngelsson et coll. 2002; Kaukovirta-Norja et al. 2004; Skoglund et coll. 2008; Hübner et Arendt 2013). Cette augmentation est principalement due à l'activation de l'hydroxyanthranilate N-hydroxycinnamoyl transférase, enzyme impliquée dans la synthèse d'AVA pendant la germination. De plus, (Skoglund et al. 2008) ont indiqué que la germination peut être une méthode précieuse pour augmenter le contenu des AVA dans l'avoine. D'autre part, Mattila et al. (2005) ont déclaré que le contenu des AVA peut être augmenté dans les produits d'avoine par simple processus tels que le trempage, la germination ou le maltage (Boz H. 2015).

Jusqu'à présent, aucun rapport de glycosides d'avenanthramide n'avait été publié, lorsque Wu et ses collaborateurs ont signalé plusieurs glycosides de son d'avoine (**Wu et al., 2018**). La glycosylation est couramment utilisée par les plantes pour stocker les métabolites secondaires, ce qui est également observé dans d'autres céréales, par exemple les glycosides de benzoxazinoïdes dans le blé (**De Bruijn et al., 2016**). La glycosylation limite la réactivité des métabolites secondaires et prévient l'auto-toxicité (**Jones et Vogt, 2001**).



Conclusion

L'utilisation d'une combinaison de spectrométrie de masse à piège à ions ESI-IT avec fragmentation CID et ESI-FTMS haute résolution avec fragmentation HCD pourra orienter vers les voies de fragmentation des avenanthramides. Une ligne directrice de décision était définie pour faciliter l'annotation future des avenanthramides inconnus obtenus par LC-ESI-MS. Avec cette approche, 28 avenanthramides uniques ont été annotés par analyse UHPLC-MS d'un extrait de semis d'avoine. De plus, des isomères et des glycosides d'avenanthramides ont été détectés. Le contenu en Avenanthramide a augmenté de 25 fois après la germination des graines d'avoine. Dans l'extrait de semis d'avoine, les avenanthramides 2p, 2c et 2f, qui sont souvent appelés les avenanthramides majeurs, représentaient moins de 20% du contenu total de l'avenanthramide.

Cette étude nous montre l'importance et la fiabilité de ces méthodes dans la quantification et la détection des avénanthramids, et leur application dans les futures études sur l'avoine en Algérie qui pourraient donner d'autres résultats sur le nombre d'AVAs contenus dans les espèces locales et l'influence de différentes phases du cycle de vie de l'avoine sur leurs concentrations.



