

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

Université A. Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

Option : Biochimie Appliquée aux Substances végétales Bioactives

Thème

*Caractérisation, séparation des substances actives
de Fumaria agraria par chromatographie sur colonne
Et étude de leur effet antioxydant*

Présenté par : M^{elle} GHOUT AGENA

Devant le jury :

Présidente : M^{me} BEDJOU. F	(M.C. A. Université de Bejaia)
Examineur : M^r BELHAMEL K.	(Pr. Université de Bejaia)
Examineur : M^r IGUEROUADA M.	(Pr. Université de Bejaia)
Promotrice : M^{me} BENABDESSELAM F.	(M.C. A. Université de Bejaia)
Invité : M^{elle} BOUGOFFA K.	(M.A.A. Université de Bejaia)

Année 2010-2011

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le bon dieu le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la force, la patience et le courage pour mener ce travail à terme.

Je remercie vivement ma promotrice M^{me} Benabdesselam.F maître de conférence à l'université de Bejaia pour son encadrement de qualité ces encouragements et son suivi nécessaire pour la réalisation de ce travail, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon profond respect.

Je tiens également à remercier chaleureusement ma co-promotrice M^{elle} Bougoffa .K maître assistante à l'université de Bejaia pour l'intérêt qu'elle a apporté à ce travail son suivi ,ces conseils, le soutien et la contribution qu'elle m'a apporté afin de le terminer dans des conditions meilleures soyez assuré de ma vive reconnaissance.

Je remercie vivement M^{me} Bejou.F maître de conférence à l'université de Bejaia d'avoir accepté de présider le jury et M^r Iguerouada .M professeur à l'université de Bejaia ainsi que M^r Belhamel.K professeur à l'université de Bejaia d'avoir accepté de prendre de votre temps pour juger ce travail je vous prie de croire à ma respectueuse considération.

J'ajoute des remerciements groupés à M^{elle} Khamtache.S et tous les membres du laboratoire pour les leur conseils et soutien.

J'adresse mes vifs remerciements à tous les techniciens des laboratoires de notre faculté :

M^r Mankou .D le responsable de l'animalerie, M^r Bouchenoua, M^{elle} Akfil ainsi que tous les techniciens du laboratoire 3BS

Je remercie également tous les enseignants de notre faculté qui ont participé à ma formation ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*D*édicaces

A mes très chers parents : de votre affection de votre sacrifice et tous les efforts que vous avez déployé durant toute ma vie, j'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect mes remerciements seront sans limites.

A mes très chère frères Ali, Riad, Lamine et Salim pour votre aide et soutien durant ces trois dernières années je vous souhaite toute la réussite du monde.

A mes très chère grand parent que dieu vous garde au prés de nous.

A mes très chère ancles, tantes, cousins et cousine merci pour vos encouragements

A ma très chère tante Lynda avec qui j'ai partagé des moments importants j'ai trouvé en toi une amie et une grande sœur.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Les Fumariacées

I.1. Historique et habitat.....2

I.2. Description de la fumeterre.....2

I.3. Classification botanique des Fumariacées.....3

I.3.1. Classification classique4

I.3.2. Classification phylogénique.....4

I.4. Propriétés pharmacologiques.....5

I.5. Composition chimique de la fumeterre.....5

I.6. les substances actives des Fumariacées.....6

I.6.1. Les composés phénoliques.....6

I.6.1.1. Définition6

I.6.1.2. Biosynthèse et classification.....6

I.6.1.3. Les flavonoïdes.....9

I.6.1.3.1. Définition.....9

I.6.1.3.2. Structure chimique et classification.....10

I.6.1.4. Les acides phénoliques.....10

I.6.1.5. Les propriétés pharmacologiques et biologiques des polyphénols.....11

I.6.2. Les alcaloïdes isoquinoléiques.....11

I.6.2.1. Définition.....11

I.6.2.2. L'effet pharmacologique de quelques alcaloïdes du genre *Fumaria*.....13

I.6.2.3. Les alcaloïdes des Fumariacées.....13

II. Les méthodes d'étude des activités antioxydants et des substances bioactives.....15

II.1. Méthode d'études de l'activité antioxydant.....15

II.1.1. Le test TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity).....15

II.1.2. Le test DPPH.....16

II.1.3. Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential).....	16
II.1.4. Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	17
II.1.5. La méthode de Co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique.....	17
II.1.6. Test TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity).....	18
II.1.7. Test à l'acide thiobarbiturique (TBA).....	18
II.2. Les méthodes chromatographiques.....	18
II.2.1. Définition.....	18
II.2.2. Classification des méthodes chromatographiques.....	19
II.2.3. La chromatographie sur colonne.....	20
II.2.4. La chromatographie sur couche mince.....	21

Partie II : Etude expérimentales

III. Matériels et méthodes.....	24
III.1. Matériels.....	24
III.1.1. Matériel végétal.....	24
III.1.1.1. Description botanique de <i>Fumaria agraria</i>	24
III.1.1.2. Classification.....	25
III.2. Matériels et réactifs	25
III.3. Méthodes.....	25
III.3.1. Préparation de la poudre végétale.....	25
III.3.2. Teneur en eau (méthodes gravimétrique).....	26
III.3.3. Extraction des alcaloïdes et des composés phénoliques de <i>F. agraria</i>	26
III.3.3.1. Extraction des alcaloïdes totaux.....	28
III.3.3.2. Fractionnement des alcaloïdes de <i>F. agraria</i>	29
III.3.3.3. Extraction d'extrait brut contenant les composés phénoliques.....	30
III.3.3.4. Extraction des acides phénoliques	31
III.4. Taux d'extraction des alcaloïdes et des composés phénoliques.....	32
III.5. Dosage des substances actives	33
III.5.1. Dosage des composés phénoliques.....	33
III.5.2. Dosage des flavonoïdes.....	34
III.6. Détermination de l'activité antioxydant.....	34
III.6.1. Mesure du pouvoir réducteur.....	34

III.6.2.Activité scavenging du radical DPPH.....	36
III.7.Séparation et caractérisation des composés phénoliques et des alcaloïdes par chromatographie sur colonne couplée à la CCM.....	37
III.7.1. Préparation de la colonne et fractionnement.....	37
III.7.2.Analyse et séparation des fractions obtenues de la chromatographie sur colonne par chromatographie sur couche mince (CCM).....	37
III.8.Etude statistique.....	39
IV. Résultats et discussion	47
IV.1.Teneur en eau.....	47
IV.2.Taux d'extraction des alcaloïdes et des composés phénoliques.....	47
IV.2.1. Taux d'extraction des alcaloïdes.....	47
IV.2.2.Taux d'extraction des composés phénoliques.....	49
IV.3. Dosage des composés phénoliques.....	50
IV.3.1.Dosage des polyphénols totaux.....	50
IV.3.2.Dosage des flavonoïdes.....	51
V. Etude de l'activité antioxydants.....	51
V.1.Effet scavenger du radical DPPH.....	51
V.2. mesure du pouvoir réducteur.....	55
VI. Caractérisation par CCM des différentes fractions.....	58
VI.1. Système E.A.T.....	58
VI.2.Système C.M.N.....	64
VI.3.Système C.M.A.....	71
VI.4.Système H.E.D.....	78
VII .La séparation des composés phénoliques par chromatographies.....	85
VI.1.Système E.E.A.....	85
VI.2.Système E.E.A.A.....	87
VI.3. Système E.M.E.....	90
Conclusion et perspective	96
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

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

ABTS⁺ : Le radical ABTS.

AAPH : 2,2-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride

CCM : Chromatographie sur couche mince

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

FRAP: Ferrous reducing antioxidant potential

GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry

HPLC: High performance liquid chromatography

KMBA: L'acide 2-céto-4-méthiobutyrique.

MDA: Malondialdéhyde

ORAC: Oxygene radical scavenging capacity

R_f: Rapport frontal

TBA: L'acide thiobarbiturique

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity

TLC: Thin layer chromatography

TOSC: Total oxyradical scavenging capacity

UV: Ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 : Plante de fumeterre dans son environnement naturel.....	03
Figure 2 : La structure d'un phénol.....	06
Figure 3 : Biosynthèse des composés phénolique : voie du shikimate.....	07
Figure 4 : Représentation de la voie de l'acétate.....	08
Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes.....	10
Figure 6 : Structure du radical ABTS ⁺	15
Figure 7 : Mécanisme de réduction du radical DPPH.....	16
Figure 8: La réaction du test FRAP.....	17
Figure 9: Dispositif de la chromatographie sur colonne.....	20
Figure 10 : Schéma d'une CCM.....	21
Figure 11 : Structure du gel silice et les groupements impliqués dans la réaction.....	11
Figure 12: Photographie de <i>Fumaria agraria</i> dans son environnement	24
Figure 13 : Rampe d'extraction par soxhlet à plusieurs postes.....	27
Figure 14 : Schéma du protocole d'extraction des alcaloïdes totaux.....	28
Figure 15 : Schéma du protocole d'extraction des différentes fractions d'alcaloïdes de <i>Fumaria agraria</i>	29
Figure 16 : Schéma du protocole d'extraction d'extrait brut contenant les composé Phénoliques.....	30
Figure 17 : Protocoles d'extraction des acides phénols.....	31
Figure 18 : Protocole de dosage des composés phénoliques.....	33
Figure 19 : Protocole de dosage des flavonoïdes.....	34
Figure 20: Détermination du pouvoir réducteur.....	35
Figure 21 : Protocole d'étude de l'activité scavenging du DPPH.....	36
Figure 22 : Le système n°1 de séparation des fractions alcaloïdiques.....	40
Figure 23 : Système n° 2 de séparation des fractions alcaloïdiques.....	41
Figure 24 : Système n° 3 de séparation des fractions alcaloïdiques.....	42
Figure 25 : Système n° 4 de séparation des fractions alcaloïdiques.....	43
Figure 26 : Système n°1 de séparation des composés phénoliques.....	44
Figure 27 : Système n°2 de séparation des composés phénoliques	45
Figure 28 : Système n°3 de séparation des composés phénoliques.....	46

Figure 29: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.....	50
Figure 30 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.....	51
Figure 31 : Effet scavenger contre le radical DPPH des standards testés à différentes Concentrations.....	52
Figure 32 : Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits étudiés à différentes Concentration.....	52
Figure 33 : Comparaison d'effet anti-radicalaire des fractions alcaloïdiques à la même Concentration.....	54
Figure 34 : Pouvoir réducteur des extraits testés à différentes concentrations.....	56
Figure 35: Pouvoir réducteur des standards testés à différentes concentrations.....	57
Figures 36 : Chromatogramme obtenus avec le système (EAT) des différentes fractions alcaloïdiques après révélation chimique et physique.....	63
Figure 37 : Chromatogramme obtenus avec le système (CMN) des différentes fractions alcaloïdiques après révélation chimique et physique.....	69
Figure 38: Chromatogramme obtenus avec le système (CMN) des différentes fractions alcaloïdiques après révélation chimique et physique.....	76
Figure 39 : Chromatogramme obtenus avec le système (HED) des différentes fractions alcaloïdiques après révélation chimique et physique.....	82
Figure 40 : Chromatogramme obtenus avec le système (EEA) de l'extrait des composés phénoliques après révélation chimique et physique.....	86
Figure 41 : Chromatogramme obtenus avec le système (EEAA) de l'extrait des composés phénoliques après révélation chimique et physique.....	89
Figure 42 : Chromatogramme obtenus avec le système (EME) de l'extrait des composés phénoliques après révélation chimique et physique.....	92

Liste des tableaux

Tableau I : Les principaux constituants chimiques des fumariacées.....	05
Tableau II : Principales classes de composés phénoliques.....	09
Tableau III : Principales sous classes d’alcaloïdes isoquinoléiques.....	12
Tableau IV: Composition en alcaloïdes isoquinoléiques de quelques espèces de <i>Fumaria</i> ..	14
Tableau V : Description botanique de la partie aérienne de <i>Fumaria agraria</i>	24
Tableau VI : Taux d’humidité moyens des échantillons de la poudre végétales obtenue par broyage et séchage de la partie aérienne de <i>Fumaria agraria</i>	47
Tableau VII : Le taux d’extraction des différents extraits de <i>Fumaria agraria</i>	48
Tableau VIII : IC ₅₀ des différents extraits contre le radical DPPH.....	53
Tableau IX : Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes standards dans le système (EAT) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et révélation Chimique	59
Tableaux X : Chromatographie sur couche mince des sous fractions de la FN, FA, FB dans le Système (EAT) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et révélation Chimique.....	59
Tableau XI : Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes standards dans le système (CMN) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et révélation Chimique.....	64
Tableau XII : Chromatographie sur couche mince des sous fractions de la FN, FA, FB dans le Système (CMN) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et révélation chimique.....	65
Tableau XIII : Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes standards dans le système (CMA) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et révélation Chimique.....	71
Tableau XIV : Chromatographie sur couche mince des sous fractions de la FN, FA, FB dans le Système (CMA) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et révélation chimique.....	72
Tableau XV : Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes standards dans le système (HED) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et révélation Chimique.....	78

Tableau XVI : Chromatographie sur couche mince des sous fractions de la FN, FA, FB dans le Système (HED) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et révélation chimique.....	79
Tableau XVII : Comparaison entre les différents systèmes d'élution des CCM	83
Tableau XVIII : Chromatographie sur couche mince de l'extrait des composés phénolique développé dans le système EEA après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.....	85
Tableau XX : Chromatographie sur couche mince de l'extrait des composés phénolique développé dans le système EEAA après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.....	87
Tableau XXI : Chromatographie sur couche mince de l'extrait des composés phénolique développé dans le système EME après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.....	90
Tableau XXII : Comparaison entre les résultats des différents systèmes d'élution par CCM.....	93
Tableau XXIII : Composés phénoliques probables identifier par CCM.....	94

Introduction

Introduction

L'utilisation des plantes pour se soigner date de la préhistoire, depuis toujours les hommes ont su développer les extraordinaires vertus médicinales que recèlent les plantes (**Ali-Delille, 2010**). Malgré les efforts des chimistes pour la synthèse de nouvelles molécules et face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, comme par exemple l'apparition de bactéries pathogènes multirésistantes ou la gravité de certains effets secondaires, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orientée vers l'obtention de phytomédicaments (Phytothérapie), ce développement constitue une étape indispensable pour l'essor de toute un secteur lié aux besoin non seulement de la thérapie mais aussi de l'industrie agroalimentaire, de la cosmétique et de la parfumerie (**Karou et al., 2005 ; Saadaoui et al., 2006**)

Aujourd'hui 80 % de la population mondiale, surtout dans les Pays en voie de développement tels que l'Algérie, dépend principalement de la médecine traditionnelle pour le traitement des maux (**Iserin, 1999**). L'étude chimique des plantes permet de mieux connaître leurs métabolites secondaires afin d'en faire une utilisation rationnelle pour la sécurité et la promotion de la santé de ceux qui les utilisent, les molécules ayant des activités biologiques intéressantes peuvent faire l'objet de synthèse chimique (**Okafor et Ham, 1999 ; Kouassi, 2007**)

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie en alimentation en cosmétologie, parmi ces composés on retrouve les alcaloïdes et les polyphénols qui représentent un groupe fascinant de produits naturels doués d'une grande diversité structurale, et de propriétés pharmaceutiques intéressantes et suscitent actuellement un grand intérêt (**Bahorun, 1997 ; Muniz, 2006**).

La fumeterre est une plante dicotylédone de la famille des fumariacées ou des papavéracées selon les auteurs. Elle est employée en médecine traditionnelle comme laxative, antipyrétique et surtout dans le traitement des désordres hépatobiliaires. Son efficacité est due en grande partie à la présence d'alcaloïdes isoquinoléiques dans sa composition chimique (**Sener et Orhan, 2005**).

Notre étude englobe deux aspects dont le premier est d'ordre phytochimique, basé principalement sur l'extraction et la quantification de deux classes de métabolites secondaire, les composés phénoliques et les alcaloïdes d'une plante médicinale de la région de Bejaia *Fumaria agraria* ainsi que sur l'évaluation de leur activité antioxydants *in vitro* par deux tests différents : L'effet « scavenger » du radical DPPH et l'étude du pouvoir réducteur. Le second aspect est consacré au fractionnement par chromatographie sur colonne des extraits totaux avec différent systèmes de solvants de migrations. Les fractions récupérées ont fait l'objet d'une séparation et caractérisation par chromatographie sur couche mince << CCM >>.



Synthèse bibliographique

Les Fumariacées

I.1. Historique et habitat :

Fumaria vient du latin «*Fumus terrae*» qui signifie fumée de terre, la plante semble sortir de terre comme une fumée d'où le nom français fumeterre, cependant, d'après Olivier de Serres ce nom serait dû au fait que le suc de la plante fait pleurer les yeux comme la fumée. Les propriétés médicales de la fumeterre sont connues depuis longtemps, des médecins grecs tels que Dioscoride et Galien recommandaient la fumeterre dans le traitement des affections du foie (Souèges, 1961 ; Deysson, 1979).

Les Fumariacées sont bien distribuées dans la région méditerranéenne et elles sont très communes en Europe et en Asie. On les retrouve dans les régions tempérées à sud tropicales et elles sont bien représentées dans l'hémisphère Nord. Les fumeterres poussent dans les champs, les terrains, les décombres et sur les bords des chemins, les terres incultes et le long des vieux murs jusqu'à 1500 m d'altitude (Suau *et al.* , 2002 ; Anton *et Bernard*, 2003).

Les parties aériennes fleuries sont les parties utilisées en médecine traditionnelle, elles montent à fleur au printemps et passent à l'état de graine l'été et l'hiver. La plante est récoltée au moment de la floraison (Schauenberg *et Paris*, 1977).

En médecine traditionnelle la drogue est prescrite comme stimulant biliaire mais aussi pour ses propriétés diurétiques et laxatives et pour son effet bénéfique en dermatologie. La fumeterre est aussi employée comme remède traditionnel de l'asthme dans certains pays d'Asie centrale (Rakotondramasay-Rabesiaka *et al.* , 2009 ; Alqasoumi *et al.* , 2009).

I.2. Description de la fumeterre :

C'est une plante herbacée annuelle (**Figure 1**) d'une cinquantaine de centimètres (Suau *et al.* ,2002).





Figure 1: plante de fumeterre dans son environnement naturel (Anton et Bernard, 2003).

❖ **Tiges :**

Molles et glabres de 20 à 30 cm, elles sont rameuses souvent couchées tendres cassantes quelque fois rougeâtres. (Venkateswara Rao *et al.* , 2007).

❖ **Feuilles :**

De couleur gris-vert, elles sont alternes, pétiolées à folioles écartées et découpées en lobes étroits (multipennées et profondément divisées). (Bruneton, 1999).

❖ **Fleurs :**

Elles sont tubulaires zygomorphes, leur couleur varie du blanc au rose plus au moins sombre et elles présentent à leur extrémité une tache caractéristique brune ou pourpre foncé. Elles se disposent en grappe à l'extrémité des tiges, les pétales supérieurs prolongés par un éperon, les sépales sont ovales lancéolés irréguliers dentés plus larges que le pédicelle et plus étroits que la corolle (Goetz *et al.* , 2009).

❖ **Fruit :**

Le fruit est une silicule globuleuse indéhiscente renfermant une seule graine (Souéges, 1961).



I.3. Classification botanique des Fumariacées :

I.3.1. Classification classique (Goetz *et al.* , 2009).

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Sous classe** : Magnoliidae
- **Ordre** : Papavérales
- **Famille** : Fumariaceae

Dans la famille des Fumariacées on trouve plusieurs genres (*Adlumia*, *Corydalis*, *Dicentra*, *Fumaria*, *Discocapnos*, *Platycapnos*...etc (Suau *et al.* , 2004).

Dans le genre *Fumaria* on trouve une bonne cinquantaine d'espèces différentes les plus connues étant :

- *F.officinalis*
- *F.muralis*
- *F.capreolata*
- *F.parviflora*
- *F.bastardii*
- *F.martinii*
- *F.purpurea*
- *F.indica*
- *F.densiflora*
- *F.vaillantii*

I.3.2. Classification phylogénique :

Certain botanistes (Wilson, 1990 ; Lidèn *et al.* , 1997 ; Salinas, 2003 ; Perveen *et Qaisi*, 2004) incluent les Fumariacées dans celle des Papavéracées.

- **Ordre** : Ranunculales
- **Famille** : Fumariacées
- **Genre** : *Fumaria*



I.4. Propriétés pharmacologiques :

La fumeterre est connue depuis fort longtemps pour ses vertus dépuratives, des travaux ont montré son action de régulateur biliaire (**Sturm et al ., 2006**). La fumeterre soigne les troubles et calme les spasmes intestinaux chroniques, elle combat toute les affections de la peau (dartre, eczéma) et traite la conjonctivite, en tisane elle purifie le sang, régularise la sécrétion biliaire et stimule le foie, l'acide fumarique peut être à l'origine de propriétés laxatives et dermatologiques (**Gilani et al ., 2005 ; Komaszewska et al ., 2007**). Les activités biologiques de la fumeterre sont liées à la présence de différents composés dans la plante tels que les alcaloïdes isoquinoléiques et les hétérosides flavoniques (**Rakotondramasy-Rabesiaka, et al ., 2009**).

I.5. Composition chimique de la fumeterre :

La composition chimique du genre *Fumaria* est résumée dans le tableau n° I

Tableau I : les principaux constituants chimiques des Fumariacées (**Sousek et al., 1999 ; Goetz et al., 2009**).

Famille des constituants chimiques	Constituants chimiques
Alcaloïdes	Protopines, protoberberines, spirobenzylisoquinoleines, benzophenandrines, indobenzazepines.
Acides phénols	Acide caféique, Acide chlorogénique, Acide fumarique, esters maliques de l'acide cinnamique et de l'acide caféique.
Acides organiques	Acide malique, Acide succinique et Acide protocatéchique...etc.
Flavonoïdes	Rutine, isoquercitine.
Autres	Principes amers, mucilage, résine, sels de potassium.



I.6. Les substances actives des Fumariacées :**I.6.1. Les composés phénoliques :****I.6.1.1. définition :**

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qui se caractérisent par la présence d'un ou de plusieurs groupes hydroxyles (**Figure 2**), libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester), attachés à une structure aromatique. Ces composés contiennent exclusivement du carbone de l'oxygène et de l'hydrogène (**Hennebelle et al ., 2004 ; Bennick, 2002**).

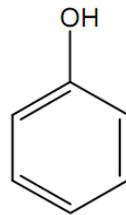


Figure 2 : Structure d'un phénol (**Bruneton, 1987**).

I.6.1.2. Biosynthèse et classification :

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies de biosynthèse :

1-La voie du Shikimate (Figure3) qui conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phenylalanine, tyrosine) puis par désamination de ces derniers aux acides aromatiques et à leur très nombreux dérivés : acides benzoïques, lignanes et lignine, coumarine ...etc.



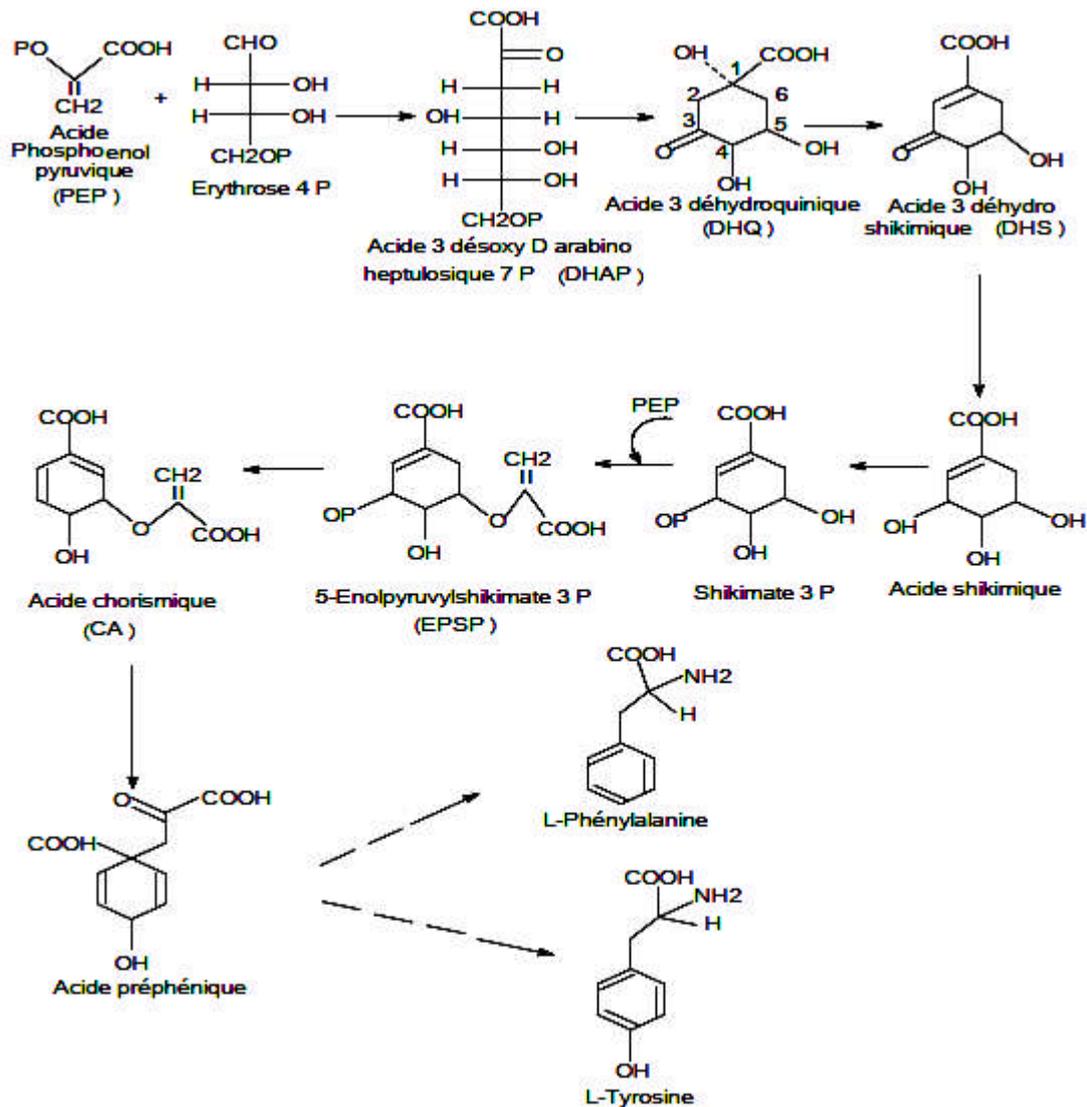


Figure 3: Biosynthèse des composés phénoliques : voie du shikimate (Guignard, 1979).

2-La voie de l'acétate (Figure 4) : qui conduit à des poly- β cetoesters de longueur variable, les polyacétates qui engendrent par cyclisation des composés souvent polycycliques : chromone, isocoumarine, xanthone, quinone...etc

La participation simultanée du shikimate et de l'acétate conduit à l'élaboration de composés d'origine mixte : les flavonoïdes (Bruneton, 1999 ; Guignard, 2000).



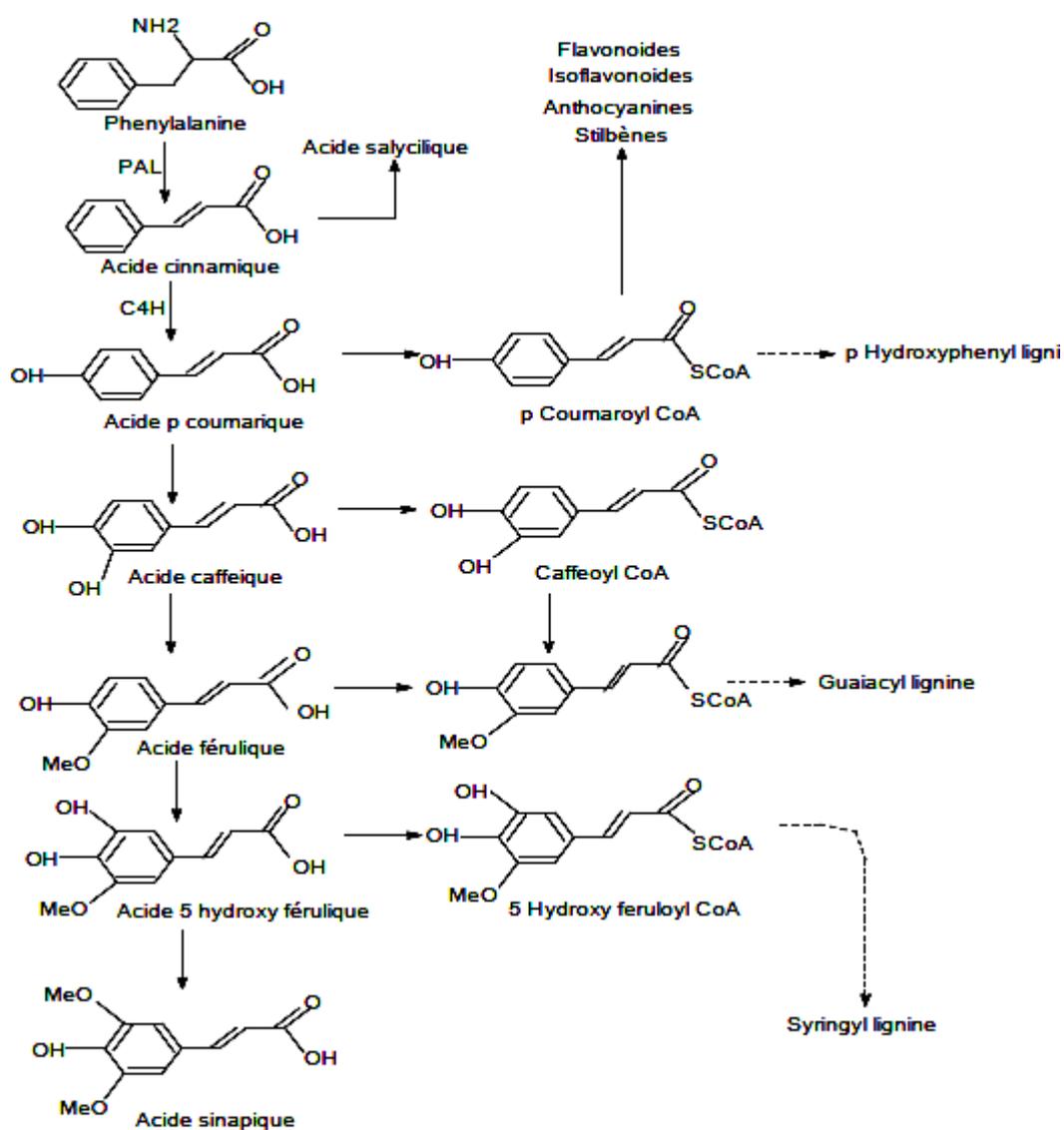


Figure 4 : représentation de la voie de l'acétate (Hoffmanne, 2003).



Plus de 8000 composés naturels qui ne représentent pas plus de 10% des composés présent dans la nature ont été isolés. Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (**Tableau II**) (**Hadj Salem, 2009**).

Tableau II : Principales classes de composés phénoliques (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Structure	Classe
C_6	Phénols simples
C_6-C_1	Acides benzoïques et composés voisins
C_6-C_2	Acétophénonnes et acides phényle acétiques
C_6-C_3	Acides cinnamiques et composés voisins
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins
$C_6-C_1-C_6, C_6-C_2-C_6$	Benzophénonnes, xanthonnes, stilbènes

I.6.1.3. Les flavonoïdes :

I.6.1.3.1. Définition :

Du latin *flavus*, ce sont des substances colorées très répandues chez les végétaux appartenant à la famille des polyphénols. Ils se présentent le plus souvent sous forme d'hétérosides ou sous forme libre comme les génines qui sont des dérivés de la phénylchromone, la chromone étant la benzo- γ -pyrone (**Ghedira, 2005 ; Labbé, 2008 ; Mbodj, 2003**).

I.6.1.3.2. Structure chimique et classification :

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent possèdent tous un même squelette de base à 15 atomes de carbones (**Figure 5**), leur structure chimique en $C_6-C_3-C_6$ est constituée de deux unités aromatiques (cycle A et cycle B) reliées entre elle par une chaîne tricarbonée qui forme l'hétérocycle (cycle C) (**Lhuillier, 2007 ; Miziti, 2009**).



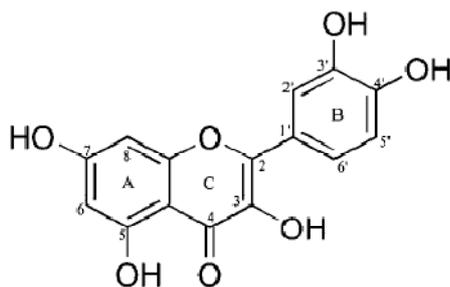


Figure 5 : structure de base des flavonoïdes (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

I.6.1.4. Les acides phénoliques :

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (**Bruneton, 1999**), ils sont solubles dans les solvants organiques polaires (méthanol, acétone, acétate d'éthyle) et dans les solutions d'hydroxyde de sodium et de carbonate de sodium ils sont extractibles par les solvants organiques en milieu acide. On distingue :

1-les phénols simples : Les phénols simples (catéchol, guaiacol...) de structure C_6 qui sont plutôt rares dans la nature.

2-Les dérivés d'acide benzoïque : Ces acides possèdent une structure du type C_6-C_1 et sont très communs aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'esters ou d'hétérosides. Ils sont principalement représentés par : les acides p-hydroxy benzoïque, vanillique, gallique et salicylique...etc.

3-Les dérivés de l'acide cinnamique : Ce sont des composés à C_6-C_3 , très rarement libres et souvent estérifiés. Les acides les plus fréquents sont : l'acide p-coumarique, l'acide caféique et l'acide sinapique. (**Bruneton, 1999 ; Skerget et al., 2005**).

I.6.1.5. Les propriétés pharmacologiques et biologiques des polyphénols :

-Les polyphénols sont des pigments responsables de la coloration des fleurs représentant des signaux visuels qui attirent les insectes pollinisateurs (**Bahorun, 1997**).



-Les polyphénols sont des antioxydants naturels qui suscitent de plus en plus d'intérêt dans le traitement des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives (**Dimitrios, 2006; Aquilano et al ., 2008**).

-Les flavonoïdes et les acides phénols sont essentiellement connus pour leur action antioxydant. A ce jour des centaines de travaux scientifiques ont été réalisés sur leurs propriétés anticancéreuses, en effet ils sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire, préviennent certaines maladies cardiovasculaires, exercent une activité antivirale, anti-microbienne, anti-inflammatoire, et inhibent l'agrégation plaquettaire (**Deluc, 2004 ; Birt et al ., 2001 ; Gattuso et al ., 2007**).

I.6.2. Les alcaloïdes isoquinoléïques :

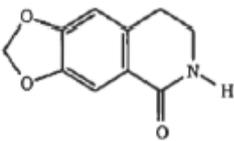
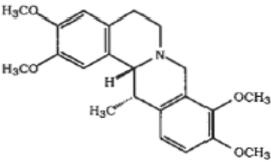
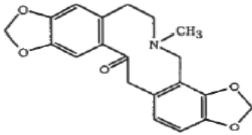
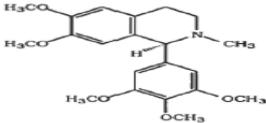
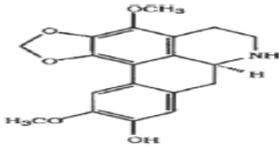
I.6.2.1. Définition :

Les alcaloïdes isoquinoléïques constituent un large groupe de métabolites secondaires. Ils sont largement distribués dans le règne végétal, et sont répartis dans 32 familles. La morphine fut le premier alcaloïde à être isolé à partir de *papaver somniferum* (papavéracées) en 1805. Les acides aminés tels que la phénylalanine, la tyrosine sont les précurseurs de synthèse de cette classe d'alcaloïdes (**Wangchuk, 2004 ; Farzana ,1997**).

Ils possèdent une multitude d'activités biologiques voire une activité anti-hypertensive, anti-malariale, antipyrétique...etc. (**Antri et al ., 2004**). La classification des alcaloïdes isoquinoléïques est basée sur leurs structures et voies de biosynthèse. Ils se subdivisent en plusieurs sous classes (**Tableau III**) .Ils sont à noyau benzyl-tétra hydroisoquinoléine, la tyrosine étant l'élément de départ de la biogénèse des dérivés de l'isoquinoléine (**Farzana, 1997**)



Tableau III : Principales sous classes d'alcaloïdes isoquinoléiques (Shakil, 1998).

Sous classe	Exemple
Les Isoquinoléines simples	<p data-bbox="890 405 1129 439">Noroxyhydrastinine</p> 
Les Protoberberines	<p data-bbox="946 674 1082 707">Coryladine</p> 
Les Berberines	<p data-bbox="954 958 1074 992">Protopine</p> 
Les Phenylisoquinoléines	<p data-bbox="935 1317 1090 1350">Cristostyline</p> 
Les Aprophines	<p data-bbox="946 1563 1082 1597">Cassyfiline</p> 



I.6.2.2.L'effet pharmacologique de quelques alcaloïdes du genre *Fumaria* :

- Les alcaloïdes isoquinoléiques sont doués de diverses activités biologiques. Par exemple des études sur quelques espèces du genre *Fumaria* ont montré que ces métabolites secondaires possèdent une activité antibactérienne, antifongique et antivirale (Orhan *et al.* , 2007).
- En Turquie par exemple le genre *Fumaria* est représenté par 19 espèces certaines d'entre elles sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement du rhumatisme et de l'eczéma. *Fumaria vaillantii* est la plus répandue, ses extraits sont utilisés pour purifier le sang et dans le traitement des maladies dermatologiques. Le genre *Fumaria* est une source importante d'alcaloïdes isoquinoléiques, la protopine est l'alcaloïde le plus actif de *Fumaria vaillantii* elle inhibe l'agrégation plaquettaire (Sener, 2002).
- Les alcaloïdes de la partie aérienne de *Fumaria parviflora* possèdent une activité anti-inflammatoire, anti-diabétique, laxative et favorise la sécrétion biliaire (Alqasoumi *et al.* , 2009).
- Les espèces du genre *Fumaria* sont utilisées comme diurétiques, hépatoprotectrices et laxatives et dans le traitement des conjonctivites. Ces activités sont dues à sa richesse en alcaloïdes isoquinoléiques (Erdoğan, 2009).
- La Berbérine est un alcaloïde isoquinoléique isolé des feuilles de *Fumaria indica*, cet alcaloïde exerce une multitude d'effets pharmacologiques voire des activités anti-bactériennes, anti-hypertensives et anti-inflammatoires. C'est l'un des alcaloïdes le plus utilisés dans le monde (Sarma *et al.* , 1999; Persae *et al.* , 2006; Hwang *et al.* , 2002).

I.6.2.3.Les alcaloïdes des *Fumariacées* :

Le **tableau IV** résume la composition en alcaloïdes isoquinoléiques de quelques espèces du genre *Fumaria* :



Tableau IV: Composition en alcaloïdes isoquinoleiques de quelques espèces de *Fumaria* (sousek *et al.* , 1999).

Espèces	Alcaloïdes
<i>F. agraria</i>	Adlumiceine, coptisine, corytuberine, cryptopine, fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, Parfumine, Protopine.
<i>F. capreolata</i>	Adlumiceine, Adlumidiceine, Cryptopine, Fumaricine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, Parfumine, Protopine.
<i>F. densiflora</i>	Adlumiceine, Cryptopine, Fumaricine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, O-Methylfumarophycine.
<i>F. muralis</i>	Coptisine, Cryptopine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, O-Methylfumarophycine, Parfumine, Protopine, Sinactine.
<i>F. officinalis</i>	Adlumiceine, Coptisine, Corytuberine, Cryptopine, Fumaricine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, O -Methylfumarophycine.
<i>F. parviflora</i>	Adlumiceine, Adlumidiceine, Coptisine, Corytuberine, Cryptopine, Fumariline, Fumaritine, Fumarophycine, O-Methylfumarophycine, Palmatine, Parfumine, Protopine.
<i>F. spicata</i>	Adlumiceine, Coptisine, Fumariline, Fumarophycine, Protopine
<i>F. vaillantii</i>	Adlumiceine, Adlumidiceine, Coptisine, Cryptopine, Fumaricine, Fumariline, Fumarophycine, O-Methylfumarophycine, Parfumine, Protopine, Sinactine.

Les différentes espèces de *Fumaria* peuvent être classées en chémotypes suivant les alcaloïdes majoritaires retrouvés dans leur composition par exemple, *F. agraria* et *F. Capreolata* peuvent être associées aux chémotype II c'est-à-dire à prédominance de protopine et de cryptopine (Maiza-benabdesselam *et al.* , 2007).



Méthodes d'études
Des
Substances bioactives

II. 1.Méthodes d'études de l'activité antioxydant :

L'oxydation est un phénomène complexe qui met en jeu des espèces moléculaires très réactives et très labiles ce qui peut rendre son étude difficile (Rolland, 2004).

L'activité antioxydant est évaluée soit par le dosage des produits formés par des techniques photométriques soit par la mesure de l'efficacité du composé à piéger les radicaux libres, les antioxydants peuvent réduire les radicaux libres par deux mécanismes, soit par transfert d'électrons ou par transfert d'atomes d'hydrogène, (Marc *et al.* , 2004).

Il existe une multitude de tests pour la mesure de l'activité antioxydant d'un composé parmi les plus couramment utilisés :

II.1.1.Le test TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) :

Il est basé sur la capacité d'un antioxydant à inhiber le radical $ABTS^+$ (Figure 6) obtenu à partir de l'ABTS (Sel d'ammonium de l'acide 2.2-azinobis(3-ethyl benzoline-6-sulfonique) comparativement à un antioxydant de référence le Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E). Ce radical cationique de couleur bleu verte présente un maximum d'absorbance à 734 nm, qui résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase de metmyoglobine) en présence d' H_2O_2 ou d'un oxydant. En présence d'un donneur d'hydrogène, le radical devient incolore avec une diminution de l'absorbance, la capacité antioxydante est exprimée en équivalent Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration (mmol/l ou mg/l) de Trolox ayant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1mM de la substance à tester, ainsi plus la valeur du TEAC est élevée plus l'antioxydant est efficace. (Marc *et al.* , 2004; Ali *et al.* , 2008; Zulueta *et al.* , 2009; Portes, 2008).

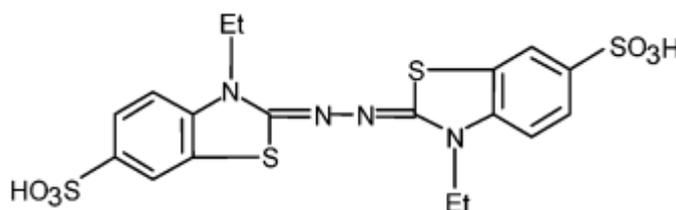


Figure 6 : Structure du radicale $ABTS^+$ (Marc *et al.* , 2004).



II.1.2. Le test DPPH :

Il est basé sur la dégradation du radical stable DPPH (Diphenylpicryl hydrazyl), de couleur violette. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron au radical synthétique pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune (**Figure 7**). La mesure de la décroissance de la coloration violette au cours du temps permet de déterminer la EC50, temps au bout duquel 50% du radical DPPH est réduit, ce paramètre a été introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs (**Molyneux, 2004; Ali et al., 2008**)

Le DPPH est insoluble dans l'eau, le degré de décoloration indique le potentiel « scavenger » de l'antioxydant (**Liu et al, 2004; Scalzo, 2008**).

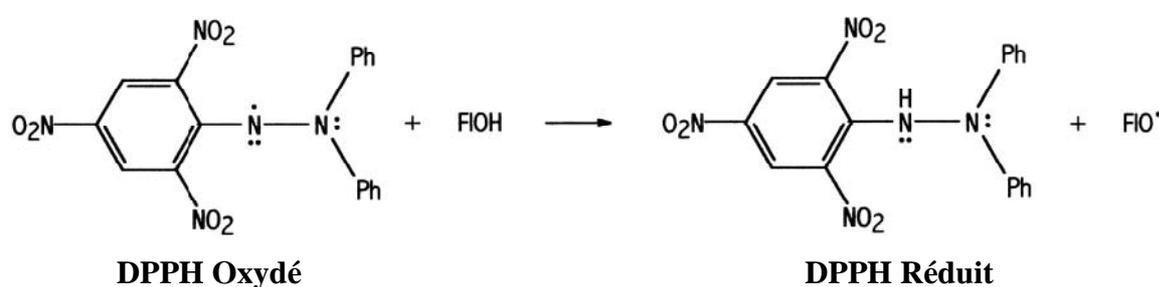


Figure 7 : Mécanisme de réduction du radical DPPH (Amié, 2003).

II.1.3. Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential):

Le pouvoir antioxydant d'une solution comme le plasma est déterminée par le test FRAP (**Figure 8**). Ce test est basé sur la capacité de l'antioxydant à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique (Fe^{+++} TPTZ) en sa forme ferreuse (Fe^{++} TPTZ) de couleur bleue avec un maximum d'absorbance à 593 nm. Comparé à un standard connu pour déterminer le niveau d'antioxydant, ce test est rapide et la réaction est indépendante de la concentration (**Griffin et Bhagooli, 2004; Portes, 2008; Benzie et Strain, 1996**).



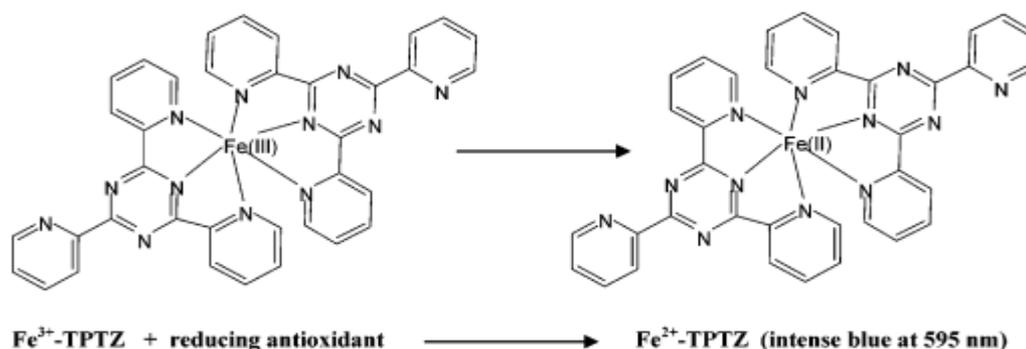


Figure 8: La réaction du test FRAP (Ronald *et al.* , 2005).

II.1.4. Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) :

Cette méthode mise au point par Cao et ses collaborateurs en 1993, est basée sur la décroissance de la fluorescence d'une protéine (fluorescéine) en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). L'antioxydant est capable de protéger la protéine et réduire la fluorescence, possède alors un pouvoir antioxydant et protège donc la protéine des dommages oxydatifs. Cette méthode est réalisée en microplaques dans lesquelles se mesure en parallèle le déclin de la fluorescence au cours du temps en présence de concentrations croissantes du Trolox et de l'échantillon à tester à différentes concentrations (Ali *et al.* , 2008; Rolland, 2004, Zulueta *et al.* , 2009).

II.1.5. La méthode de Co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique :

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco puis légèrement modifiée par Miller. Le β -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation, l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation. Cette méthode consiste à mesurer à 470 nm la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de dégradation de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène est assurée par le tween, l'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50°C) de manière non spécifique. L'addition de l'antioxydant induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène, cette méthode est sensible, rapide et simple (Laguerre *et al.* , 2007 ; Kouamé *et al.* , 2009, Portes, 2008).



II.1.6. Test TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity):

Cette méthode développée par Winston, utilise la réaction d'oxydation de l'acide 2-céto-4-méthiobutyrique (KMBA) en éthylène par un radical peroxy, ce radical est formé à partir de l'AAPH, la formation d'éthylène est mesurée par chromatographie gazeuse. Le pouvoir antioxydant d'un composé est évalué par sa capacité à inhiber la formation d'éthylène (Nadal, 2009).

II.1.7. Test à l'acide thiobarbiturique (TBA) :

Ce test est une des méthodes les plus utilisées pour mesurer la peroxydation lipidique. L'acide thiobarbiturique réagit avec le malondialdéhyde (MDA) sous-produit de la peroxydation lipidique pour former un composé coloré, le produit formé absorbe autour de 532-535nm. La mesure de l'absorbance permet donc de déterminer l'importance de la dégradation de lipides par les radicaux libres (Nadal, 2009).

II.2. Les méthodes chromatographiques :

Beaucoup de plantes médicinales possèdent une large gamme d'activités pharmacologiques et contiennent des composés actifs qui forment des mélanges complexes. Parmi les constituants majeurs on trouve les alcaloïdes, les polyphénols et les terpènes et des composés secondaires telle que les protéines, les sucres, les mucilages, les tanins ce qui rend l'isolement des composés difficile. Des techniques de séparation efficaces et sensibles sont donc nécessaire telles que HPLC, TLC, GC-MS...etc (Wen et al, 2004).

La découverte des techniques chromatographiques date du début de ce siècle, Le terme « chromatographie » a été utilisé pour la première fois par un botaniste russe M.S. Tswett lors d'une expérience de séparation de pigments végétaux en 1903. Ces techniques permettent la séparation et l'identification rapide des différents constituants d'une substance complexe (Doat, 1974 ; Bobbitt et al., 1972).