Références bibliographiques

- **Bain D., Smalley R. K.(1968)** "Synthesis of 2-substituted-4(H)-3.1-benzoxazin-4-ones". *J. Chem. Soc.C*, 1593-1597.
- **Baumann LS** **Less-known botanical cosmeceuticals (2007)** · *Dermatol Therapy*, **20(5):330-342**, .
- **Belaid, D. (1986)**. Aspect de la céréaliculture algérienne. Collection le cours d'agronomie office des publications universitaires. 207 p
- **Blaakmeer, A.; Van Der Wal, D.; Stork, A.; Van Beek, T. A.; De Groot, A.; Van Loon, J. J.(1994)**. "Structure-activity relationship of isolated avenanthramide alkaloids and synthesized related compounds as oviposition deterrents for *Pieris brassicae*". *Journal of Natural Products*.**57** (8): 1145–51.
- **Bratt, K., Sunnerheim, K., Bryngelsson, S., Fagerlund, A., Engman, L., Andersson, R. E., & Dimberg, L. H. (2003)**. Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and structure-antioxidant activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51(3)**,594–600.
- **Bremness Lesley (1999)** *Encyclopedia of Herbs* Paperback .
- **Bryngelsson, S., Ishihara, A., & Dimberg, L. H. (2003)**. Levels of avenanthramides and activity of hydroxycinnamoyl-CoA: Hydroxyanthranilate N-hydroxycinnamoyl
- **Butt MS, Tahir-Nadeem M, Khan MK, Shabir R (2008)** Oat: unique among the cereals.*Eur J Nutr* **47:68–79**.
- **Carder G., Chu, Y. Chung, Y. French, J.A., O'Shea, M., Jan-Willem, B.K. (2013)**. U. S. Patent No. 833,717. Chicago, IL (US), "United States Patent Application Publication".
- **Chatel, R.E., Chu, Y.F., Chung, Y., French, J.A., O'Shea, M., (2013)**. Publication number US20130183405 A1. "Method of Processing Oats to Achieve Oats with an IncreasedAvenanthramide Content".
- **Chen C, Neill K, Wichman D, Westcott M (2008)** Hard red spring wheat response to row spacing, seeding rate, and nitrogen. *Agron J* **100:1296–1302**.
- **Chu, Y.F., Wise, M.L., Gulvady, A.A., Chang, T., Kendra, D.F., Klinken, B.J.V., Shi, Y., O'Shea, M. (2013)**. "In vitro antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of seven common oats".Elsevier, 426-431.
- **Clemens R, van Klinken BJW (2014)** Oats, more than just a whole grain: an introduction. *Br J Nutr* **112:S1–S3**.
- **Collins FW (1989)** Oat phenolics: avenanthramides, novel substituted n-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. *J Agri Food Chem* **37:60–66**.
- **Collins FW and Mullin WJ (1988)** "High-performance liquid chromatographic determination of avenanthramides, N-aroylanthranilic acid alkaloids from oats". *Journal of Chromatography A*,**445**, 363-370
- **De Bruijn, W. J. C., Vincken, J.-P., Duran, K., & Gruppen, H. (2016)**. Mass spectrometric characterization of benzoxazinoid glycosides from *Rhizopus*-elicited wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64(32)**, 6267–6276.
- **Dimberg LH, Theander O, Lingnert H. (1993)** Avenanthramides—a group of phenolic antioxidants in oats. *Cereal Chem*;**70:637..**
- **Dimberg, L. H., Sunnerheim, K., Sundberg, B., & Walsh, K. (2001)**. Stability of oat avenanthramides.*Cereal Chemistry*, **78(3)**, 278–281.

- **Fagerlund A, Sunnerheim K, Dimberg LH. (2009)** Radical-scavenging and antioxidant activity of avenanthramides. *Food Chem*;113(2):550–6
- **FAO.(2012).** The state of food and agriculture. food and agriculture organization of the united nations Rome.
- **FAOSTAT (2015).** La production d'avoine en Algérie.
- **-Feliachi, K. (2002).** PNDA, Intensification et développement des filières, cas de la
- (1994). "Structure-activity relationship of isolated avenanthramide alkaloids and synthesized
- **Fillet., (2000).** La graine de blé composition et utilisation ; INRA paris p46, 82 Hachette
- **Fowler, J. J., (2007)** "Examining options for Barrier Protection in Atopic Dermatitis and Eczema". Clinical update – Recent insights into the origin and management of atopic dermatitis. Supported by Johnson & Johnson.
- **Frid A, Tura A, Pacini G, Ridderstrale M (2017)** Effect of oral pre-meal administration of betaglucans on glycaemic control and variability in subjects with type 1 diabetes. *Nutrients*
- **Gramza-Michałowska A, Kmiecik D, Kobus-Cisowska J, Żywica A, Dziedzic K, Brzozowska A(2018)** Phytonutrients in oat (*Avena sativa* L.) Drink: effect of plant extract on antiradical capacity, nutritional value and sensory characteristics. *Polish J Food Nutr Sci* 68:63–71.
- **Gita Chawla*, Chanda Ranjan** (2016) Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatograph *Open Chemistry Journal* 3(1):1-16
- **.Halima NB, Saad RB, Khemakhem B, Fendri I, Abdelkafi S** (2015) Oat (*Avena sativa* L.): oil and nutriment compounds Valorization for potential use in industrial applications. *J Oleo Sci* 64:915–932.
- **Halliwell.B**(1990)How to characterize a biological antioxidantPUB-MED<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2159941>.
HEALTH GRAIN *Meth Anal Bioact Comp Small Grain Cereal* 2009;113–27.
- **Ishihara A, Kojima K, Fujita T, Yamamoto Y, Nakajima H** (2014) New series of avenanthramides in oat seed. *Biosci Biotechnol Biochem* 78:1975–1983. [ht](#)
- **. Julio Isidro-Sánchez, Elena Prats, Catherine Howarth, Tim Langdon and Gracia Montilla-Bascón(2020)** Genomic Approaches for Climate Resilience Breeding in Oats.Chapter IV;137-141.
- **Khan K, Jovanovski E, Ho HV, Marques AC, Zurbau A, Mejia SB, Sievenpiper JL, Vuksan V** (2018) The effect of viscous soluble fiber on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 28:3–13
- **Kim, E.O., Min, K.J, Know, T.K., Um, B.H., Moreau, R. H., Choi, S.W.**(2012) "Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharidestimulated" *Raw 264.7 macrophages*. Elsevier, 1309-1316
- **lias Marmouzi, Shahira M. Ezzat (2018.)** The Pharmacology of Avenanthramides Polyphenols Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease 3
- **Koenig, RT, Dickman, JR, Wise, ML, Ji, LL** (2011). Avenanthramides biodisponibles et dans Accumulez hépatique, cardiaque, et tissu musculaire squelettique Après Gavage orale chez rat ». *Journal de chimie agricole et alimentaire*, 6438 – 6443