II.2.1. Définition :

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présent dans des mélanges dans le but d'identifier et de quantifier les composés au sein de l'échantillon, Quelque soit le genre de chromatographie effectué, la séparation est basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase



stationnaire et une force d'entraînement (due à la phase mobile) (**Rouessac et Rouessac, 2004**).

II.2.2. Classification des méthodes chromatographiques :

Les techniques chromatographiques peuvent être distinguées suivant plusieurs critères :

1- Classification selon la nature physique des phases : (Burgot et Burgot, 2006)

- Chromatographie liquide-liquide
- Chromatographie liquide-solide
- Chromatographie gaz-liquide
- Chromatographie gaz-solide

2- Classification selon le phénomène chromatographique mis en œuvre : (Vaumoron, 1981).

- ❖ Chromatographie d'adsorption
- ❖ Chromatographie de partage
- ❖ chromatographie échangeuse d'ion
- ❖ Chromatographie d'exclusion

3- classification selon le procédé opératoire :

- Chromatographie sur colonne
- Chromatographie sur papier
- Chromatographie sur couche mince

(**Mahuzier et Hamon ,1987**).



II.2.3. La chromatographie sur colonne :

La chromatographie sur colonne (**Figure 9**) est le procédé chromatographique le plus utilisé pour séparer des quantités importantes de composés. Si le mélange initial est complexe les fractions obtenues contiendront plusieurs solutés tandis que les mélanges les plus simples pourront être fractionnés en solutés purs par d'autres méthodes chromatographiques telle que la CCM. Dans toutes les applications de la chromatographie sur colonne, le mélange à séparer est introduit au sommet de la colonne constituée par un tube en verre fermé à une extrémité par un robinet. la colonne remplie soigneusement d'un adsorbant, on ajoute ensuite un solvant qui entraîne les constituants du mélange à des vitesses différentes selon leur nature vers le bas de la colonne et les fractions seront recueillies à la sortie de la colonne.

-la mise en œuvre d'une chromatographie sur colonne commence par le choix d'un système, on peut trouver un système de séparation approprié dans la littérature ou développer un système en modifiant légèrement une méthode publiée. Pour un système chromatographique donné, le pouvoir éluant dépend de la polarité du solvant (**Berthillier, 1972**).

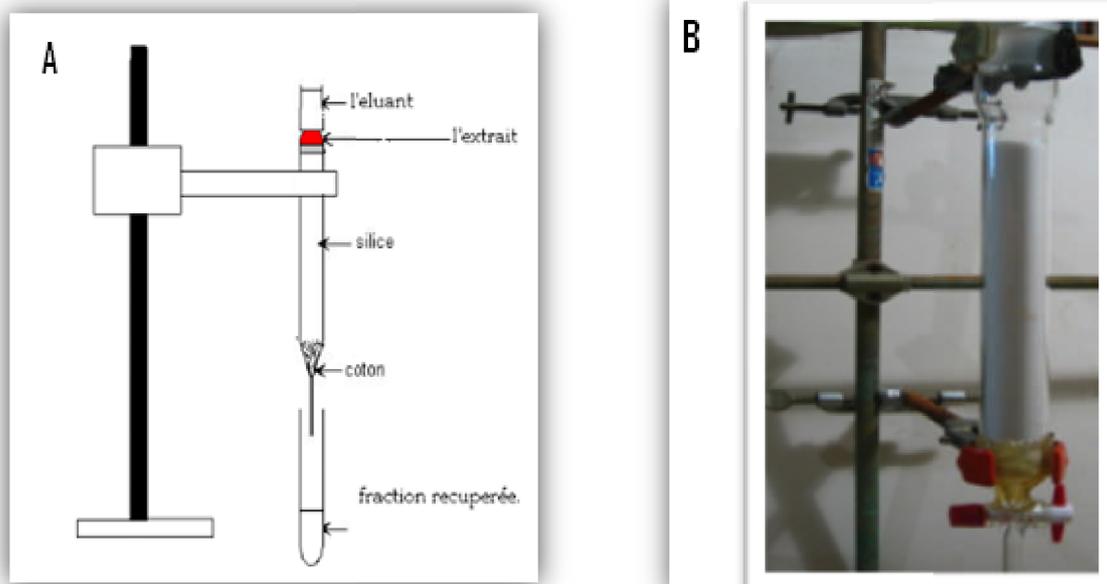


Figure 9: Dispositif de la chromatographie sur colonne (**Mendham et al. , 2005**).

A : Schéma explicatif ; B : Montage de la chromatographie sur colonne.



II.2.4. La chromatographie sur couche mince : (Figure 10)

Cette technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, est une des premières approches pour l'étude qualitative de la composition chimique d'un extrait et joue de ce fait un rôle primordiale dans l'identification de différentes substances. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption, il y a compétition entre les molécules de soluté et les molécules de la phase mobile pour l'occupation des sites à la surface de l'adsorbant (**Wen et al ., 2004**).

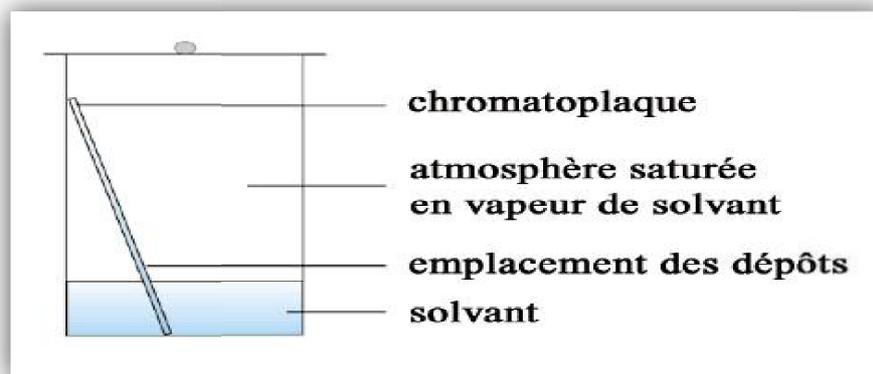
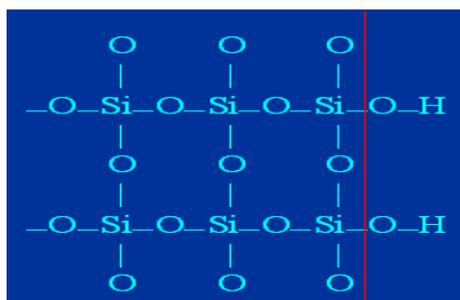
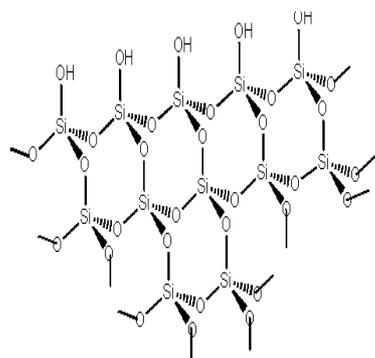


Figure 10 : Schéma d'une CCM (Siouffi, 2003).

- Le développement de la CCM dépend non seulement du choix de la phase mobile mais aussi du choix de la phase stationnaire (**Rouessac et Rouessac, 2004**). L'adsorption met en jeu des liaisons faibles et le pouvoir d'adsorption de la surface diminue de façon notable dès qu'une partie des sites d'adsorption sont occupés. Un faible recouvrement de la surface a pour conséquence une activité élevée des silanols libres ce qui entraîne des trainées des adsorptions, particulièrement avec les composés basiques (alcaloïdes) car ces derniers présentent des propriétés alcalines plus au moins marquées et forment des sels avec les acides et présentent une forte rétention sur la phase stationnaire polaire (silice).
- Le gel de silice « SiO_2 » présente une structure tétraédrique avec des pores de différentes dimensions et des groupements « Si-OH » (Silanol) fonctionnels (**Berthillier, 1972**). Constitue un des adsorbants les plus utilisés. Il forme des liaisons hydrogènes avec les substances polaires de l'échantillon grâce à ses groupements Si-OH de surface. (**Berthillier, 1972; Gremy et Letterrier, 1966**).



- Le mécanisme d'action du gel de silice repose sur l'adsorption, les solutés polaires sont retenus dans le gel grâce aux réactions avec les groupements silanol, contrairement aux solutés apolaires qui seront élués (**Vaumoron, 1981**).
- La structure du gel de silice et les groupements engagés dans les liaisons avec les composés a séparés sont portés sur la **figure 11**



Groupement de surface de SiO_2 impliqué dans la réaction

Figure 11 : Structure du gel de silice et groupements impliqués dans la réaction (**Burgot et Burgot, 2006**).

- Il existe une relation entre la nature ainsi que les substituants des composés chromatographiés. Le R_f d'un composé à l'état pur, ou présent dans un mélange est donc légèrement différent. Ce R_f varie aussi en fonction des conditions expérimentales (nature de la phase stationnaire et de l'éluant, température, humidité...etc) (**Rouessac et Rouessac, 2004 ; Sine, 2003**).

- **Dépôt de l'échantillon :**

On dépose un petit volume de l'échantillon en solution diluée à proximité du bord inférieur d'une plaque en verre de dimension (20cm x 20cm) avec comme phase stationnaire une couche d'adsorbant d'une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm. On trace un trait horizontal qui limitera la migration du solvant à une distance convenable du point de départ (**Rouessac et Rouessac, 1995**), la plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle dans laquelle se trouve l'éluant (**Mendham et al ., 2006**).



- **Développement des plaques :**

La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche entraînant à des vitesses différentes les constituants du mélange à séparer (**Sine, 2003**).

- **Révélation post-chromatographique :**

La révélation a pour but non seulement de rendre visible les taches formées mais encore de faciliter l'identification de ces substances. En effet l'emploi de réactifs spécifiques ou de procédés physiques convenables joint à la mesure du Rf (rapport frontal) fournit des indications sur la nature et la structure des composants de chaque tache. Une méthode de révélation simple est l'exposition à la lumière ultraviolette ou la pulvérisation par un réactif spécifique. L'identification de la substance peut se faire par comparaison avec le Rf d'un témoin (**Rouessac et Rouessac, 1995 ; Berthillier, 1972**).



Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

III. Matériels et méthodes

III.1. Matériels

III.1.1. Matériel Végétal

La partie aérienne (tige, feuilles, fleurs et fruits) de *Fumaria agraria* a servi comme matériel végétal pour notre étude. Nos échantillons ont été récoltés dans la région de Tinebdar à Sidi-Aich, Wilaya de Bejaia, durant la période de fructification et de floraison (Mars, 2010). L'identification est effectuée au laboratoire de biologie végétale de la FSNV de l'université Abderrahmane Mira-Bejaia.

III.1.1.1. Description botanique de *Fumaria agraria*

La fumeterre (**Figure 12**) est une plante dicotylédone de la famille des *Fumariaceae*. C'est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle. La description botanique de la plante est représentée dans le **Tableau V**.



Figure 12 : Photographie de *Fumaria agraria* Dans son environnement (Mars 2010, Sidi-aich)

Tableau V : Description botanique de la partie aérienne de *Fumaria agraria* (Susplugas *et al.*, 1975 ; Jauzein, 1995).

<i>Organe</i>	<i>Description</i>
Tiges	<ul style="list-style-type: none"> • Epais, longues, grimpantes, rameuses.
Feuilles	<ul style="list-style-type: none"> • Couleur verte, alternes pétiolées et composées.
Fleurs	<ul style="list-style-type: none"> • Volumineuses de plus en plus roses après fécondation, seuls les pétales latéraux sont à pointe pourpre.
Fruits	<ul style="list-style-type: none"> • Formés d'une capsule, très granuleux de plus de 2.4 mm de largeur.



III.1.1.2. Classification

Fumaria agraria est classée selon divers auteurs (**Preininger, 1986 ; Salinas et al., 2003**) comme suit :

Règne Plantae

Sous règne : Cormophytes

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Papavérales

Famille : *Fumariaceae*

Genre : *Fumaria*

Espèce : *Fumaria agraria*

III.2. Matériel et réactifs

Le matériel et réactifs utilisés pour l'extraction et la séparation des composés phénoliques et des alcaloïdes ainsi que l'étude de l'activité antioxydant sont reportés en annexe (**Annexe**).

III.3. Méthodes

III.3.1. Préparation de la poudre végétale

Les échantillons de *Fumaria agraria* sont bien lavés à l'eau courante afin d'éliminer la poussière et toutes particules, puis séchés à l'étuve à **40° C** pendant huit jours. Le séchage permet un meilleur broyage et par conséquent une meilleure extraction (**Debuigne, 1991**). La plante est ensuite réduite en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique « **KIKA Labortechnik** ».



III.3.2. Teneur en eau (Méthode gravimétrique) :

- **Principe** : c'est une méthode pondérale qui consiste en la détermination de la perte en masse d'une quantité connue de poudre par dessiccation à l'étuve à une température de 103°C pendant 24 heures.
- **Mode opératoire** :

5 prises d'essai (2 g) ont été introduites dans 5 verres de montre préalablement tarés (T_1 à T_5) de masse totale de (M'_1 à M'_5) avant de les mettre à l'étuve à 103° C pendant 24h après ce temps nous les avons pesés de nouveau (M''_1 à M''_5).

La masse d'eau (Me) contenue dans la poudre de chaque verre de montre est donnée par la formule suivante : $Me = M' - M''$

La masse de la prise d'essai- : $MPE = M' - T$

Le pourcentage d'eau contenue dans la poudre est donné par la formule suivante :

$$\% = \frac{Me}{MPE} \times 100$$

III.3.3. Extraction des alcaloïdes et des composés phénoliques de *F. agraria*

Afin d'extraire et de déterminer la teneur en alcaloïdes et en composés phénoliques de notre plante, une extraction solide liquide sous « Soxhlet » a été effectuée en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction (**Figure 13**) (**Houghton et Raman, 1998**).



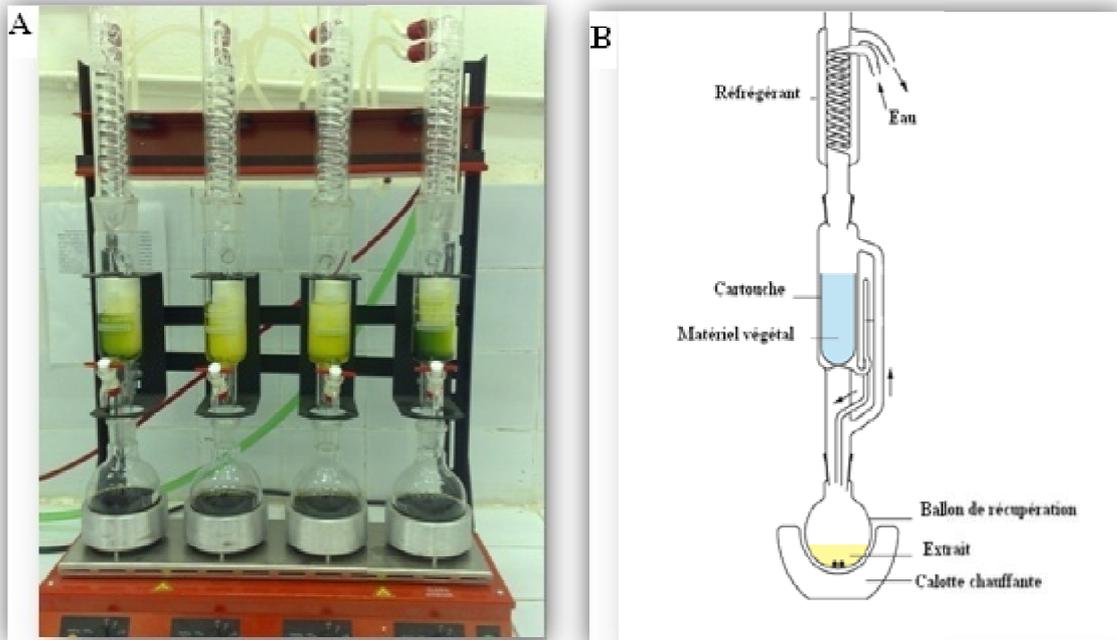


Figure 13: Rampe d'extraction par Soxhlet à plusieurs postes

A : Dispositif utilisé pour l'extraction (Laboratoire de biologie moléculaire-FSNV-UAMB).

B : Schéma descriptif du système d'extraction au Soxhlet (Houghton *et* Raman, 1998).



III.3.3.1. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction des alcaloïdes de la partie aérienne de *F. agraria* à été effectuée suivant le protocole schématisé sur la **Figure 14** (Suau et al., 2002).

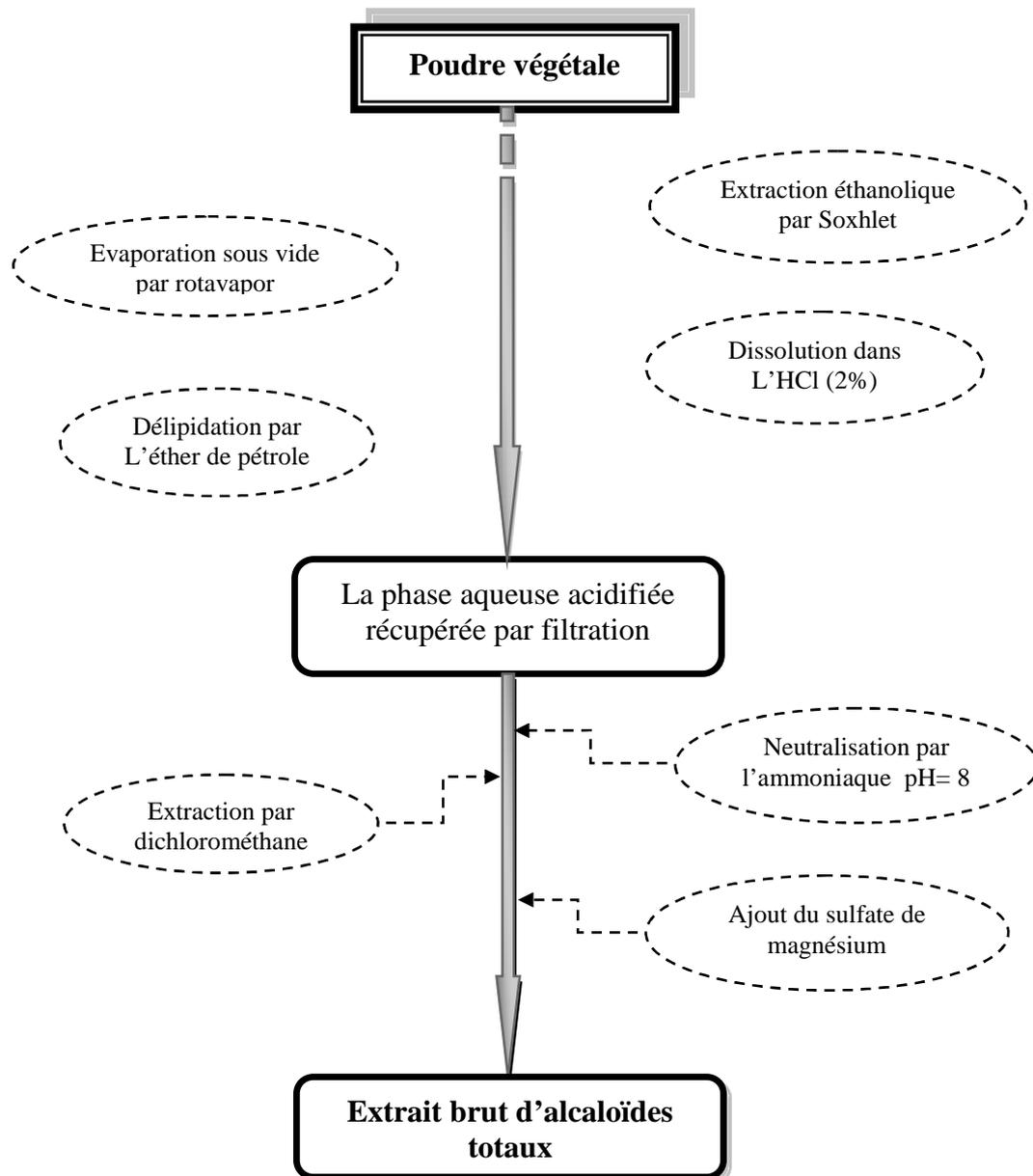


Figure 14 : Schéma du protocole d'extraction des alcaloïdes totaux (Suau et al., 2002).



III.3.3.2. Fractionnement des alcaloïdes de *F. agraria*

Le fractionnement des alcaloïdes a été effectué selon le protocole de **Shakil (1998)** suivant le schéma illustré sur la **Figure 15**.

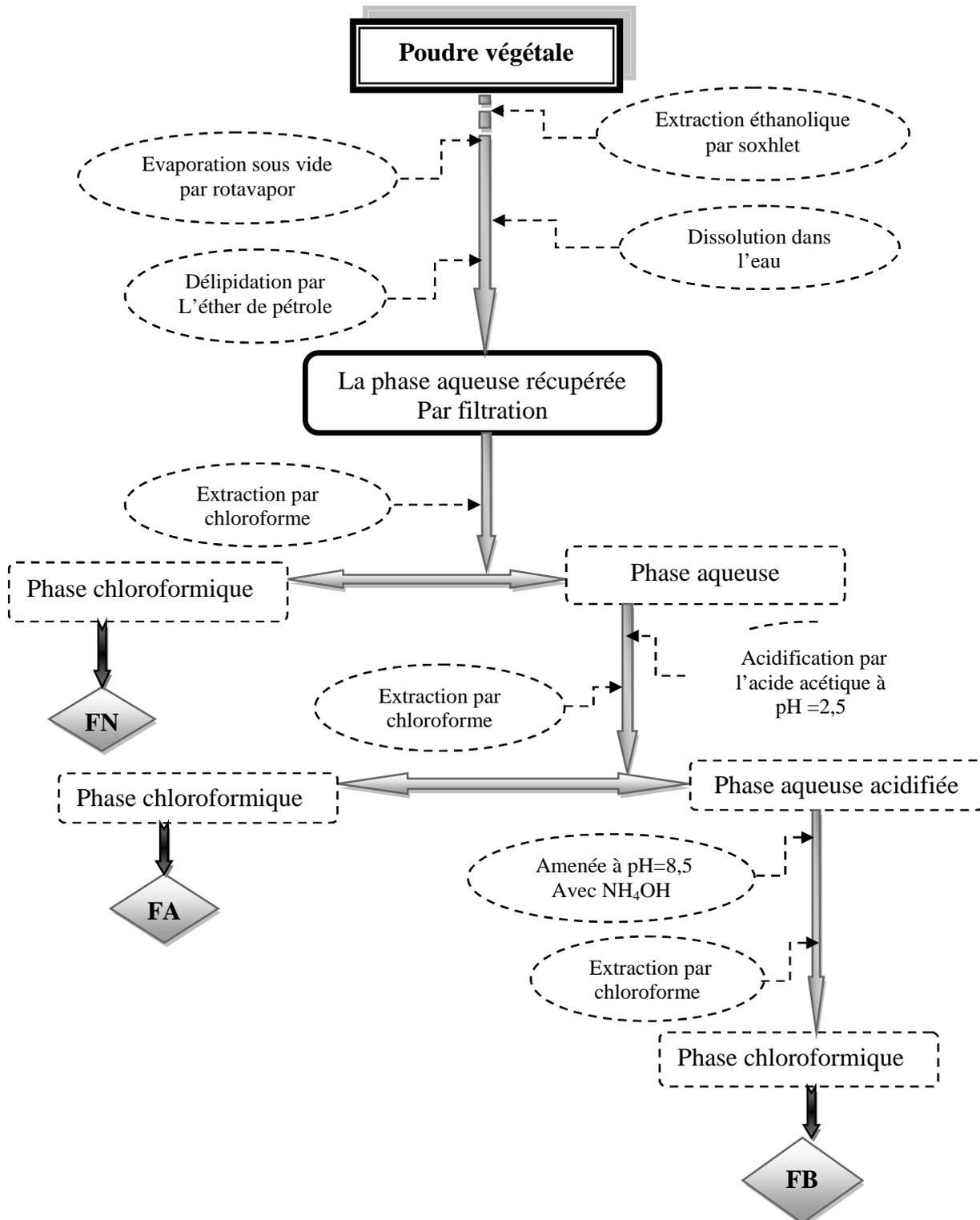


Figure 15 : Schéma du protocole d'extraction des différentes fractions d'alcaloïdes de *Fumaria agraria* (Shakil, 1998).



III.3.3.3. Extraction des composés phénoliques :

L'extraction des composés phénoliques est réalisée selon le protocole décrit par **Farzana** et ses collaborateurs (1997). La **Figure 16** résume les différentes étapes de l'extraction.

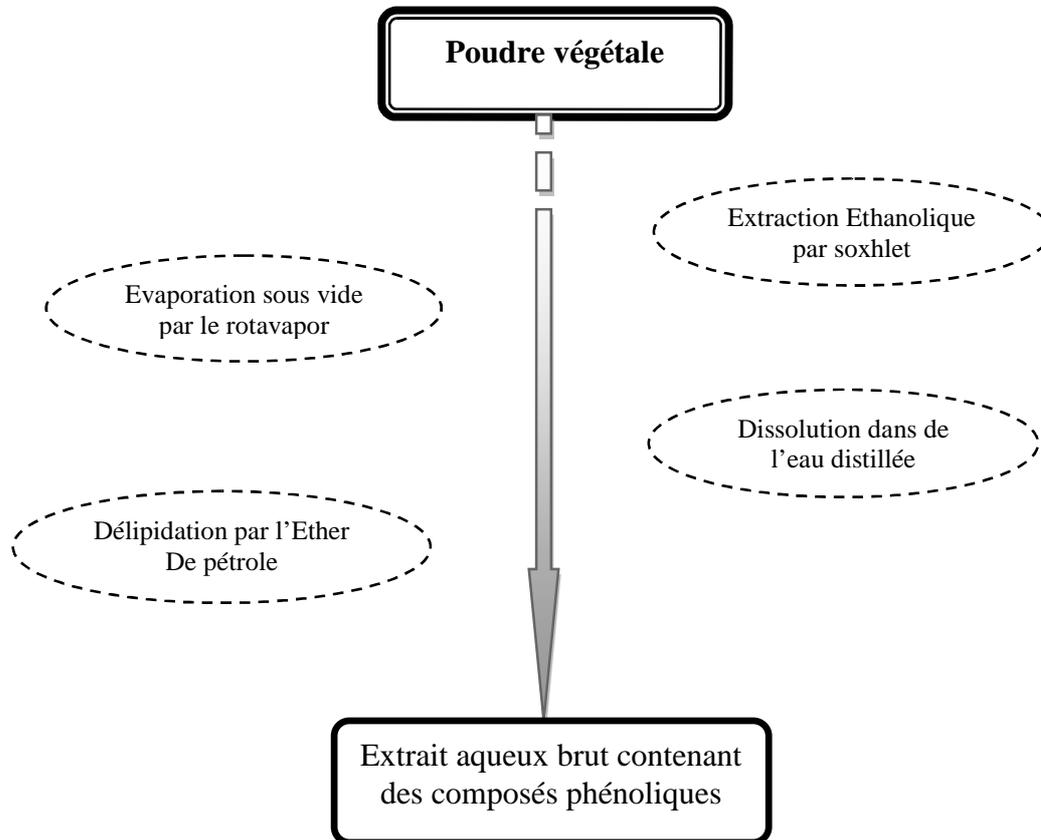


Figure 16: Schéma du protocole d'extraction d'extrait brut contenant les composés phénoliques (Farzana, 1997).



III.3.3.4.Extraction des acides phénoliques :

On a procédé à l'extraction des acides phénoliques en utilisant le protocole de **Sousek et al. (1999)**.

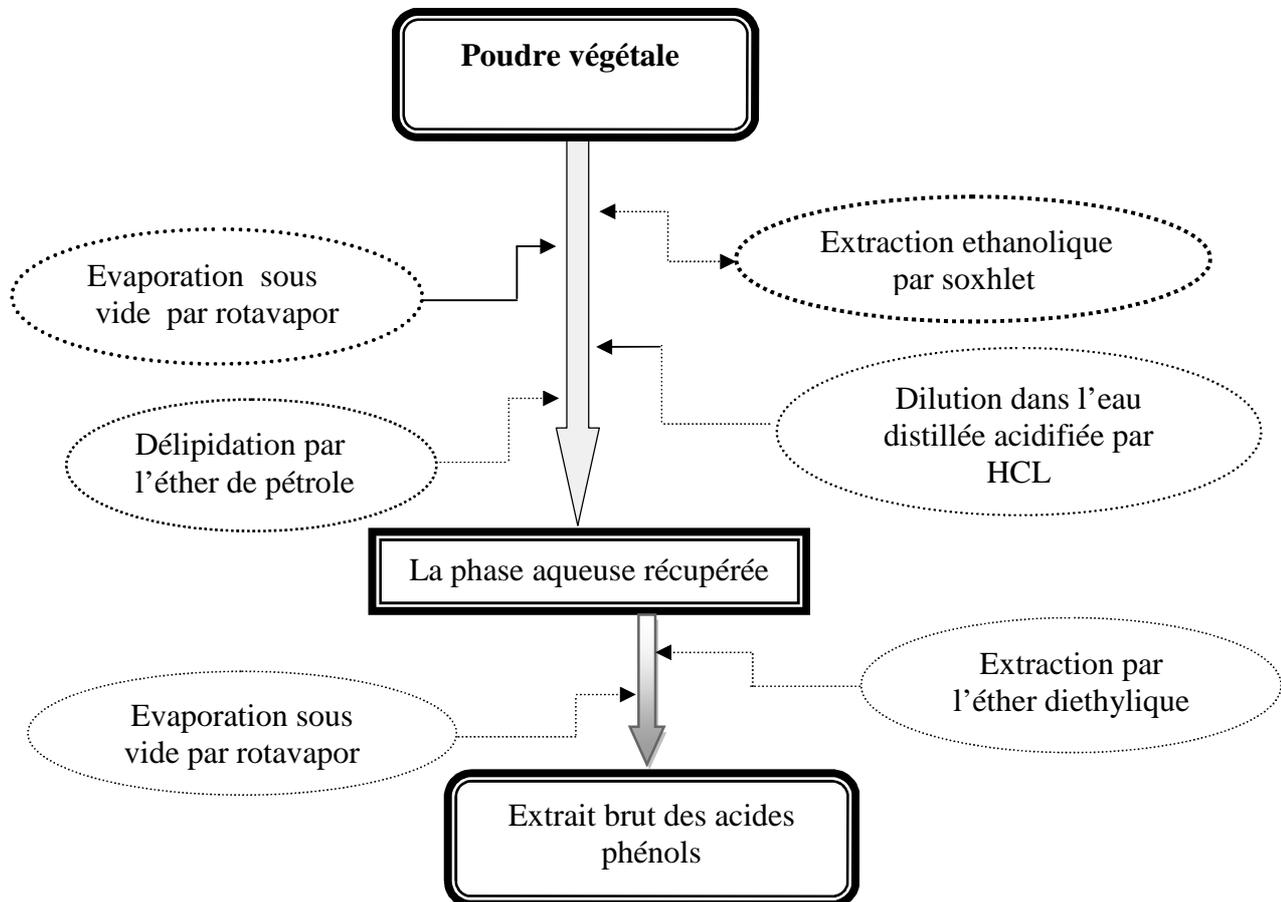


Figure 17 : protocole d'extraction des acides phénols (Sousek et al., 1999).



III.4. Taux d'extraction des alcaloïdes et des composés phénoliques

Les fractions alcaloïdiques (**FN**, **FA** et **FB**), les alcaloïdes totaux (**AT**) et l'extrait des composés phénoliques (**ECP**), sont préalablement filtrées dans une capsule tarée (de masse **M**) ; après évaporation totale des solvants la capsule est pesée de nouveau (de masse **M'**). La masse d'alcaloïdes (**MA**) et des composés phénoliques (**MCP**) est déterminée par la formule suivante :

$$\begin{aligned} \mathbf{MA} &= \mathbf{M}' - \mathbf{M} \\ \mathbf{MCP} &= \mathbf{M}' - \mathbf{M} \end{aligned}$$

Le pourcentage des composés phénoliques (**PC**) et d'alcaloïdes (**PA**) est calculé comme suit :

$$\begin{aligned} \mathbf{PC} &= 100\% \times \frac{\mathbf{MC}}{\mathbf{PE}'} \\ \mathbf{PA} &= 100\% \times \frac{\mathbf{MA}}{\mathbf{PE}} \end{aligned}$$

PE' : masse de la prise d'essai (**30g**) pour les composés phénoliques.

PE : masse de la prise d'essai (**60g**) pour les alcaloïdes.



III.5. Dosage des substances actives :

III.5.1. Dosage des composés phénoliques :

- **Principe :**

Le réactif de Folin Ciocalteu, mélange des acides phosphotungstique ($H_3P_{12}W_{12}O_{40}$) et phospho-molybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Ribéreau- Gayon, 1968, Tanguy, 1971).

- **Mode opératoire :**

La teneur en composés phénoliques est estimée selon la méthode de **Singleton et Rossi (1965)** in **Sousek *et al.* (1999)** (Figure 18).

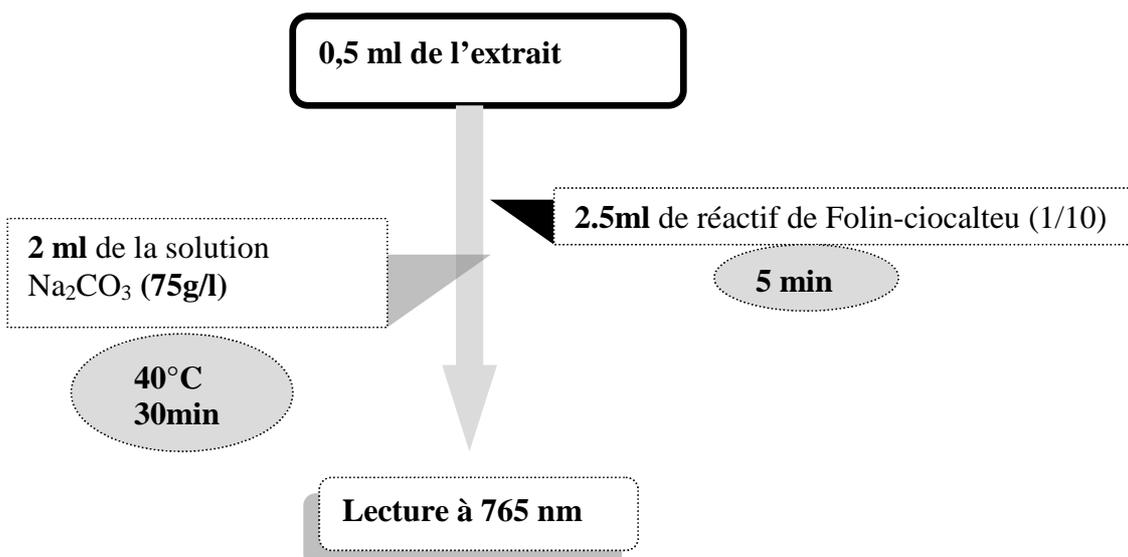


Figure 18: Protocole de dosage des composés phénoliques (Sousek *et al.*, 1999).

- ❖ Le blanc est préparé de la même façon en remplaçant l'extrait par le solvant.
- ❖ La concentration des composés phénoliques dans l'extrait de notre plante est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant **l'acide gallique** comme standard.



III.5.2. Dosage des flavonoïdes :

L'estimation quantitative des flavonoïdes (**Figure 19**) présents dans l'extrait de notre plante est réalisée selon la méthode colorimétrique de **Quettier-Deleu *et al.*, 2000 in Djeridane *et al.*, 2006]**

- **Principe**

Le principe est basé sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium qui a un maximum d'absorbance à 430 nm.

- **Mode opératoire :**

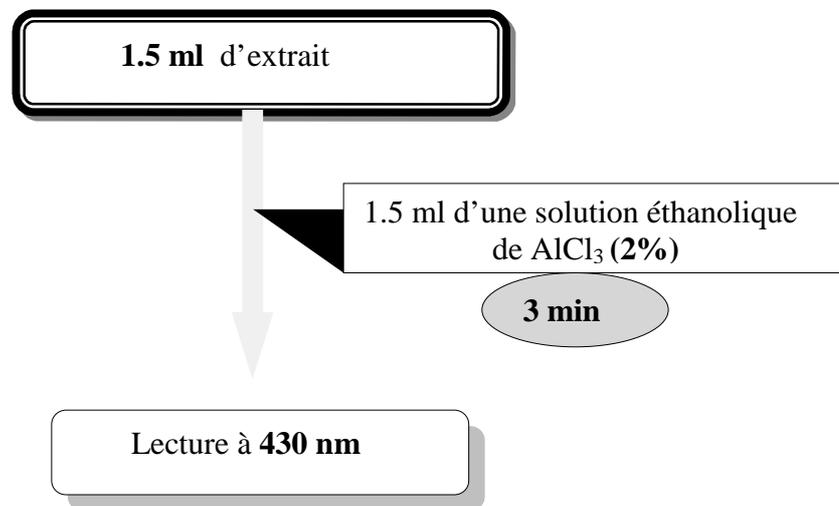


Figure 19 : protocole de dosage des flavonoïdes (**Djeridane *et al.*, 2006**).

- ❖ Le blanc est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant.
- ❖ La concentration des flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant **la quercétine** comme standard.

III.6. Détermination de l'activité antioxydant :

III.6.1. Mesure du pouvoir réducteur :



❖ Principe :

Le pouvoir réducteur est déterminé par la méthode de **Oyaisu et al. (1986)** in **Amaroweiz et al. (2004)**. Ce test est basé sur la capacité de l'antioxydant présent dans l'extrait à réduire le fer ferrique Fe^{+++} (FeCl_3) en fer ferreux Fe^{++} (FeCl_2) en présence d'un agent chromogène le ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. L'intensité du complexe de couleur bleu, avec un maximum d'absorbance à **700nm**, est proportionnelle à la concentration en antioxydant. Le mode opératoire est résumé sur la **Figure 20**.

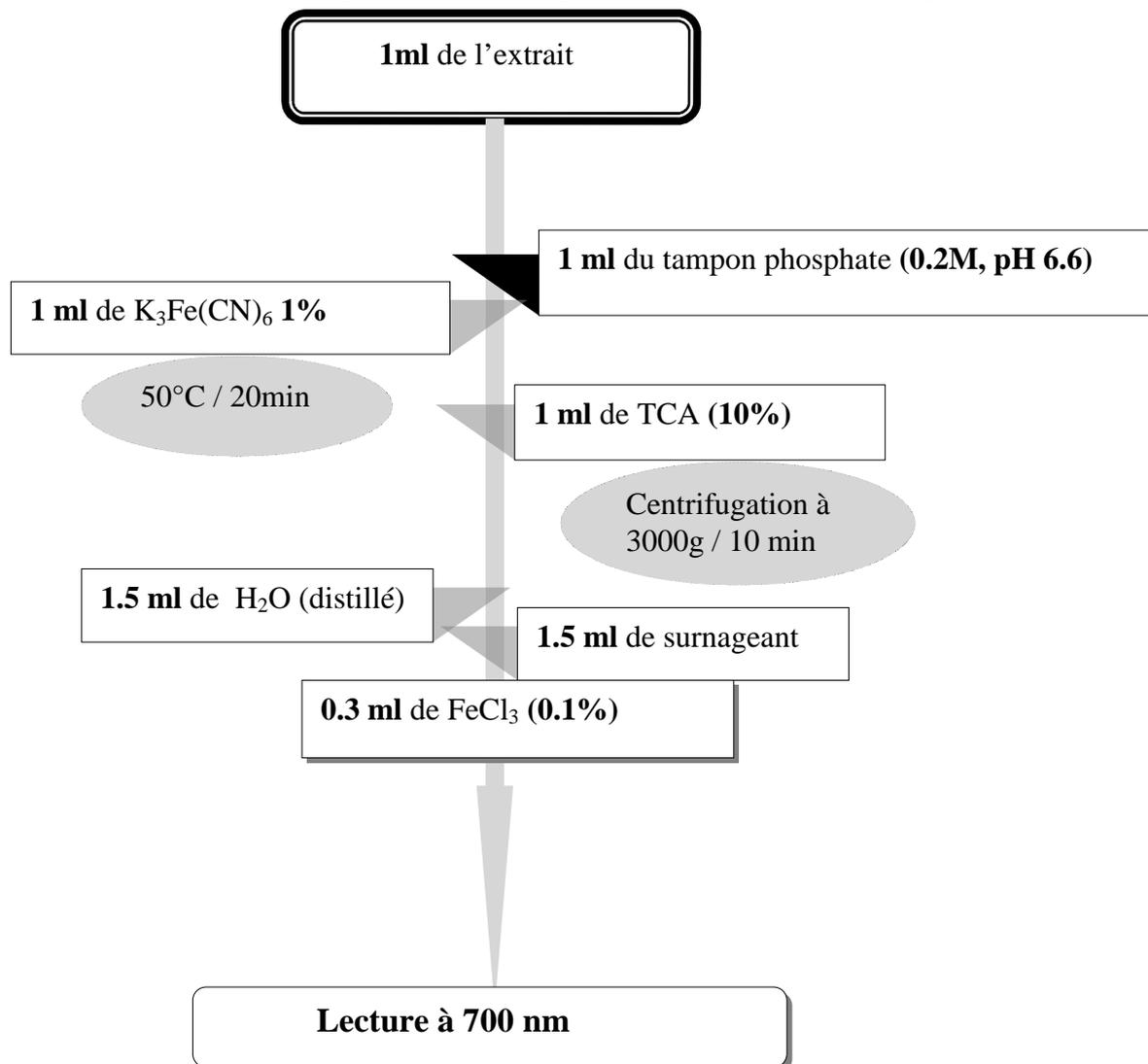


Figure 20 : Détermination du pouvoir réducteur (Amarowicz et al., 2004).

- Le blanc est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant.



III.6.2. Activité scavenging du radical DPPH :

❖ Principe :

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

Le mode opératoire est résumé sur la figure 21 :

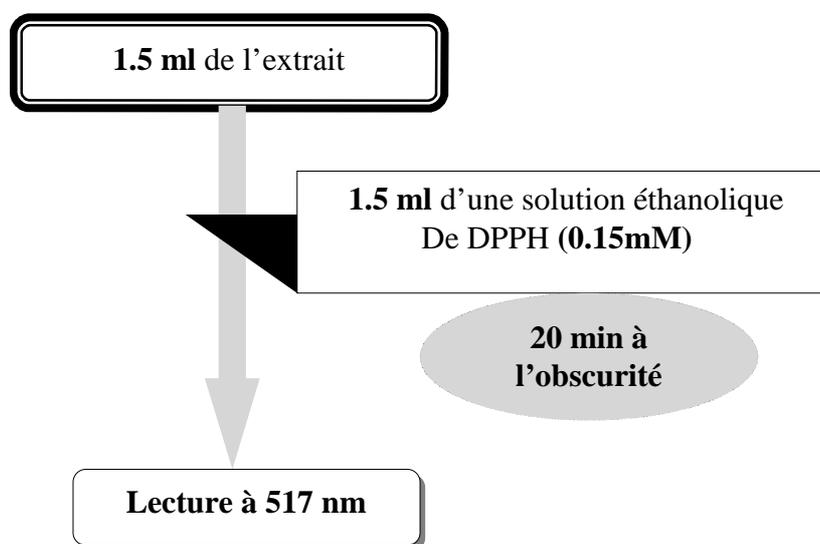


Figure 21 : Le protocole d'étude de l'activité scavenging du DPPH (**Shirwaikar et al., 2006**)

- **Le blanc** est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant.
- Le pourcentage **scavenging** est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ scavenging du radical DPPH} = (A_b - A_e / A_b) \times 100$$

- A_b : absorbance du blanc
- A_e : absorbance en présence de chaque concentration d'extrait.



III.7. Séparation et caractérisation des composés phénoliques et des alcaloïdes par chromatographie sur colonne couplée à une CCM

Les fractions d'alcaloïdes (**FN, FB, FA**) et l'extrait brut des composés phénoliques (**ECP**) obtenus sont soumis à un fractionnement sur colonne, les fractions obtenues sont par la suite analysées par chromatographie sur couche mince.

III.7.1. Préparation de la colonne et fractionnement :

La silice de chromatographie sur colonne a été préparée dans le solvant le plus apolaire des systèmes d'élution. Les systèmes employés pour la séparation sont indiqués dans les Figures 22 à 28. Les échantillons à fractionner (**20 mg/ml**) sont déposés soigneusement en haut de la phase stationnaire, la progression de la phase mobile (sous pression atmosphérique) entraîne avec elle les différentes fractions. Ces dernières ont été recueillies progressivement avec une élution de polarité croissante. Les fractions récupérées, séchées à **40°C**, ont fait l'objet d'une analyse par **CCM**.

III.7.2 Analyse et séparation des fractions obtenues de la chromatographie sur colonne par chromatographie sur couche mince (CCM).

Pour cette analyse, nous utilisons des plaques de Silica gel 60 F₂₅₄ préparés au laboratoire sur un support en verre (**20 cm x 20cm**) (**Wall, 2005**). Les plaques du gel de silice nécessitent une réactivation pendant 30 min à 100°C avant le dépôt des échantillons et l'élution. Cette réactivation consiste à la polymérisation du gel et l'activation des groupements fonctionnels pour favoriser les liaisons avec les constituants de l'échantillon afin de les bien séparer (**Berthilier, 1972**).

Celles-ci sont développées dans des cuves en verre conventionnelles, dont l'atmosphère est préalablement saturée en vapeurs de la phase mobile pour une meilleure élution.

Les échantillons à analyser ainsi que les standards sont appliqués en petits spots sous forme de points (**10µl**) sur l'adsorbant (une couche de gel de silice à **0.5 mm** d'épaisseur) suivis d'une évaporation pour éliminer le solvant. Les plaques sont déposées verticalement dans la cuve contenant la phase mobile.



- Les systèmes de solvants employés comme éluant dans notre étude sont représentés dans les figures 22 à 28.

Les abréviations employés dans cette partie sans définies comme suit :

CC : Chromatographie sur colonne

- ✓ **FN₁, FN₂** : Les sous fractions de la fraction FN récupérées après CC.
- ✓ **FA₁, FA₂, FA₃** : Les sous fractions de la fraction FA récupérées après CC
- ✓ **FB₁, FB₂, FB₃** : Les sous fractions de la fraction FB récupérées par CC.
- ✓ **ECP**: Extrait composés phénoliques brut (avant la séparation sur colonne).
- ✓ **F₁, F₂, F₃, F₄**: Les sous fractions de (ECP récupérées par CC).

- **Les standards** : Nous avons utilisé comme témoins différents standards

➤ Pour les composés phénoliques :

- L'acide caféique
- L'acide gallique
- L'acide fumarique
- La quercétine
- La rutine
- L'acide 4 hydroxy benzoïque
- L'acide p-coumarique
- La catéchine
- La naringénine

➤ Pour les alcaloïdes :

- La berbérine
- La scopolamine
- La trihydropalmitine
- La boldine
- La coridaline
- La palmitine

- **La révélation** :

Après développement, les plaques sont séchées, puis visualisées séparément par deux systèmes de révélation (**Mendham et al., 2005**). :

1) Révélation physique sous lampe UV à **254 nm** et à **365 nm**.

2) Révélation chimique par la pulvérisation d'une solution aqueuse du réactif de Dragendorff pour la détection des alcaloïdes, et de la vanilline sulfurique pour la détection des composés phénoliques.