- **Mattila P, Pihlava JM, Hellstrom J** (2005) Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J Agric Food Chem* 53:8290–8295.
- **Mayama S, Tani T, Matsuura Y, Ueno T. and Fukami H.** (1981) "The production of phytoalexins by oat in response to Crown Rust, *Puccinia coronata* f. sp. *Avenae*". *Physiological Plant Pathology* 19, 217–226.
- **Melardi MG.** (2013) "Avena". (<http://www.lapelle.it/alimentazione/avena.htm>)
- **Meydani, M.** (2009). "Potential health benefits of avenanthramides of oats". *Nutrition Reviews*, Vo. 67, 731-735.
- **Molteberg, E.L.**(1996) Sensory and chemical studies of lipid oxidation in raw and heat-treated oat flours *Cereal chemistry (USA)*ISSN : 0009-0352
- **Murphy, J.P. and Hoffman.L.** (1992). The origin, history, and production of oat.
- **(Peer Schilperoord ,)**(2017). Plantes cultivées en Suisse ;L'avoine
<https://www.researchgate.net/publication/320613778>
- **Hesham F. Oraby , Maha F. El-Tohamy , Ayman M. Kamel , Mohamed F. Ramadan,**(2017) Changes in the concentration of avenanthramides in response to salinity stress in CBF3 transgenic oat. *Journal of Cereal Science* 76 ; 263e270
- **Peterson DM, Hahn MJ, Emmons CL.** (2002) Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities in vitro , *Food Chem*;79(4):473–8.
- **Peterson DM, Qureshi A** (1993) Genotype and environmental effects on tocopherols of barley and oats. *Cereal Chem* 70:15
- **Planet scope.**(2012). La Production mondiale d'avoine. https://www.planetoscope.com.plantes_sarclées_prairies_Sciences_et_Technique
- **Singh R, De S, Belkheir A** (2013) *Avena sativa* (Oat), a potential nutraceutical and therapeutic agent: an overview. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53:126–144.
- **Sirodot.g-e.,** (2016). L'avoine, description, classification, Etude du grain des variétés Françaises et Etrangères, culture
- **Skoglund, M., Peterson, D. M., Andersson, R., Nilsson, J., & Dimberg, L. H.** (2008). Avenanthramide content and related enzyme activities in oats as affected by steeping and germination. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 294–303.
- **Sur, R., Nigam, A., Grote, D., Liebel, F., Southall, M., D.** (2008). "Avenanthramides, polyphenols from oats, exhibit anti-inflammatory and anti-itch activity". *Arch Dermatol Res*, 300:569–574
- **telabotanica.org ;**L'avoine cultivé (*Avena Sativa* L)
- **Wise ML. Avenanthramides: chemistry and biosynthesis.** (2014) *Oats Nutr Technol*;195–226.
- **Wise, M. L.** (2011). Effect of chemical systemic acquired resistance elicitors on avenanthramide biosynthesis in oat (*Avena sativa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7028–7038.
- **Wise, M. L.** (2013). Avenanthramides: Chemistry and biosynthesis. In Y. Chu (Ed.). *Oats Nutrition and Technology* (pp. 195–226). John Wiley Sons Ltd.
- **Wise, M. L., Doehlert, D. C., & McMullen, M. S.** (2008). Association of avenanthramide concentration in oat (*Avena sativa* L.) grain with crown rust incidence and genetic resistance. *Cereal Chemistry*, 85(5), 639–641.

- **Wissam BOUMELLAL et Madiha AMROUCHE** L'effet de la date de semis sur la culture de l'avoine (*Avena sativa*.L) sur quelques paramètres de croissance et de production dans la région de Khemis-Miliana
- **Xie, Z. H., Mui, T., Sintara, M., Ou, B. X., Johnson, J., Chu, Y. F., O'shea, M., Kasturi, P., & Chen, Y. M. (2017)**. Rapid quantitation of avenanthramides in oat-containing products by high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-TQMS). *Food Chemistry*, 224, 280–288.
- **Zhou X, Jellen EN, Murphy JP (1999b)** Progenitor germplasm of domesticated hexaploid oat. *Crop Sci* 39:1208–1214



Résumés

Résumé :

Les avénanthramides sont des amides, avec une sous unité d'acide phénylalcénoïque (PA) et une sous-unité d'acide anthranilique (AA), qui sont des métabolites secondaires de l'avoine. Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution utilisant l'ionisation par électro-spray couplée à la chromatographie à ultrahaute performance pour la séparation, la détection et l'identification des AVA. Dans ce contexte, et pour apprécier la diversité des avénanthramides de l'avoine, nous avons initié ce travail qui consiste en l'étude et l'analyse d'un article scientifique se rapportant à la question intitulé «Caractérisation par spectrométrie de masse des avénanthramides et amélioration de leur production par germination de l'avoine (*Avena sativa*) », réalisé par De Bruijn et al 2019. Le but de cet article est l'extraction, la séparation, la détection et l'identification des AVAs des grains d'avoine avant et après germination en utilisant la chromatographie (UHPLC) à haute performance couplée à la spectrométrie ESI-IT et la spectrométrie ESI-FTMS.

Avec cette approche, 28 avénanthramides uniques ont été annotés par analyse UHPLC-MS d'un extrait de semis d'avoine. De plus, des isomères et des glycosides d'avénanthramides ont été détectés. Le contenu en Avénanthramide a augmenté de 25 fois après la germination des graines d'avoine. Dans l'extrait de semis d'avoine, les avénanthramides 2p, 2c et 2f, qui sont souvent appelés les avénanthramides majeurs, représentaient moins de 20% du contenu total de l'avénanthramide.

Mots clés : avoine, avénanthramides, acide anthranilique, acide phénylalcénoïque, UHPLC, Spectrométrie de masse.

Abstract:

Avenanthramides are amides, with a phenylalkenoic acid (PA) subunit and an anthranilic acid (AA) subunit, which are secondary metabolites of oats. In recent years, there has been increasing interest in the use of high resolution mass spectrometry using electro-spray ionization coupled with ultra high performance chromatography for the separation, detection and identification of AVAs. . In this context, and to appreciate the diversity of avenanthramides in oats, we have initiated this work which consists of the study and analysis of a scientific article relating to the question entitled "Characterization by mass spectrometry of avenanthramides and improvement of their production by germination of oats (*Avena sativa*) ", carried out by De Bruijin et al 2019. The aim of this article is the extraction, separation, detection and identification of AVAs from grains of oats before and after germination using high performance chromatography (UHPLC) coupled with ESI-IT spectrometry and ESI-FTMS spectrometry.

With this approach, 28 unique avenanthramids were annotated by UHPLC-MS analysis of an oat seedling extract. In addition, avenanthramide isomers and glycosides have been detected. The content of Avenanthramide increased 25 times after germination of oat seeds. In oat seedling extract, avenanthramides 2p, 2c and 2f, which are often referred to as major avenanthramids, accounted for less than 20% of the total avenanthramide content.

Key words: oats, avenanthramides, anthranilic acid, phenylalkenoic acid, UHPLC, Mass spectrometry.