Les rapports frontaux (**Rf**) des spots issus de la séparation sont calculés selon la formule ci-dessous (**Sine, 2003**), et comparés à ceux des témoins permettant ainsi la caractérisation des constituants des différents extraits.

$$Rf = \frac{\text{La distance parcourue par le substance}}{\text{La distance parcourue par le solvant}}$$

III.8. Etude statistique :

Une étude statistique à été réalisée pour la comparaison des résultats. Le calcul de la moyenne et de l'écart type sont réalisés avec l'Excel 2007, le test ANOVA de la variance à un et à deux facteurs sont effectués avec le logiciel Statistica 5.5 et le seuil de significativité est fixé à $p < 0.05$. Toutes les données représentent la moyenne de trois essai



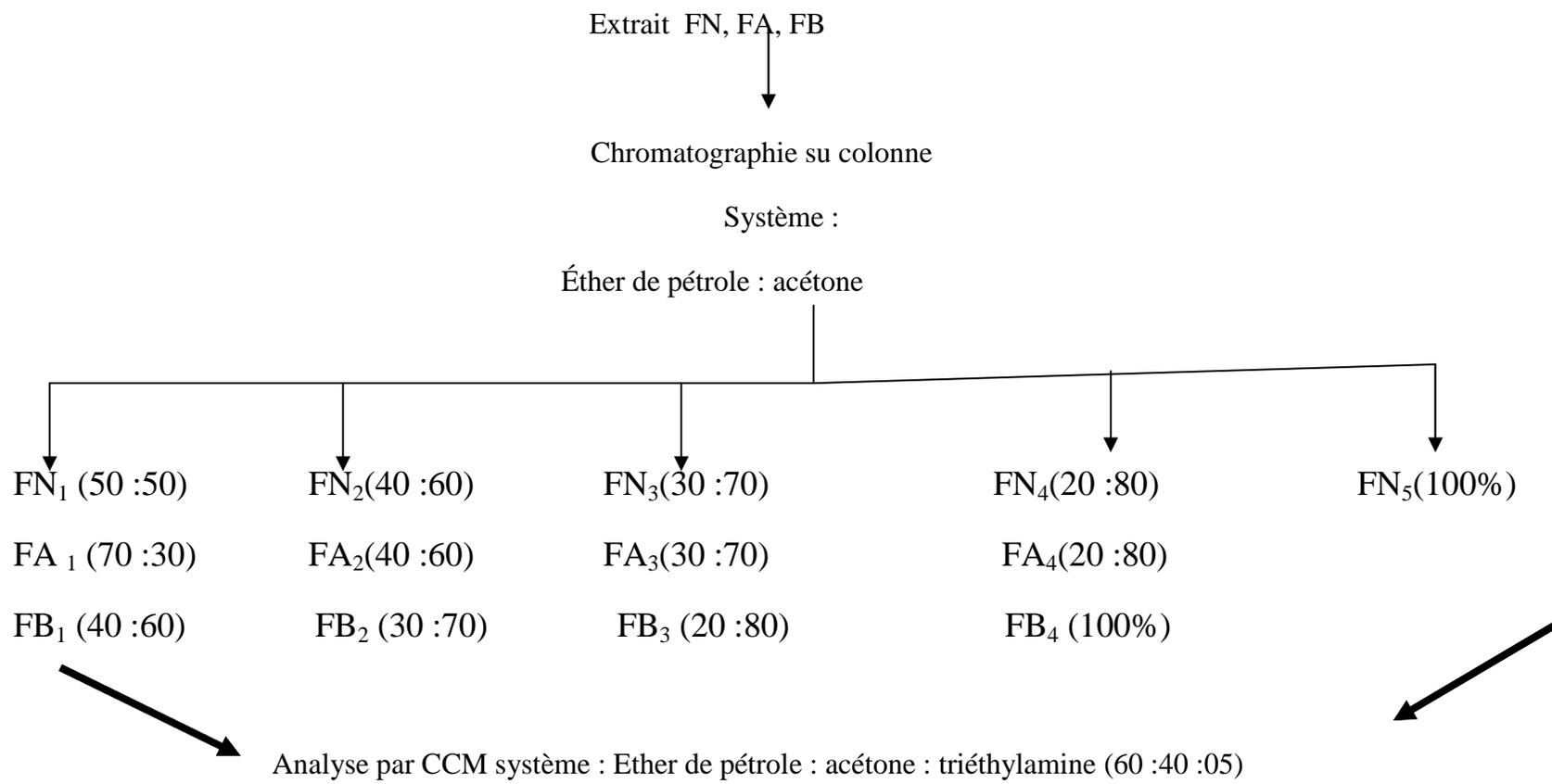
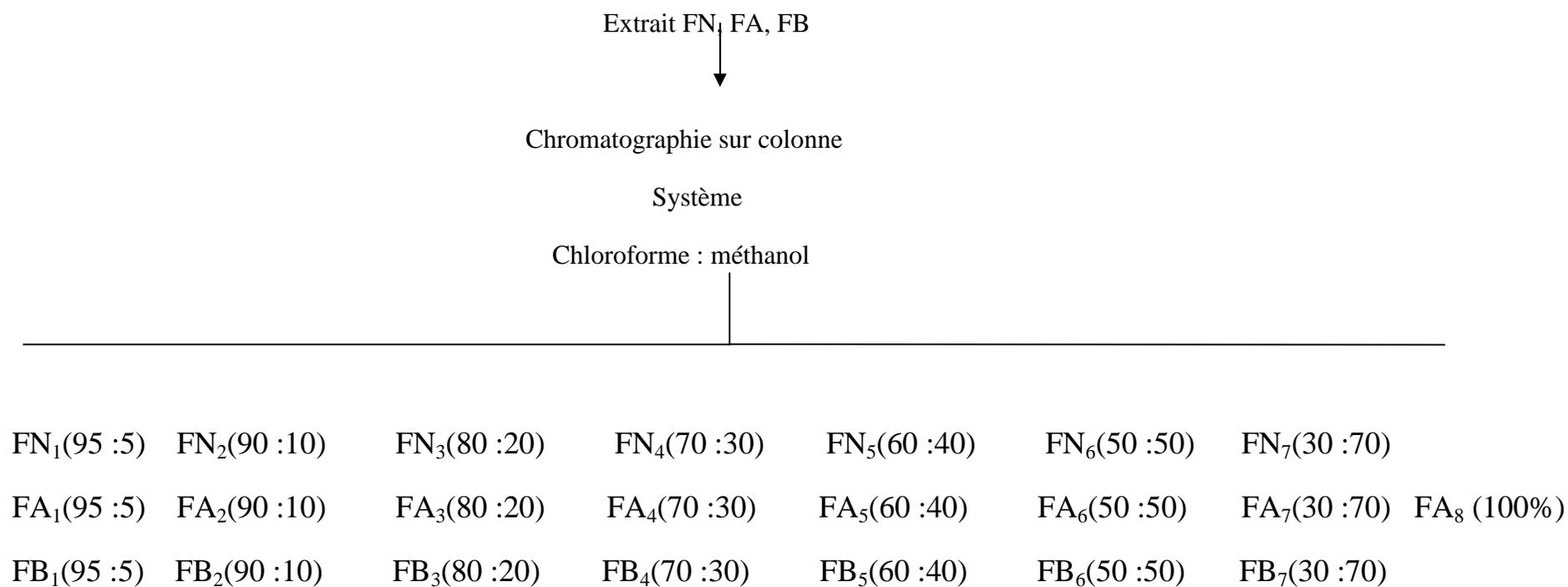


Figure 22 : Le système n° 01 de séparation des fractions alcaloïdiques (Shakil, 1998).



Analyse par CCM système : Chloroforme : Méthanol : NH₄OH (80 :20 :0.2)

Figure 23 : Le système n°02 de séparation des fractions alcaloïdiques (Shakil ,1998).

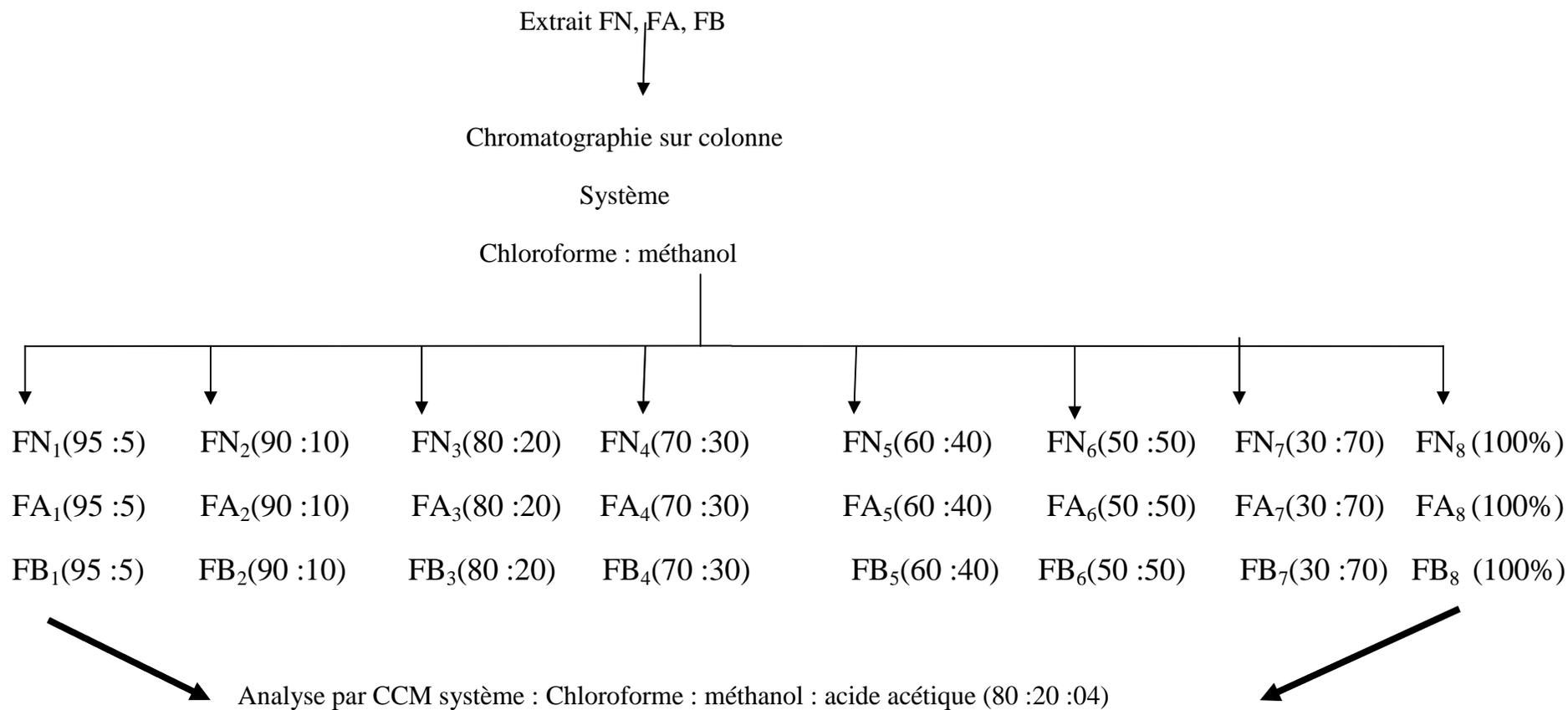


Figure 24 : Le système n°03 de séparation des fractions alcaloïdiques (Kupelie *et al*, 2002).

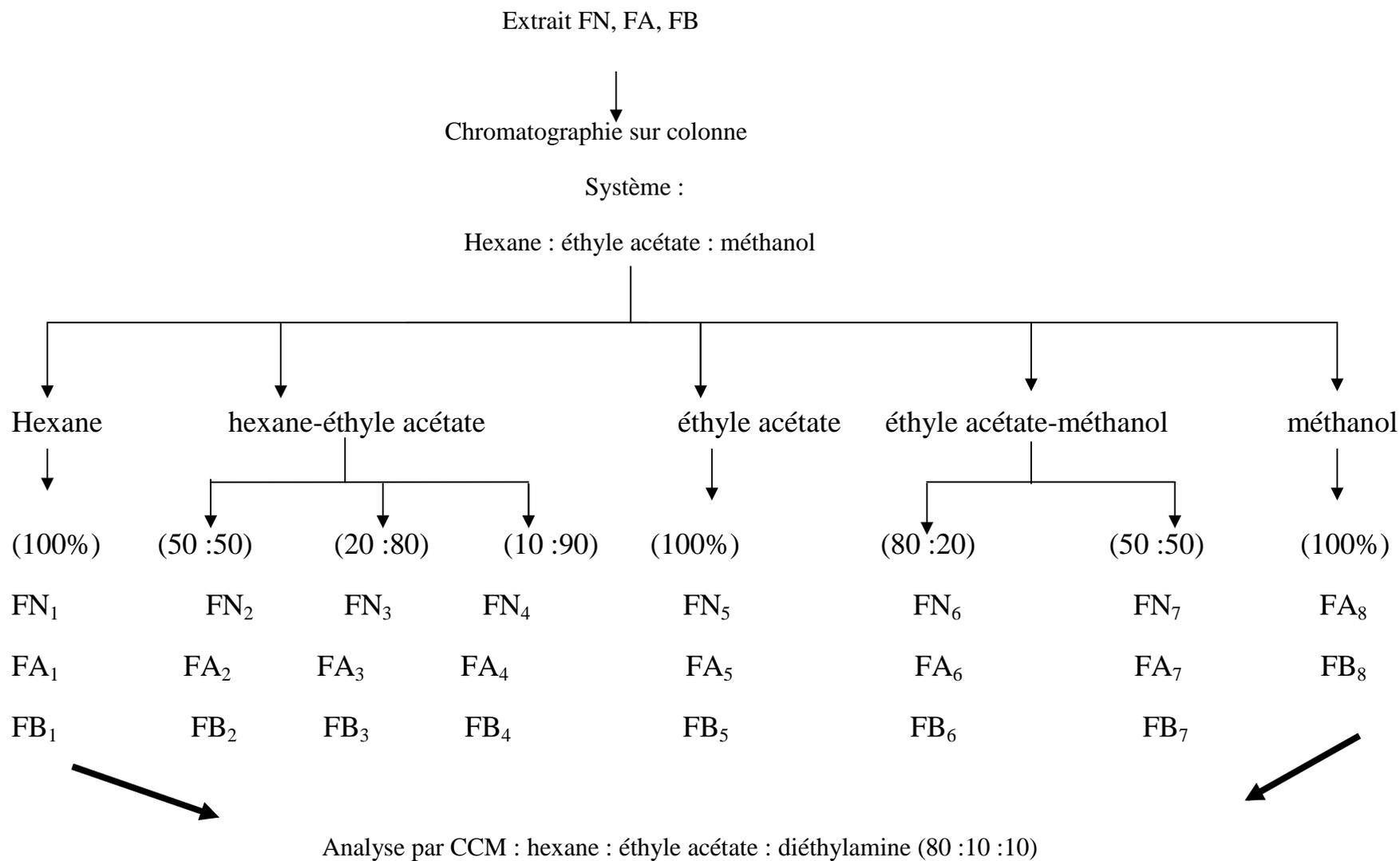


Figure 25 : Le système n°4 de séparation des fractions alcaloïdiques (Perez *et al*, 2004)

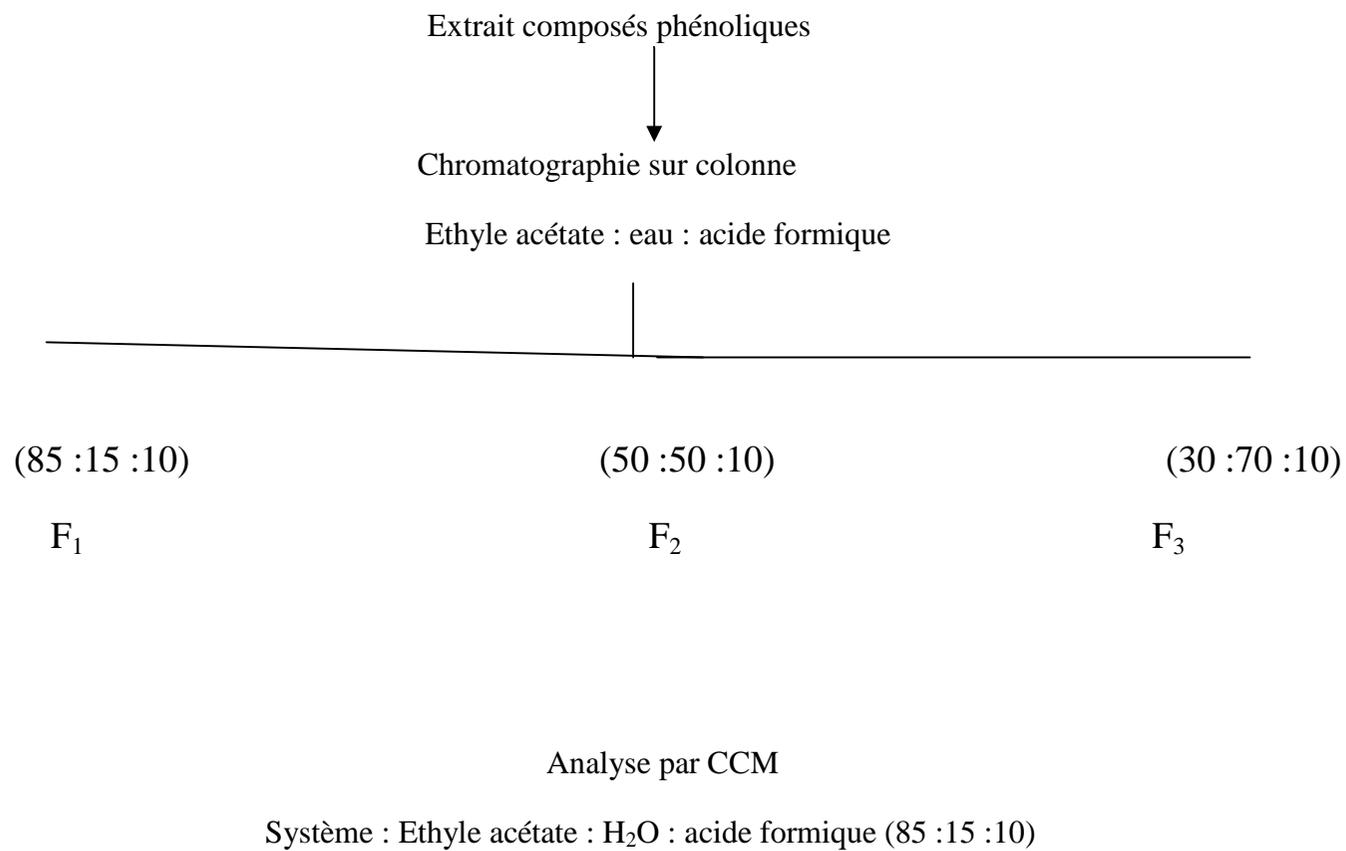


Figure 26 : Le système n°1 de séparation des composés phénolique (Soares *et al*, 2009).

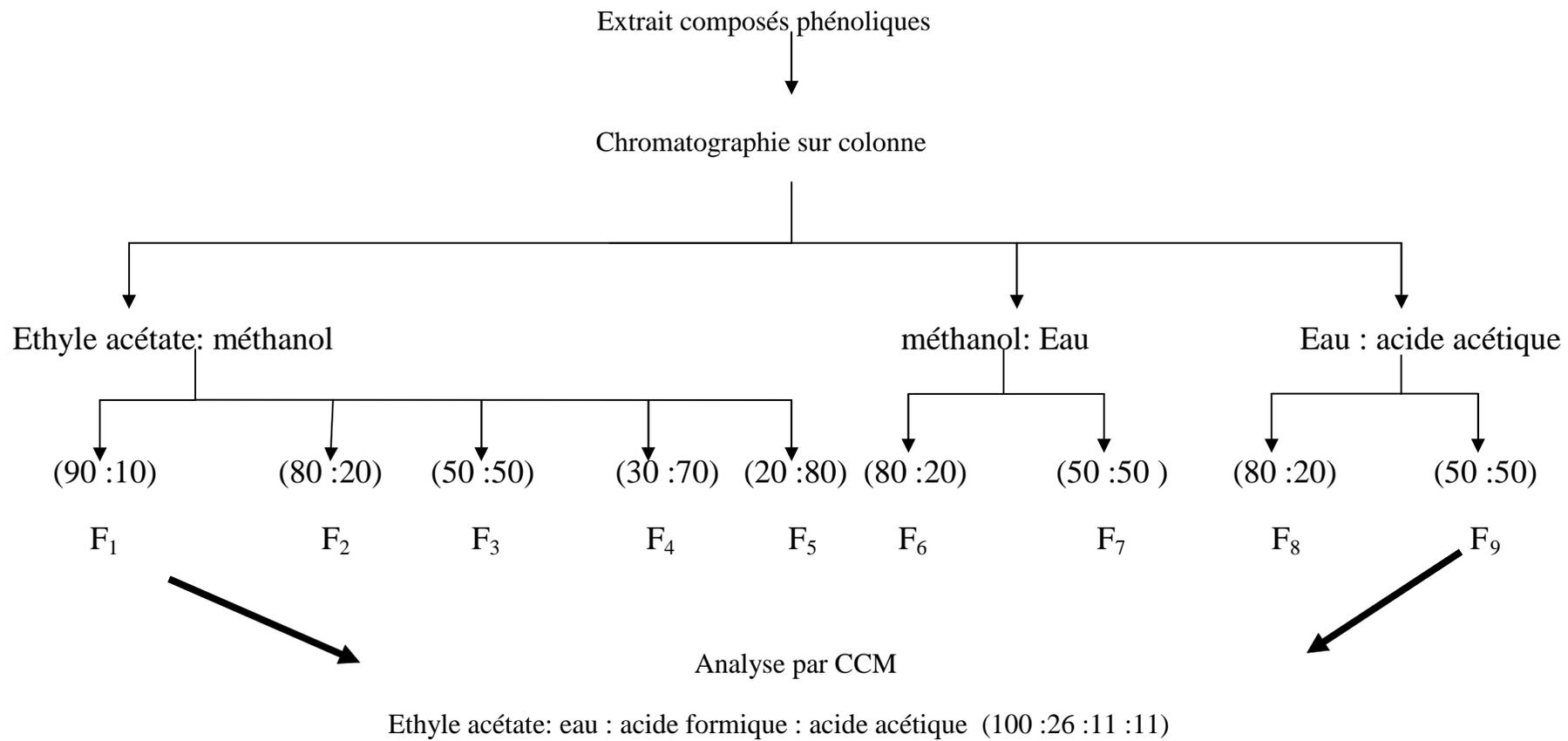


Figure 27 : Le système n°2 de séparation des composés phénolique (Sharififar *et al*, 2009).

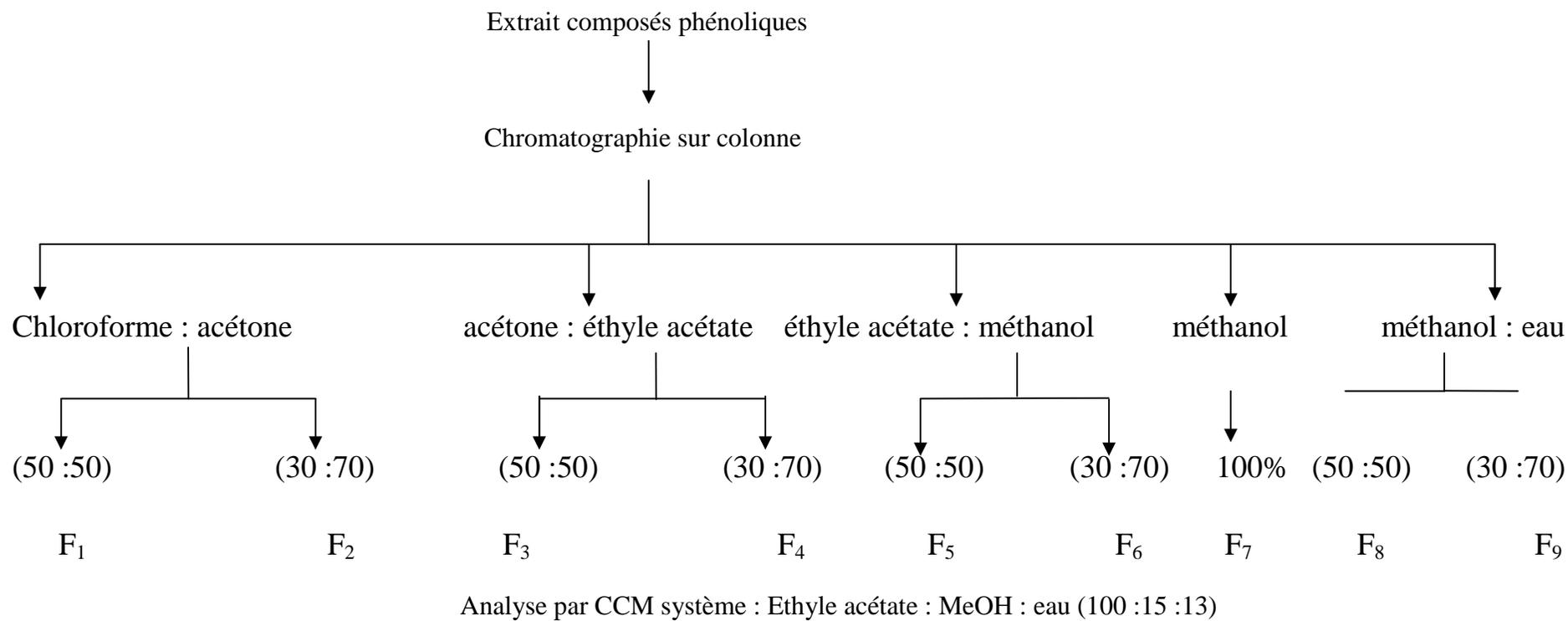


Figure 28 : Le système n°3 de séparation des composés phénolique (Ammar *et al*, 2009).

Résultats et discussions

IV. Résultats et discussion :

IV.1. Teneur en eau :

Sur le **tableau VI** sont reportés les taux d'humidité calculés sur plusieurs échantillons de matière sèche (plante après dessiccation). Le taux moyen enregistré de **7.8%** est favorable à une bonne conservation de la poudre végétale car, un taux d'humidité inférieur à **10%** permet non seulement une meilleure conservation de la drogue (**Souley Amadou, 2005**) mais aussi une protection de ses principes actifs. (**Timbo, 2003**).

Tableau VI : Taux d'humidité moyens des échantillons de la poudre végétale obtenue par broyage et séchage de la partie aérienne de *Fumaria agraria*

Echantillons (g)	Pourcentage Eau %
1	8
2	7.5
3	7.5
4	8
5	8
Taux moyen	7.8

IV.2. Taux d'extraction des alcaloïdes et des composés phénoliques :

IV.2.1. Taux d'extraction des alcaloïdes :

Sur le **tableau VII** sont reportés les taux d'extraction en alcaloïdes enregistrés au niveau de l'extrait total et des différentes fractions obtenues ; FN fraction chloroformique initiale ; FA fraction obtenue par épuisement de la FN et la FB obtenue par neutralisation de la phase aqueuse acidifiée de la FA.



Tableau VII : Le taux d'extraction des différents extraits de *Fumaria agraria*

Extrait	Rendement en pourcentage %
Alcaloïdes totaux (AT)	0,8
Fraction FN	0,4
Fraction FA	0,04
Fraction FB	0,25

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

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

Considérant la diversité et les propriétés structurales complexes des alcaloïdes et des composés phénoliques, il est difficile de mettre au point des méthodes exhaustives pour leurs extractions (Vercautern et al., 1998). Le type de solvant, la taille des particules et l'état du matériel végétal (sec ou frais) sont des conditions influençant significativement le taux et la nature des composés extraits (Mbodj, 2003 ; Naczka et Shahidi, 2006).

La différence quantitative et qualitative du contenu alcaloïdique des plantes peut être due à divers facteurs tels que le climat et la composition du sol. Elle dépend également de la saison végétative (Grycova et al., 2007).

Le taux d'extraction des alcaloïdes totaux et celui des fractions alcaloïdiques a été calculé par rapport à la masse de la matière végétale initiale. Le rendement correspond à **0.8 %** pour les alcaloïdes totaux (AT) alors que pour les fractions FN, FA, FB est de **0.4%**, **0.04%**, **0.25%** respectivement.

Le taux d'alcaloïdes totaux de notre plante est légèrement inférieur à celui de la même espèce espagnole *Fumaria agraria* qui est de **0.83 %** et de *Fumaria sepium* qui est de



0.88% (Suau *et al.*, 2002). Cela peut être expliqué par la région de récolte différente et aussi par l'effet de la période de récolte. Notre résultat reste inférieur à celui obtenu par **Bougoffa (2007)**, qui enregistre des taux de **(2,66%)** et **(1,33%)** pour *F. bastardii* et *F. capreolata* respectivement. Cette différence est due à la méthode d'extraction, cette dernière utilisant le réactif de Mayer (**Sousek *et al* 1999**) précipitant sélectivement les alcaloïdes. L'utilisation des réactifs spécifiques aux alcaloïdes améliorant éventuellement le rendement. Par contre, ces résultats restent meilleurs que ceux obtenus par (**Bruneton, 1987**) qui a trouvé un taux de **0.33%** chez *Fumaria officinalis* et une moyenne de **(0.3 % à 0.4%)** pour d'autres plantes alcaloïfères (**Bruneton, 1999**).

La fraction **FN (0.4%)** comparativement aux deux autres fractions **FA** et **FB (0.04%** et **0.25%** respectivement) présente un taux alcaloïdique plus important. La **FN** étant issue d'une extraction chloroformique de l'extrait aqueux total brut, on peut dire que cette fraction contient en plus des alcaloïdes toutes substances à solubilité organique.

La fraction **FA** est obtenue après extraction chloroformique de la phase aqueuse acidifiée, donc après transformation des alcaloïdes en sels solubles dans cette phase aqueuse. La **FA** récupérée dans la phase organique, on peut suggérer que la **FA** contient, entre autre, des alcaloïdes très hydrophobes (tel que les alcaloïdes quaternaires).

La fraction **FB** étant un extrait chloroformique d'alcaloïdes neutralisés par alcalinisation de la phase aqueuse acidifiée, les alcaloïdes contenus dans cette fraction peuvent correspondre à des alcaloïdes tertiaires.

Selon diverses études, (**Sousek *et al.*, 1999 ; Suau *et al.*, 2002**), *Fumaria agraria* semble être plus riche en alcaloïdes isoquinoléiques tertiaires que quaternaires, ce qui peut expliquer la richesse quantitative des fractions **FN** et **FB** par rapport à la fraction **FA**

IV.2.2. Taux d'extraction des composés phénoliques (Dosage pondéral) :

Le calcul du taux d'extrait aqueux en vue de l'analyse des composés phénoliques de la partie aérienne de *Fumaria agraria* a permis l'obtention d'un rendement de **6,05 %**. Ce résultat reste faible par rapport à ceux trouvés par **Orhan et ses collaborateurs (2010)** qui sont de 30.86 %, 33.12 %, 35.97 %, 30.08 % respectivement chez *F. cilicica*, *F. densiflora*, *F. kralikii* et *F. parviflora*. Cette différence peut être expliquée par la méthode d'extraction.



IV.3. Dosage des composés phénoliques :

IV.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

La concentration en polyphénols de nos échantillons de *Fumaria agraria* est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'acide gallique comme référence. (Figure 29). Le taux est exprimé en « mg » d'équivalent d'acide gallique par « g » d'extrait (mg EAG /g E).

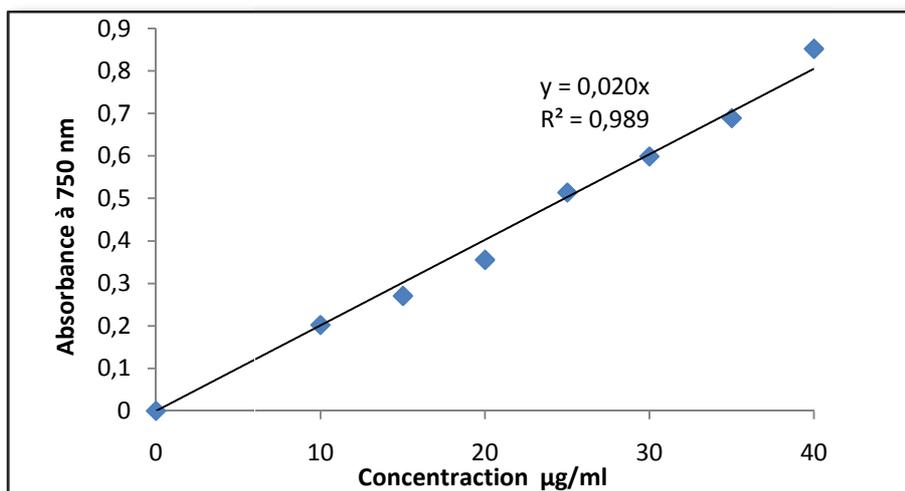


Figure 29: courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques de nos extraits est de 4.28 ± 0.04 (mg EAG/g E). Ce résultat est largement supérieur à celui trouvé par **Orhan et al., (2010)** chez les espèces suivantes *F. cilicica*, *F. kralikii* qui sont respectivement de 0.05 ± 0.0001 (mg EAG/g E) et de 0.09 ± 0.001 (mg EAG/g E), chez *F. densiflora* et de 0.07 ± 0.001 (mg EAG/g E) chez *F. parviflora*. Cette différence peut être attribuée à la méthode d'extraction utilisée. En effet dans notre travail nous avons opté pour l'extraction par soxhlet alors que **Orhan et ses collaborateurs (2010)** ont opté pour l'extraction par macération. L'efficacité de l'extraction par soxhlet est liée aux fait que le solvant qui se condense et qui vient au contact du végétal est toujours pur, permettant de meilleurs coefficients de partage. Dans le cas de la macération le solvant devant extraire la matière végétale peut arriver à saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction aux cours du procédé. (**Hadj Salem, 2009**).



IV.3.2. Dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes de notre plante est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine comme référence. (Figure 30). Le taux est exprimé en « mg » de quercétine par « g » d'extrait.

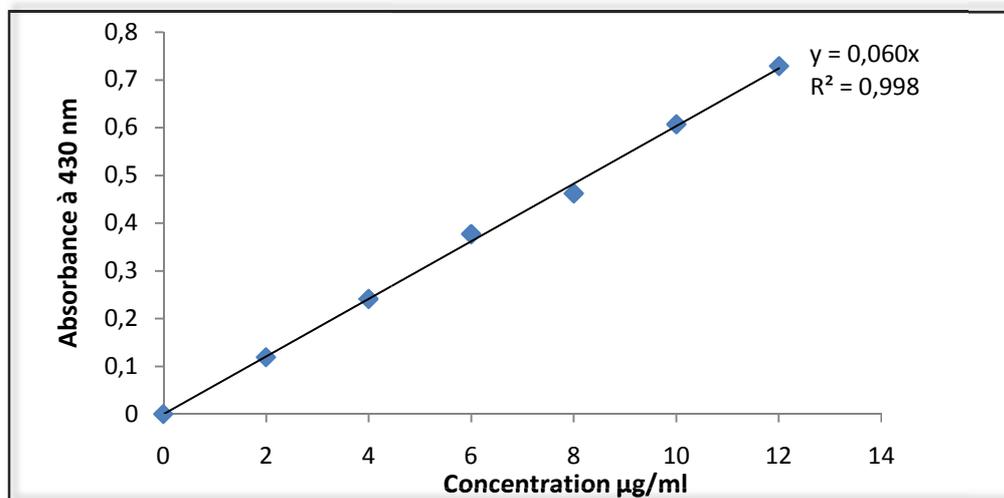


Figure 30 : courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de notre extrait est de 0.21 ± 0.002 (mg EQ/g d'extrait) ; ce résultat est supérieur à ceux trouvés par **Orhan et al, 2010** qui sont de 0.04 ± 0.002 chez *F.cilicica* et *F.cralikii* ; de 0.05 ± 0.002 chez *F. densiflora* et de 0.02 ± 0.001 chez *F. parviflora* ; cette dernière présentant une valeur très faible en flavonoïdes par rapport au taux de composés phénoliques totaux. Notre extrait de *F. agraria* contenant aussi une faible quantité de flavonoïdes (0.21%) par rapport aux composés phénoliques totaux (4.28%) il doit contenir d'autres classes de composés phénoliques.

V. Etude de l'activité antioxydants :

V.1. Effet scavenger du radical DPPH :

Le DPPH• (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyle), d'une coloration violette en solution, est largement utilisé pour estimer la capacité des substances d'agir en tant que piègeurs des radicaux libres ou donateurs d'hydrogène, et d'évaluer ainsi leur activité antioxydants (**Amié et al, 2003** ; **Choi et al, 2007** ; **Bhuiyan et al, 2009**), Les figures 31 et 32 illustrent



respectivement les pourcentages « scavenging » du radical DPPH des standards et des extraits de *F. agraria* à différentes concentrations. Une relation proportionnelle est observée entre la concentration en antioxydants (extraits et standards) et le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (Kumaran *et al.*, 2006).

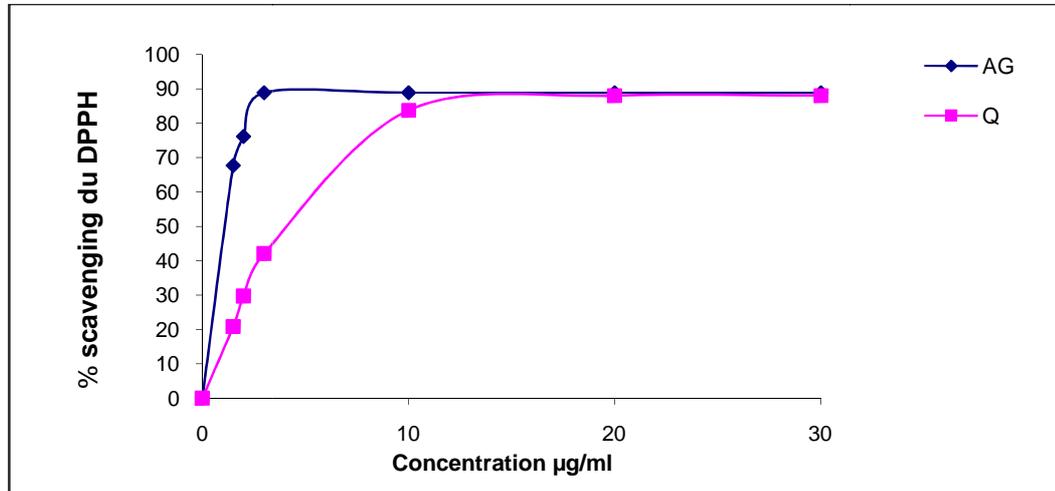


Figure 31 : Effet scavenger contre le radical DPPH des standards testés à différentes concentrations

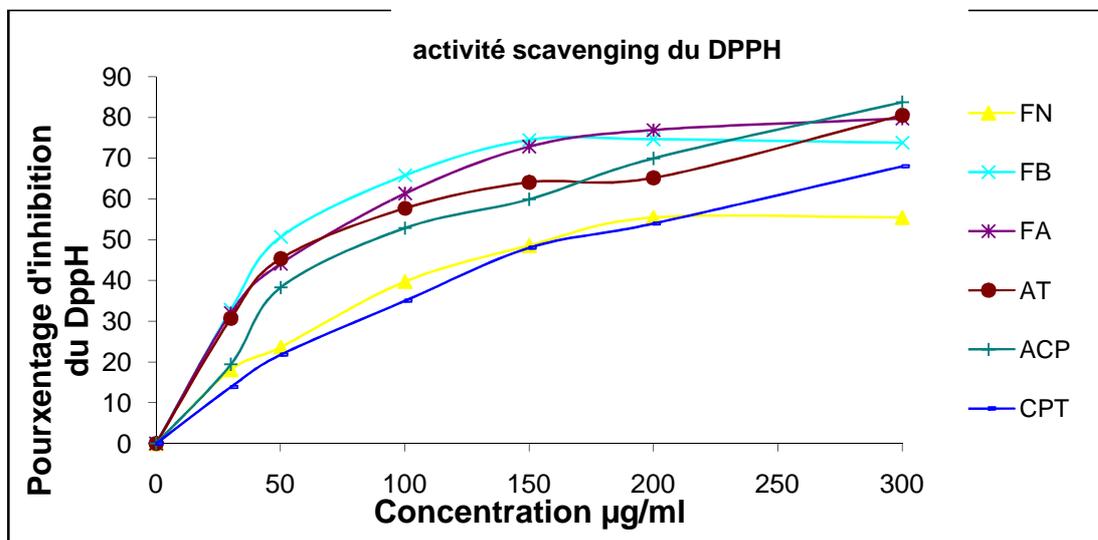


Figure 32 : Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits étudiés à différentes concentrations



L'activité anti-radicalaire (**figure 32**) augmente avec la concentration de l'extrait de la partie aérienne de notre plante, dans la gamme allant de 0-300 µg/ml.

A une concentration de 300 µg/ml pour les quatre extraits alcaloïdiques (**AT, FN, FA et FB**), on remarque que l'extrait d'alcaloïdes totaux (**AT**) exerce la plus grande activité anti-radicalaire par rapport aux autres fractions.

L'extrait d'alcaloïdes totaux (**AT**) avec un rendement pondéral de **0.8%**, présente sa plus forte activité anti-radicalaire (**80,49 %**) à une concentration de **300µg/ml**.

Suivant la courbe de la fraction **FN** en présence du radical DPPH (**figure 32**) le maximum d'activité anti-radicalaire est atteint à une concentration de **200 µg/ml** avec **55.41 %** d'activité. Rappelons que cette fraction alcaloïdique (**FN**) constitue **0.4%** des métabolites de la partie aérienne de *F. agraria*, tandis que Les fractions **FA** et **FB** présentent, à la même concentration de **200 µg/ml**, le maximum d'activité avec **79.74%** et **73.71%** respectivement.

Les IC₅₀ (**tableau VIII**) respectives sont de 50,36 ± 0,09 µg /ml, de 51,12 ± 4,99g/ml et de 56,77 ± 0.67µg/ml pour les extraits alcaloïdiques AT, FB et FA, ce qui démontre et confirme l'efficacité de ces extraits dans la neutralisation du radical DPPH en comparaison aux résultats obtenus avec la fraction FN (114,10 ± 2,09 µg/ml).

Tableau VIII : IC₅₀ des différents extraits contre le radical DPPH.

Extrait	IC ₅₀ (µg /ml)
AT	50,36 ± 0,09 ^a
FB	51,12 ± 4,99 ^a
FA	56,77 ± 0.67 ^{a, b}
FN	114,10 ± 2,09 ^c
ACP	68,30 ± 9,39 ^{b, c}
CPT	162,02 ± 4,59 ^d

- Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écart type.
- Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (p< 0.05).



D'après les résultats obtenus, la capacité anti-radicalaire des extraits ne suit pas le même ordre que celui des teneurs en alcaloïdes, (**Figure 33**) autrement dit la fraction **FA** avec le plus faible rendement alcaloïdique (**0.04%**) présente le meilleur effet anti-radicalaire (**79.74%**) que les fractions **FB** (moyennement riche avec un taux de **0.25%**) et **FN** (**0.4%** d'alcaloïdes) (**Figure 33**). Cela peut laisser suggérer que, soit la fraction **FA** est qualitativement plus riche en alcaloïdes actifs, soit qu'elle présente une pureté plus importante que les deux autres fractions c'est-à-dire un encombrement stérique moindre.

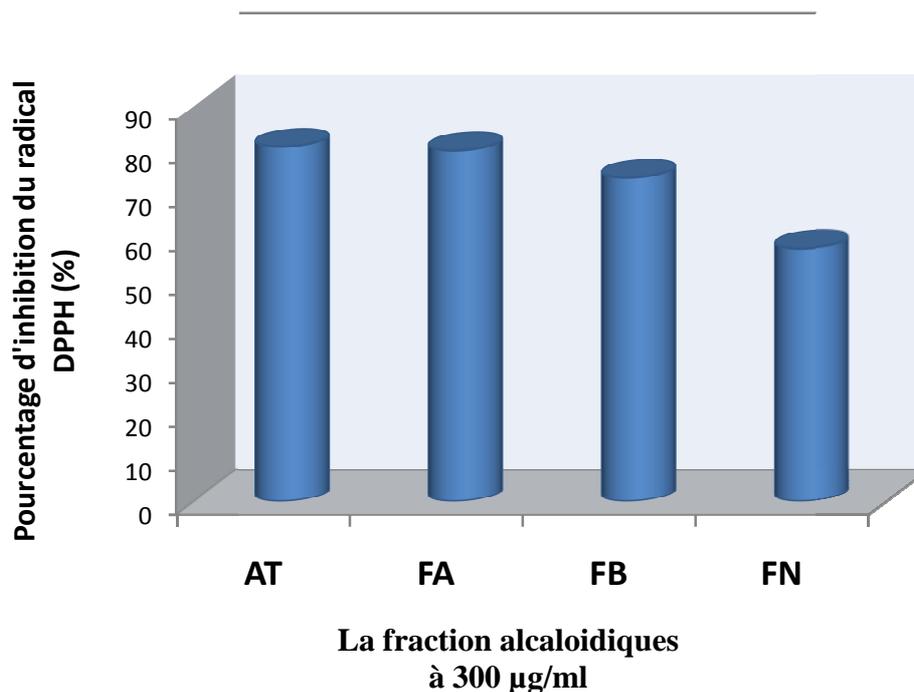


Figure 33 : Comparaison d'effet anti-radicalaire des fractions alcaloïdiques à la même concentration

L'effet anti-radicalaire de nos alcaloïdes reste inférieur à celui exercé par les standards utilisés (**Figure 31**). L'ordre d'efficacité peut être résumé comme suit : Acide gallique (88,87%) > Quercétine (88,71%) > AT (80,49 %) > FA (79,74% > FB (73,71%) > FN. (55,41%).

Lessage Messen et al. (2001) et **Visioli et al. (2003)**, ont montré que les *O*-diphénols (acide caféique) exercent une importante activité antioxydants. Selon **Mc Donald et al. (2001)**, les acides hydroxycinnamiques et leurs esters exercent une activité antioxydant importante.



Notre extrait aqueux contenant les composés phénoliques (CPT) (4.28 ± 0.04 mg EAG/g E) présente une bonne activité anti-radicalaire avec un maximum de **67,92%** à une concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{IC}_{50} = 162,02 \pm 4,59\mu\text{g/ml}$). Cette activité reste inférieure à celle exercée par la même concentration de l'extrait brut d'acides phénoliques (ACP) qui est de **83,66 %** ($\text{IC}_{50} = 68,30 \pm 9,39\mu\text{g/ml}$). Notre résultat reste supérieur à ceux trouvés par **Orhan et al., 2010** chez les espèces *F. cilicica* (11,99%), *F. densiflora* (13,27%), *F. kralikii* (11,25%), et *F. parviflora* (11,14%).

En comparant la capacité de l'extrait brut des acides phénols à réduire l'espèce radicalaire DPPH (**83,66%**) et celle exercée par l'extrait brut des alcaloïdes totaux (**80,49 %**) avec leur IC_{50} ($68,30 \pm 9,39 \mu\text{g/ml}$ et $50,36 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$), sur le plan cinétique, on peut remarquer, mais cela reste à confirmer, que la réaction de neutralisation du radical DPPH par l'extraits des acides phénoliques est une réaction élémentaire lente comparativement à la même réaction en présence de l'extraits d'alcaloïde totaux. Autrement dit, le temps de saturation est plus court dans le cas des alcaloïdes totaux donc la vitesse est plus importante.

L'activité « scavenger » du radical DPPH peut être attribuée à la présence de groupements hydroxyles, à la structure moléculaire du composé, à la disponibilité de l'hydrogène phénolique et à la possibilité de la stabilisation du radical formé résultant d'un donneur d'hydrogène (**Dawidowicz et al., 2006**). La présence d'un groupement « **-C=CH-COOH** » participe au renforcement de l'activité antioxydant (**Nagendran et al., 2005**). L'encombrement stérique instauré par les sucres au niveau des flavonoïdes glycosylés réduit par contre cette activité (**Garcia Alonso et al., 2004**). Selon **Son et Lewis (2002)** et **Abdille et al. (2005)**, l'activité anti-radicalaire est augmentée par la présence d'autres groupements donneurs d'hydrogène (sulfhydryl, amide).

Il a longtemps été suggéré que le mécanisme d'inhibition du DPPH est dû à un transfert d'hydrogène. L'analyse de la cinétique de réaction du DPPH avec les phénols par **Huang et al. (2005)** et **Obied et al. (2007)** a révélé que cette réaction consiste en un transfert d'électrons de l'anion phénoxyde sur le DPPH, le transfert d'hydrogène n'est que marginal et limité dans les solvants polaires dont le méthanol.



V.2. Mesure du pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur est un indicateur significatif du potentiel antioxydant d'une substance (Wang *et al.*, 2008). Les résultats du pouvoir réducteur de nos extraits présentent un profil comparable à celui de l'effet anti-radicalaire, mais non comparable à celui des teneurs en substances actives. La **figure 34** montre que l'extrait brut des acides phénoliques de la partie aérienne de *Fumaria agraria* exerce une bonne activité réductrice, inférieure à celle des standards (**Figure 35**), mais supérieure à celle des autres extraits alcaloïdiques et aqueux. Ces résultats indiquent que le pouvoir réducteur augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait et du standard.

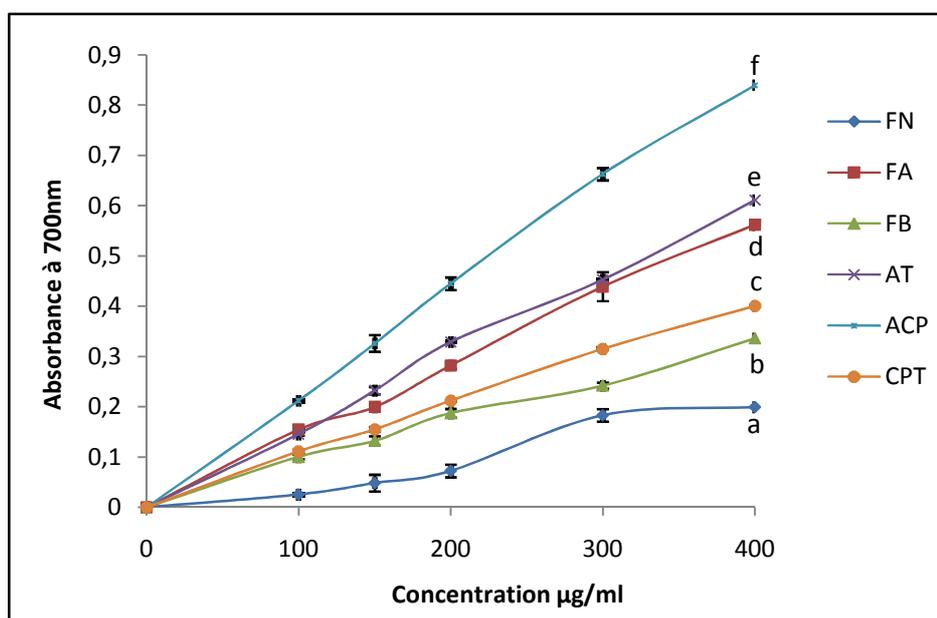


Figure 34 : Pouvoir réducteur des extraits testés à différentes concentrations.