ملخص:

الأفينانثراميدات عبارة عن أميدات ، مع وحدة فرعية لحمض فينيل ألكينويك (PA) ووحدة فرعية واحدة لحمض أنثرانيليك (AA) ، وهي مستقلبات ثانوية للشوفان. في السنوات الأخيرة ، كان هناك اهتمام متزايد باستخدام مقياس الطيف الكتلي عالي الدقة باستخدام التأين بالرش الكهربائي إلى جانب تحليل كروماتوجرافي عالي الأداء لفصل واكتشاف وتحديد هوية AVAs. في هذا السياق ، ولتقدير تنوع avenanthramides في الشوفان ، فقد بدأنا هذا العمل الذي يتكون من دراسة وتحليل مقال علمي يتعلق بالسؤال المعنون "التوصيف بواسطة مقياس الطيف الكتلي لـ avenanthramides وتحسين إنتاجها عن طريق إنبات الشوفان (Avena sativa) " ، الذي أجراه De Bruijin et al 2019. الهدف من هذه المقالة هو استخراج وفصل واكتشاف وتحديد هوية AVAs من حبوب الشوفان قبل الإنبات وبعده باستخدام تحليل كروماتوجرافي عالي الأداء (UHPLC) إلى جانب مطياف ESI-IT ومقياس طيف ESI-FTMS.

مع هذا النهج ، تم شرح 28 أفينانثراميد فريد من خلال تحليل UHPLC-MS لمستخلص بذر الشوفان. بالإضافة إلى ذلك ، تم اكتشاف أيزومرات أفينانثراميد وجليكوسيدات. زاد محتوى الأفينانثراميد 25 مرة بعد إنبات بذور الشوفان. في مستخلص بذر الشوفان ، يمثل avenanthramides 2p و c2 و f2 ، والتي يشار إليها غالبًا باسم avenanthramids الرئيسي ، أقل من 20 ٪ من إجمالي محتوى avenanthramide.

الكلمات المفتاحية: الشوفان ، أفينانثراميد ، حمض الأنثرانيليك ، حمض فينيل ألكينويك ، UHPLC ، مطياف الكتلة.

Année universitaire : **2019/2020**

Présenté par : BOUMELLA Hocine

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie
Option : Biochimie Appliquée

Thème : Les avénanthramides de l'avoine (*Avena sativa*) avant et après germination de la graine

Résumé :

Les avénanthramides sont des amides, avec une sous unité d'acide phénylalcénoïque (PA) et une sous-unité d'acide anthranilique (AA), qui sont des métabolites secondaires de l'avoine. Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution utilisant l'ionisation par électro-spray couplée à la chromatographie à ultrahaute performance pour la séparation, la détection et l'identification des AVA. Dans ce contexte, et pour apprécier la diversité des avénanthramides de l'avoine, nous avons initié ce travail qui consiste en l'étude et l'analyse d'un article scientifique se rapportant à la question intitulé «Caractérisation par spectrométrie de masse des avénanthramides et amélioration de leur production par germination de l'avoine (*Avena sativa*) », réalisé par De Bruijin et al 2019. Le but de cet article est l'extraction, la séparation, la détection et l'identification des AVAs des grains d'avoine avant et après germination en utilisant la chromatographie (UHPLC) à haute performance couplée à la spectrométrie ESI-IT et la spectrométrie ESI-FTMS.

Avec cette approche, 28 avénanthramides uniques ont été annotés par analyse UHPLC-MS d'un extrait de semis d'avoine. De plus, des isomères et des glycosides d'avénanthramides ont été détectés. Le contenu en Avénanthramide a augmenté de 25 fois après la germination des graines d'avoine. Dans l'extrait de semis d'avoine, les avénanthramides 2p, 2c et 2f, qui sont souvent appelés les avénanthramides majeurs, représentaient moins de 20% du contenu total de l'avénanthramide.

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Université des frères Mentouri Constantine 1

Mots clés : avoine, avénanthramides, acide anthranilique, acide phénylalcénoïque, UHPLC, Spectrométrie de masse.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Prof. KHELIFI.Douadi (UFMC1)

Encadreur : Dr. BELIL.Ines (UFMC1)

Examineur : Dr. BECHKRI.Sakina (UFMC1)