- Les barres verticales représentent les écarts types.
- Les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d<e<f, désignées la différence significative ($p<0.05$).



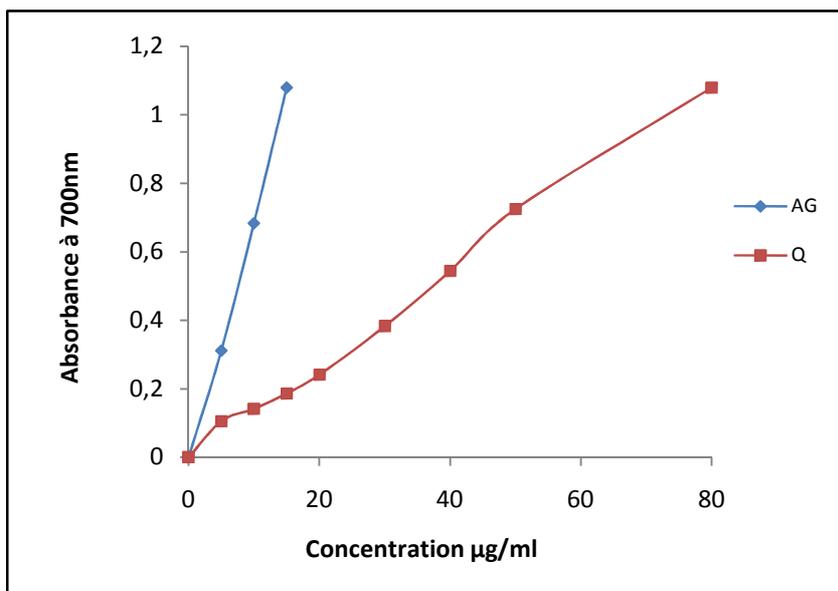


Figure 35 : Pouvoir réducteur des standards testés à différente concentration.

La présence des composés réducteurs dans les extraits de notre plante induit la réduction du complexe Fe^{3+} ferricyanure en ions ferreux (Fe^{2+}) qui réagissent comme donneurs d'électrons. L'absorbance reflétant la quantité des composés antioxydants présents dans l'échantillon testé, cette mesure permet une évaluation semi-qualitative des composés participant à la réaction réductrice (Yang *et al.*, 2008 ;Choi *et al.*, 2007 ;Lee *et al.*, 2004 ;Ara *et Nur*, 2009 ;Ozsoy *et al.*, 2008).

L'extrait des alcaloïdes totaux (AT), à une concentration de $400\mu\text{g}/\text{ml}$, exerce la meilleure activité réductrice avec une absorbance de $0,611 \pm 0,002$, suivi des fractions alcaloïdiques FA avec $0,562 \pm 0,02$, FB avec $0,33 \pm 0,006$ et puis la FN avec une absorbance de $0,199 \pm 0,01$.

Le pouvoir réducteur, exprimé en absorbance, de l'extrait brut des acides phénols (ACP) avec une absorbance de $(0,840 \pm 0,004)$ est presque deux fois plus important que celui de l'extrait aqueux des composés phénoliques (CPT) avec une absorbance de $(0,401 \pm 0,002)$; et plus important que l'effet des extraits alcaloïdiques ; ceci étant dû au potentiel réducteur élevé des composés phénoliques présents dans cet extrait et à un encombrement stérique moindre par rapport à l'extrait aqueux.



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

L'acide gallique à une concentration de 15 µg/ml présente une meilleure activité réductrice avec une absorbance de 1,08 suivi de la quercétine avec un résultat de 0.187 (**Figure 35**).

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

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

VI. Caractérisation par CCM des différentes fractions :

Les fractions obtenues par chromatographie sur colonne de gel de silice, sont soumises à une séparation par Chromatographie sur couche mince. Comme attendu de par la bibliographie du genre *Fumaria*, nos développements chromatographiques sur couche mince, ont permis de détecter, au moyen du réactif de Dragendorff, la présence d'alcaloïdes dans la partie aérienne de *F. agraria*. Chaque substance a été caractérisée par sa fluorescence sous UV (**254 nm** et **365 nm**), son « **Rf** » et la couleur de la tache après révélation par le révélateur chimique « le Dragendorff ». ce dernier réagit par son groupement « Iode » avec « l'azote » (alcaloïde) qui se traduit par un précipité de couleur rouge orangé (**Baerheim, 1983**).

Divers système de séparation ont été testés et les résultats obtenus sont présentés comme suit :



VI.1. Système E.A.T. :

Le système utilisé consiste en un mélange de solvant éther de pétrole-acétone- triéthylamine (60 : 40 : 05), divers standards ont été utilisés comme témoins, leur comportement chromatographique suivant ce système d'éluion est résumé sur le **tableau IX**

Tableau IX: Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes standards dans le système (EAT) éther de pétrole-Acétone-Triéthylamine après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.

Standards	Rf	Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation Dragendorff
Bérberine	-	-	-	-
Scopolamine	0.42	Bleue claire	-	-
Trihydropalmitine	0.72	Mauve	Verte	+
	0.87	Bleue claire	Verte	+
Boldine	0.20	Bleue foncée	Noire	-
Coridaline	0.81	Bleue violet	Verte	+
Palmitine	-	-	-	-

Concernant la séparation des différentes fractions récupérées lors de la chromatographie sur colonne, les résultats obtenus dans ce système d'éluion sont reportés sur les **tableaux X**

Tableau X: Chromatographie sur couche mince des sous fractions de la **FN, FA, FB** dans le système Ether de pétrole-Acétone-Triéthylamine (**EAT**) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.

Fraction	Rf	Observation UV 254 nm	Observation UV 365 nm	Revelation Dragendorff
FN₁	0.65	Bleue claire	-	-
	0.76	-	Bleue Claire	-
	0.85	-	Jaune	-

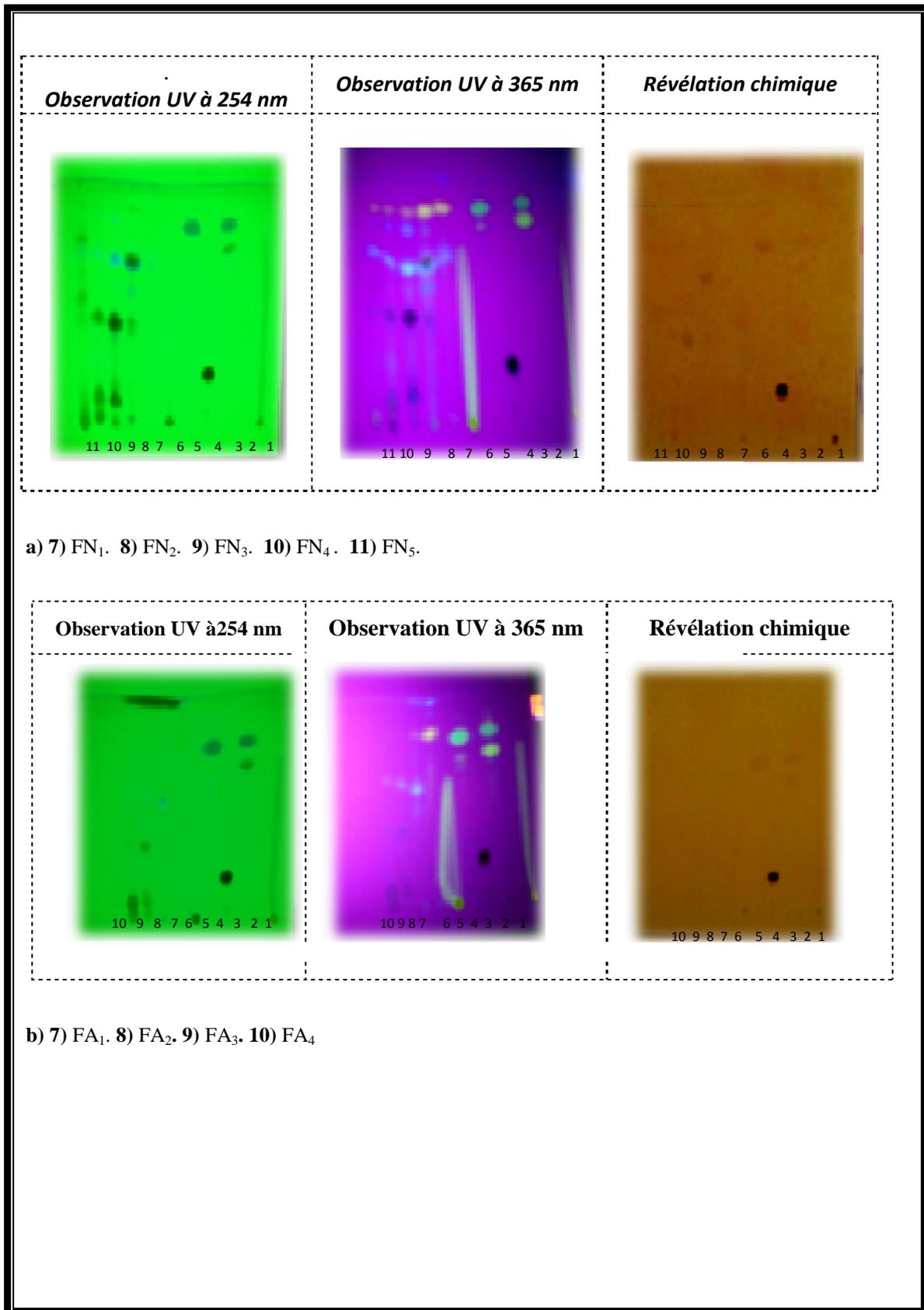


FN₂	0.15	Bleue claire	-	-
	0.36	Bleue claire	-	-
	0.40	Bleue claire	-	-
	0.53	Bleue claire	Bleue Claire	-
	0.62	Bleue foncée	Bleue oronge	-
	0.75	-	Jaune Claire	+
	0.83	-	Jaune foncée	+
	FN₃	0.10	Bleue foncée	Jaune Claire
0.16		Bleue claire	-	-
0.35		Bleue foncée	-	-
0.40		Bleue claire	Noire	+
0.51		-	Bleue Claire	-
0.59		Bleue ciel	Bleue ciel	-
0.75		Bleue ciel	Bleue claire	-
0.83		-	Jaune	-
FN₄	0.10	Bleue foncée	Jaune claire	+
	0.24	-	Bleue claire	-
	0.43	Bleue foncée	Jaune claire	+
	0.63	Bleue claire	Bleue ciel	-
	0.76	Bleue claire	Bleue claire	-
	0.87	-	Jaune	-
	FN₅	0.43	Bleue claire	-
0.54		Bleue claire	-	+
0.69		Bleue claire	Bleue ciel	-
0.80		-	Bleue claire	-
0.86		-	Jaune	-
FA₁	0.37	Bleue foncée	Bleue ciel	-
	0.40	Bleue foncée	Jaune claire	+
	0.43	Bleue claire	Bleue ciel	+
	0.55	Bleue claire	Jaune	-



FA₂	0.81	Bleue foncée	Noire	-
	0.45	Bleue foncée	Jaune claire	+
	0.58	-	Jaune claire	+
	0.65	Bleue violet	Jaune foncée	+
FA₃	0.21	Bleue foncée	Noire	+
	0.70	Bleue violet	Jaune foncée	+
FA₄	0.25	Bleue claire	-	+
	0.71	Bleue violet	Jaune foncée	+
FB₁	0.45	Bleue foncée	Bleue foncée	+
	0.48	-	Bleue claire	-
FB₂	0.11	Bleue claire	Bleue foncée	+
	0.20	Bleue foncée	Bleue foncée	+
	0.45	Bleue claire	Bleue foncée	+
	0.48	Bleue foncée	Bleue foncée	+
FB₃	0.66	Bleue foncée	Bleue claire	+
	0.20	Bleue foncée	Bleue foncée	+
	0.66	Bleue foncée	Bleue claire	+
FB₄	0.20	Bleue foncée	Bleue foncée	+
	0.68	Bleue foncée	Bleue claire	+





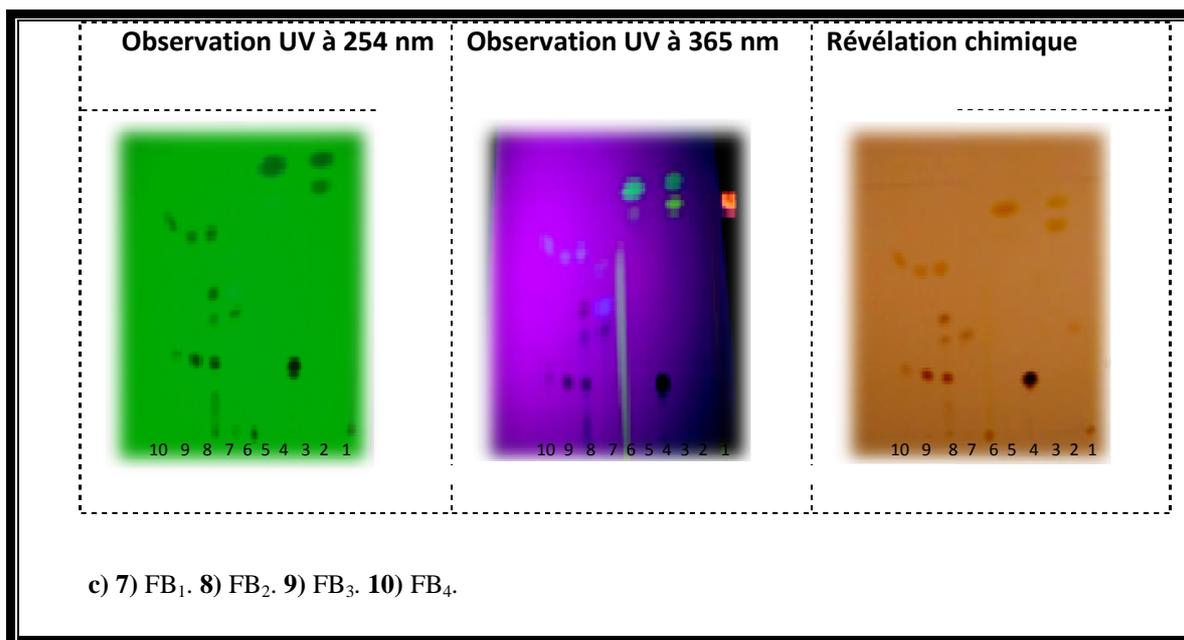


Figure 36: Chromatogrammes obtenus avec le système (EAT) des différentes fractions alcaloïdiques. 1) Berbérine. 2) Scopolamine. 3) Trihydropalmitine. 4) Boldine. 5) Coridaline. 6) palmitine.

Les plaques de CCM développées dans le système **EAT** (**Figure 36**) observées sous UV après élution montrent des spots de couleurs et de distances de migration différentes sous les deux longueurs d'ondes pour les trois fractions **FN**, **FA**, **FB**.

Le système **EAT** montre une bonne résolution pour les trois fractions, les spots sont d'une taille moyenne et d'une forme plus aux moins circulaire.

L'allure du chromatogramme de la **FB** et de la **FN** est nettement meilleure que celui de la **FA**, presque la totalité des spots formés sur le chromatogramme de la **FB** (**10spots**) ont réagi positivement avec le réactif de Dragendorff (**couleur orange**), confirmant ainsi la présence d'alcaloïdes alors que sur le chromatogramme de la **FA** et de la **FN** seulement **08** et **07** spots respectivement ont réagi positivement avec le Dragendorff.

En terme de nombres de spots ce système a permis une bonne séparation, la **FN** avec **19 spots** à 254 nm et **21 spots** à 365 nm, alors que pour la **FA** **11 spots** sont visibles à 254 nm et **11 spots** à 365 nm, pour la **FB** on distingue **10 spots** à 254 nm et **11 spots** à 365 nm, donc en terme de nombres de spots ce système est meilleur pour la séparation de la fraction **FN** par



rapport à la **FA** et la **FB**, mais en terme de résolution le chromatogramme de la **FB** est meilleur par rapport à celui de la **FN** et **FA**.

Certains standards tels que la palmitine et la berbérine n'apparaissent pas sous UV dans ce système de migration.

On comparant le comportement chromatographique des différentes sous fractions avec les standards (**tableaux IX et X**) les fractions FN, FA, FB contiendraient probablement la coridaline, la scopolamine et la boldine.

- Un spot de la sous fraction FN₅ possède un Rf = 0.80 peut probablement correspondre à la coridaline qui a un Rf = 0.81.

- Un autre spot de la FN₅ et de la FN₄ (Rf = 0.43) peuvent correspondre à la scopolamine (Rf = 0.42).

- Un spot de la FA₁ (Rf= 0.81) étant identique à celui de la coridaline et un autre spot (Rf = 0.43) peut aussi correspondre probablement à la scopolamine (Rf= 0.42).

-Un spot de la FA₃ (Rf= 0.21) peut correspondre également à la boldine (Rf = 0.20) alors que un spot de la FB₂ et la FB₃ et la FB₄ possèdent un Rf identique à celui de la boldine .

VI.2.Système C.M.N. :

Ce système consiste en un mélange de chloroforme-méthanol-NH₄OH (80 : 20 : 0.2) Les résultats obtenus pour les différents standards suivant ce système d'éluion est résumé sur le **tableau XI**.

Tableau XI : Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes standards dans le système (CMN) Chloroforme-Méthanol-NH₄OH après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.

fraction	Rf	Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation Dragendorff
Berbérine	-	-	-	-
Scopolamine	0,74	Claire	-	+
Trihydropalmitine	0,96	Bleue violet	Verte	+



Boldine	0,63	Bleue foncée	Noire	-
Coridaline	0,96	Bleue violet	Verte	+
Palmitine	-	-	-	-

Les résultats de la CCM obtenus pour les sous fractions dans ce système de migration (CMN) pour les différentes fractions alcaloïdiques FN, FA, FB sont résumés sur le **tableau XII**.

Tableau XII : Chromatographie sur couche mince des sous fractions de la FN, FA, FB développée dans le système Chloroforme-Méthanol-NH₄ OH (CMN) après observation sous UV à 254 nm et 365nm et la révélation chimique.

Fraction	Rf	Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation Dragendorff
FN ₁	0.50	-	Jaune claire	-
	0.71	Violet foncée	-	-
	0.74	Violet foncée	-	-
	0.78	Violet foncée	-	-
FN ₂	0.24	-	Verte	-
	0.52	Bleue foncée	Bleue claire	-
	0.74	Bleue foncée	-	-
FN ₃	0.26	Bleue claire	-	-
	0.37	-	Jaune claire	-
	0.45	-	Jaune claire	-
	0.52	-	Jaune claire	-
	0.67	Bleue ciel	Bleue claire	-
	0.80	Bleu violet	Bleue claire	+
FN ₄	0.21	Bleue claire	-	-
	0.32	-	Verte claire	-
	0.39	-	Verte claire	-

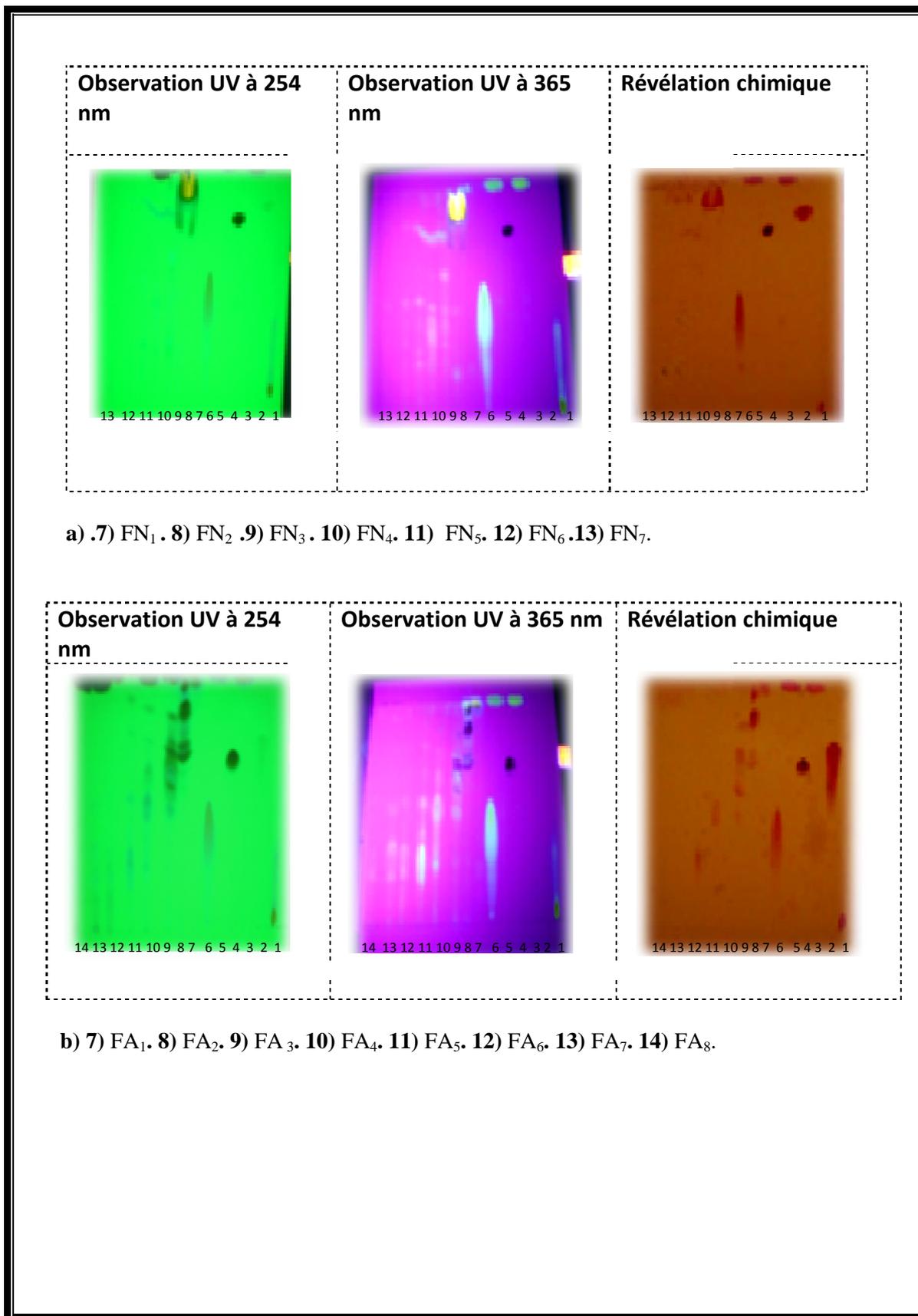


FN ₅	0.45	Bleue claire	Verte claire	-
	0.51	-	Bleue claire	-
	0.80	Bleue violet	-	+
	0.21	Bleue claire	-	-
	0.27	-	Jaune claire	-
	0.36	-	Jaune claire	-
	0.43	-	Jaune claire	-
FN ₆	0.52	-	Jaune claire	-
	0.15	Bleue très claire	-	-
	0.21	Bleue très claire	-	-
	0.37	-	Jaune claire	-
FN ₇	0.52	-	Jaune claire	-
	0.49	-	Bleue très claire	-
FA ₁	0.21	-	Jaune claire	-
	0.91	Bleue violet	-	+
FA ₂	0.95	Bleue violet	Jaune foncée	+
	0.25	-	Jaune claire	-
	0.68	Bleue foncée	Marron	+
	0.85	Bleu foncée	Marron	+
	0.93	Bleue foncée	-	+
FA ₃	0.25	-	Bleue claire	-
	0.45	Bleue claire	Bleue claire	-
	0.60	Bleue foncée	Marron	+
	0.75	Bleue claire	Marron	+
FA ₄	0.81	Bleue foncée	-	+
	0.93	Bleue foncée	-	-
	0.21	Bleue claire	Bleue claire	-
	0.46	-	Bleue claire	-
	0.72	Bleue foncée	-	-
	0.84	Bleue claire	-	-



FA₅	0.25	Bleue claire	-	-
	0.31	-	Bleue claire	+
	0.5	Bleue claire	Bleue claire	+
FA₆	0.25	Bleue claire	Jaune claire	+
FA₇	0.18	Bleue claire	-	-
	0.28	Bleue claire	Bleue claire	-
	0.5	-	Bleue claire	-
FA₈	0.18	-	Bleue claire	-
	0.28	-	Jaune claire	-
FB₁	0.63	-	Jaune claire	-
	0.81	-	Jaune claire	-
	0.95	Bleue ciel	-	-
	0.96	-	Bleue claire	-
FB₂	0.56	Bleue foncée	Noire	+
	0.63	Bleue claire	-	-
	0.81	Bleue foncée	Noire	+
	0.86	Bleue claire	-	-
	0.93	Bleue claire	-	-
FB₃	0.62	Bleue foncée	Noire	+
FB₄, FB₅	0.78	Bleue foncée	Noire	+
FB₆, FB₇	-	-	-	-





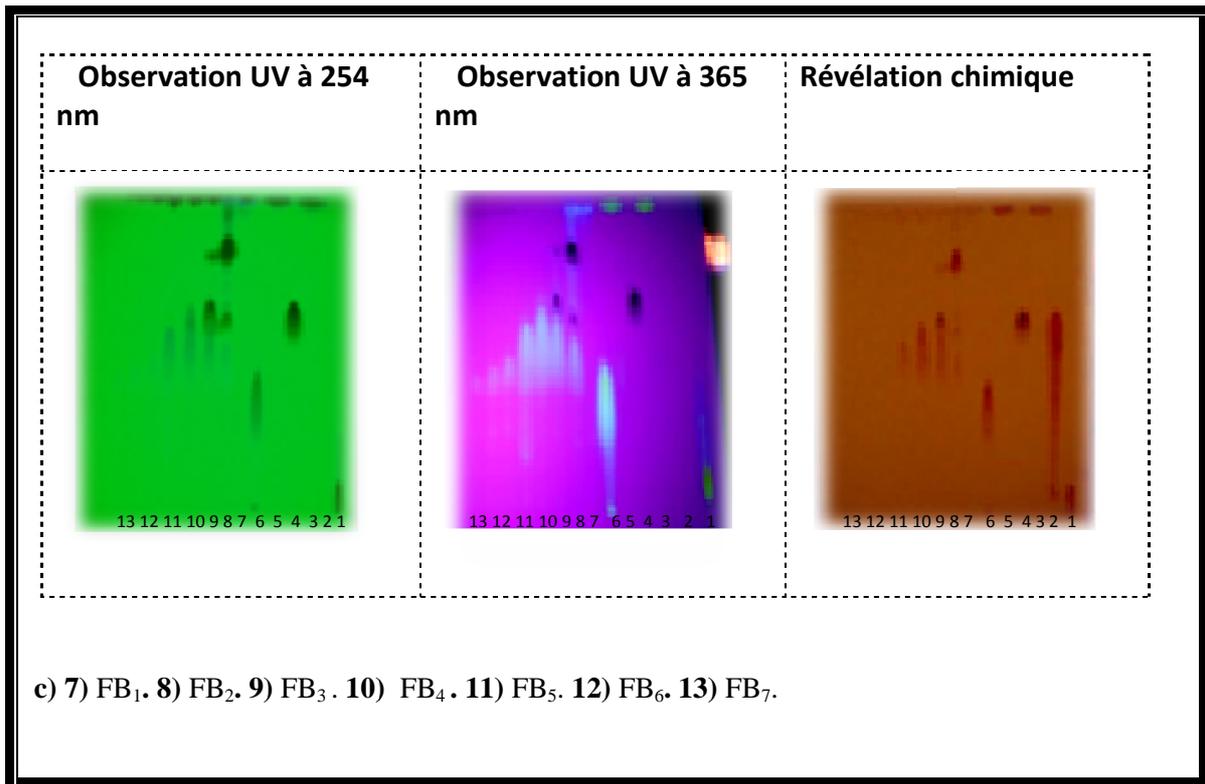


Figure 37 : Chromatogrammes obtenus avec le système (CMN) des différentes fractions alcaloïdiques. 1) Berbérine.2) Scopolamine.3) Trihydropalmitine.4) Boldine.5) Coridaline.6) palmitine.

Ce système de migration n'a pas permis également la migration de certains standards tels que la berbérine et la palmitine.

Les plaques de CCM (**figure 37**) visualisées sous UV à 254 nm et à 365 nm présentent des spots de couleurs et de Rf différents, ceux qui apparaissent sous les deux longueurs d'onde peuvent correspondre aux mêmes substances.

L'allure du chromatogramme de la **FN** est meilleure à 365 nm mais faiblement visible à 254 nm avec seulement **02 spots** révélés par le réactif de Dragendorff.

Ce système a permis une meilleure séparation pour la **FA** l'allure du chromatogramme est nettement meilleure à 254 nm et 365 nm avec **11 spots** révélés par le réactif de Dragendorff



en comparaison avec le chromatogramme de la **FB** qui ne montre pas une bonne séparation avec seulement **04 spots** révélés par le réactif de Dragendorff .

En termes de nombres de spots, ce système de migration **CMN** est meilleur pour la séparation de la fraction **FA** avec **18 spots** observés sous UV à 254 nm et 365 nm alors que la **FN** montre **14 spots** à 254 nm et **19 spots** à 365 nm suivi de la **FB** avec seulement **08 spots** sous UV à 254 nm et **07 spots** à 365 nm.

En comparant la distance de migration des standards et des différentes sous fractions (**tableaux XI, XII**), certains spots observés sous UV peuvent probablement correspondre à certains alcaloïdes :

- Un spot de la FN₁, FN₂ possèdent un Rf identique à celui de la scopolamine (Rf = 0,74).
- Un spot de la FA₁ (Rf = 0,95) peut probablement s'agir de la coridaline ou de la trihydropalmitine (Rf = 0,96).
- Un spot de la FA₃ (Rf = 0,75) peut correspondre à la scopolamine (Rf= 0,74).
- Un spot de la FB₁, FB₂ (Rf = 0,63) et un spot de la FB₃ (Rf = 0,62) peut correspondre à la Boldine (Rf = 0,63).
- Deux spots de la FB₁ (Rf = 0,95 et 0,96) peuvent probablement correspondre à la coridaline ou à la trihydropalmitine (Rf = 0,96).



VI.3. Système C.M.A. :

Ce système consiste en un mélange de chloroforme-méthanol-acide acétique (80 : 20 : 04) les résultats obtenus pour les alcaloïdes standards sont reportés sur le **tableau XIII**.

Tableau XIII : Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes standards dans le système (CMA) Chloroforme-Méthanol-Acide acétique après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.

Les standards	Rf	Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation chimique
Berberine	0.76	Orange claire	Verte	+
Scopolamine	0.47	-	-	+
Trihydropalmitine	0.91	Bleue violette	Verte	+
Boldine	0.56	Bleue foncée	Noire	-
Coridaline	0.95	Bleue violette	Verte	+
Palmitine	0.76	Orange	Verte	+



Les résultats obtenus après observation des plaques sous UV des sous fractions alcaloïdiques de la FN, FA, FB sont reportés sur le **tableau XIV**.

Tableau XIV : Chromatographie sur couche mince des sous fractions de la FN, FA, FB développée dans le système Chloroforme-Méthanol-Acide acétique (CMA) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique

Les fractions	Rf	Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation Dragendorff
FN₁	0.70	Bleue	Bleue claire	+
FN₂	0.70	Bleue claire	Bleue claire	+
FN₃	0.73	Bleue foncée	Noire	-
FN₄	0.63	Bleue claire	-	-
	0.66	Bleue claire	-	-
	0.70	Bleue claire	Bleue claire	+
FN₅	0.71	Bleue claire	-	-
	0.76	Bleue claire	Bleue claire	-
	0.82	Bleue claire	Bleue claire	+
FN₆	0.29	Bleue claire	-	-
	0.79	Bleue claire	Bleue claire	+
	0.87	-	Bleue claire	-
	0.95	-	Bleue claire	+
FN₇	0.29	Bleue claire	-	-
	0.80	Bleue claire	Bleue claire	-
	0.90	-	Bleue claire	-
	0.95	Bleue claire	Bleue claire	-
FN₈	0.80	-	Bleue claire	-
FA₁	0.71	Bleue ciel	-	-
	0.76	-	Bleue claire	-
	0.81	Bleue foncée	Jaune claire	+
	0.86	Bleue ciel	Bleue claire	-



FA₂	0.68	Bleue foncée	Noire	+
	0.79	Bleue nuit	Jaune	+
	0.86	Bleue ciel	Bleue	-
FA₃	0.60	Bleue nuit	-	-
	0.63	Bleue claire	-	-
	0.65	Bleue claire	Noire	+
	0.67	Bleue foncée	-	-
	0.78	-	Jaune claire	-
	0.81	-	Noire	-
	0.87	-	Bleue claire	-
FA₄	0.63	Bleue claire	-	-
	0.70	Bleue violet	Jaune foncée	+
	0.78	Bleue claire	Jaune claire	-
FA₅	0.35	Bleue claire	-	-
	0.70	Bleue violet	Jaune foncée	+
	0.77	Bleue claire	Jaune claire	-
FA₆	0.34	Bleue claire	-	-
	0.74	Bleue ciel	Jaune claire	+
FA₇	0.40	Bleue claire	-	-
	0.75	Bleue ciel	Jaune claire	-
FA₈	0.39	Bleue claire	-	-
	0.73	Bleue ciel	Jaune claire	-
FB₁	0.96	Bleue ciel	Orange	+
FB₂	0.54	Bleue claire	-	+
	0.59	Bleue foncée	Noire	+
	0.66	-	Noire	-
	0.71	Bleue foncée	-	+
	0.77	Bleue foncée	Jaune	-
	0.95	-	Bleue	-
FB₃	0.53	Bleue	-	-



FB₄	0.57	Bleue foncée	Noire	+
	0.61	Bleue	-	-
	0.67	Bleue foncée	Jaune	+
	0.74	Bleue claire	-	-
	0.59	Bleue claire	-	-
FB₅	0.62	Bleue claire	-	-
	0.68	Bleue violet	Jaune foncée	+
	0.73	Bleue claire	-	-
	0.60	Bleue claire	-	-
FB₆	0.63	Bleue claire	-	-
	0.67	Bleue violet	Jaune claire	-
	0.74	Bleue claire	-	-
FB₇	0.67	Bleue claire	-	-
	0.72	Bleue claire	Jaune	-
	0.67	Bleue claire	-	-
	0.72	-	Jaune	-
	0.72	Bleue claire	Jaune claire	-



Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation chimique
 <p>14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1</p>	 <p>14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1</p>	 <p>14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1</p>
<p>7) FN₁.8) FN₂.9) FN₃.10) FN₄.11) FN₅.12) FN₆.13) FN₇.14) FN₈.</p>		
Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation chimique
 <p>14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1</p>	 <p>14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1</p>	 <p>14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1</p>
<p>.7) FA₁.8) FA₂.9) FA₃.10) FA₄.11) FA₅.12) FA₆.13) FA₇.14) FA₈.</p>		



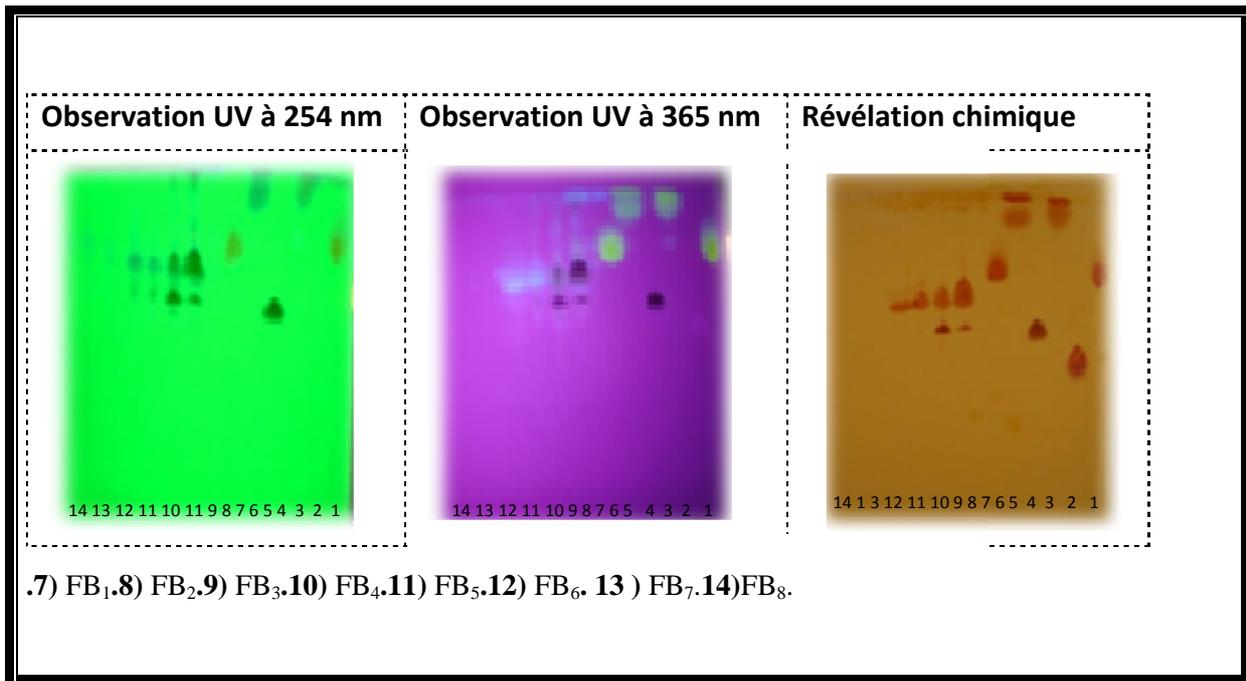


Figure 38 : Chromatogramme obtenu avec le système (CMA) des différentes fractions alcaloïdiques. 1) Berbérine. 2) Scopolamine. 3)Trihydroxypalmitine. 4) Boldine.5) Coridaline. 6) Palmitine.

L'observation sous UV (**figure 38**) a permis de mettre en évidence la présence des fluorescences de diverses couleurs pour les trois fractions **FN**, **FA**, **FB**.

Le chromatogramme de la **FN** ne montre pas une nette séparation en comparaison avec les deux autres systèmes de séparation précédents, les spots sont plus visibles à 365 nm qu'à 254 nm avec l'apparition de **14 spots** à 254 nm, et **13 spots** à 365 nm, seulement **06 spots** ont réagi positivement avec le Dragendorff, par contre ce système a permis la révélation de tous les standards utilisés.

Le chromatogramme de la **FA** indique **22 spots** à 254 nm et **17 spots** à 365 nm mais **07 spots** seulement ont été révélés avec le réactif de Dragendorff .

Sur le chromatogramme de la **FB** **22 spots** sont visualisés à 254 nm et **12 spots** à 365 nm mais seulement **07 spots** sont révélés par le Dragendorff .



En se basant sur la comparaison des R_f des alcaloïdes standards et des spots des différentes sous fractions (tableau XIII, XIV) on peut suggérer la présence des différents standards utilisés dans les trois fractions :

-un spot de la FN₅ avec un $R_f = 0.76$ est identique à celui de la berbérine ou la palmitine mais dont la révélation avec le Dragendorff est négative cela peut être dû à une faible concentration du composé.

-un spot de la FN₆ et de la FN₇ avec un $R_f = 0.95$ identique à celui de la coridaline et dont la révélation avec le Dragendorff est positive.

-Un spot de la FN₇ ($R_f = 0,90$) pourrait être la trihydropalmitine qui possède un $R_f = 0,91$.

- Un spot de la FA₁ ($R_f = 0,76$) et un spot de la FA₇ ($R_f = 0,75$) peuvent correspondre à la palmitine ou la berbérine ($R_f = 0,76$).

-Un spot de la FB₁ ($R_f = 0,96$) et un spot de la FB₂ ($R_f = 0,95$) peuvent correspondre à la coridaline ($R_f = 0,95$).

-Un spot de la FB₃ ($R_f = 0,57$) peut correspondre à la boldine ($R_f = 0,56$).

VI.4.Système H.E.D. :

Ce système est un mélange d' Hexane-Ethyle acétate-Diéthylamine (80 : 10 : 10) presque apolaire, les résultats obtenus pour les alcaloïdes standards sont reportés sur **le tableau XV**.



Tableau XV : Chromatographie sur couche mince des alcaloïdes standards dans le système (HED) Hexane-éthyle acétate-Diéthylamine après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.

Les standards	Rf	Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation chimique
Berbérine	-	-	-	-
Scopolamine	-	-	-	-
Trihydropalmitine	0.07	-	Jaune claire	-
	0.18	-	Jaune claire	-
	0.20	Orange marron	Jaune foncée	+
	0.37	Bleue violet	Verte	+
	0.45	-	Verte claire	-
	0.54	-	Jaune	-
	0.64	-	Jaune	-
Boldine	-	-	-	-
Coridaline	0.14	Bleue claire	-	-
	0.22	Jaune claire	-	-
	0.35	Verte	+	+
Palmitine	-	-	-	-

Les résultats des différentes sous fractions alcaloïdiques pour les différentes fractions FN, FA, FB sont reportés sur le **tableau XVI**.



Tableau XVI : Chromatographie sur couche mince des sous fractions de la **FN, FA, FB** développée dans le système Hexane-Ethyle acétate-Diéthylamine (HED) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.

Les fractions	Rf	Observation UV à 245 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation Dragendorff
FN₁	0.48	Jaune orange	-	-
	0.55	Bleue claire	-	-
	0.66	-	Jaune	-
	0.79	-	Bleue	-
	0.84	Bleue claire	-	-
	0.92	Bleue claire	-	-
FN₂	0.05	Bleue foncée	-	+
	0.11	Bleue	Bleue	-
	0.53	Jaune orange	Jaune	+
	0.58	Bleue claire	Jaune	-
	0.93	Bleue claire	Jaune	-
FN₃	0.12	Bleue foncée	Jaune	+
	0.28	-	Jaune	-
	0.53	Orange claire	Jaune	+
	0.58	Bleue	-	-
	0.93	Bleue foncée	-	-
FN₄	0.13	Bleue foncée	Bleue	-
	0.54	-	Jaune	-
	0.60	Bleue foncée	-	-
	0.94	Bleue foncée	-	-
FN₅	0.12	Bleue foncée	Bleue	-
	0.34	Bleue claire	Bleue	-
	0.39	Bleue claire	-	-
	0.54	-	Bleue	-
	0.62	Bleue foncée	-	-



	0.88	Bleue	-	-
	0.94	Bleue	-	-
FN₆	0.06	Bleue foncée	-	+
	0.12	Bleue claire	Bleue	-
	0.34	Bleue claire	Bleue	-
	0.40	Bleue foncée	Bleue	-
	0.56	-	Jaune	-
	0.61	Bleue foncée	-	-
	0.94	Bleue foncée	-	-
FN₇	0.06	Bleue foncée	Bleue	+
	0.55	-	Jaune	-
	0.06	Bleue claire	-	-
FA₁	-	-	-	-
FA₂	0.09	-	Jaune	-
	0.15	-	Jaune	-
FA₃	0.09	-	Jaune claire	-
FA₄	0.11	-	Bleue claire	-
FA₅, FA₆, FA₇	-	-	-	-
FB₁	-	-	-	-
FB₂	0.43	Bleue claire	Jaune	-
FB₃	0.11	-	Jaune	-
	0.46	Bleue claire	-	-
FB₄	0.48	Bleue claire	-	-
	0.77	Bleue claire	-	-
FB₅	0.18	Marron	Jaune	-
	0.49	Bleue claire	-	-
	0.77	Bleue foncée	-	-
FB₆	0.15	Marron	Jaune	-
	0.49	Bleue foncée	-	-



FB₇	0.78	Bleue foncée	-	-
	0.17	Marron	-	-

Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation chimique
14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1	14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1	14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
a) 7) FN ₁ . 8) FN ₂ . 9) FN ₃ . 10) FN ₄ . 11) FN ₅ . 12) FN ₆ . 13) FN ₇ .		
Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation chimique
14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1	14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1	14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
b) 7) FA ₁ . 8) FA ₂ . 9) FA ₃ . 10) FA ₄ . 11) FA ₅ . 12) FA ₆ . 13) FA ₇ .		



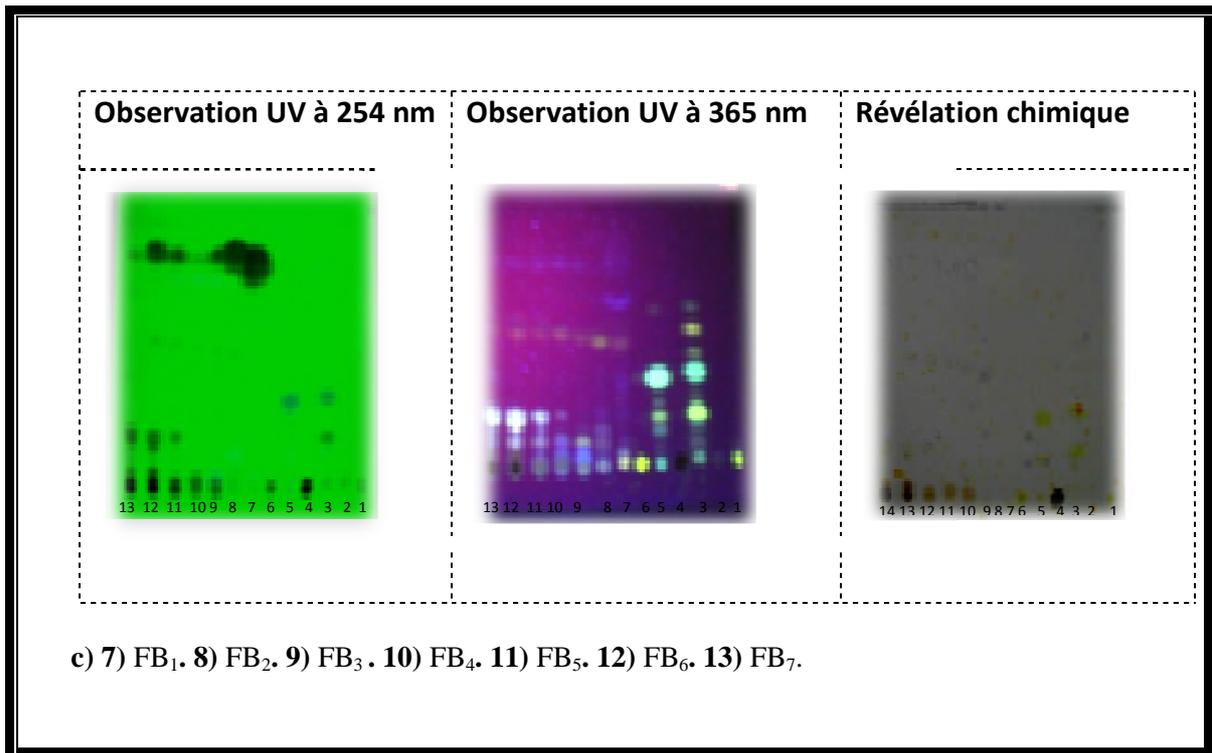


Figure 39 : Chromatogrammes obtenus avec le système (HED) des différentes fractions alcaloïdiques. 1) Berbérine, 2) Scopolamine, 3) Trihydropalmitine, 4) Boldine, 5) Coridaline, 6) Palmitine.

Les standards tels que la berbérine, la scopolamine, la boldine, et la palmitine n'ont pas été visibles dans ce système de migration (**figure 39**) sous les deux longueurs d'onde ni par le réactif de Dragendorff.

Les standards la trihydropalmitine et la coridaline ont montré différentes taches de couleurs différentes sous UV, cela est peut être du à une décomposition de ces standards dans ce système de migration.

Une faible distance de migration (Rf) des différents extraits est enregistrée (**tableau XVI**) cela peut être expliqué par une faible solubilité des alcaloïdes dans ce système de solvant de migration qui est apolaire.



En termes de nombre de tache on distingue sur le chromatogramme de la **FN 30 spots** à 254 nm et **20 spots** à 365 nm, alors que sur le chromatogramme de la **FA** on ne visualise aucun spot à 254 nm, et seulement **04 spots** à 365 nm, alors que sur celui de la **FB** on observe **11 spots** à 254 nm et **04 spots** à 365 nm.

La vaporisation du réactif de Dragendorff n'a pas permis de mettre en évidence des quantités détectables d'alcaloïdes seulement **06 spots** de la **FN** ont réagi positivement avec le Dragendorff.

Tableau XVII : comparaison entre des différents systèmes d'élution des CCM.

<i>Système de migration</i>	<i>Nombre de taches (254 nm)</i>	<i>Nombre de taches (365 nm)</i>	<i>Nombre d'alcaloïdes</i>
<i>Ether de pétrole-Acétone-Triéthylamine (EAT)</i>	➤ FN (19) ➤ FA (11) ➤ FB (10)	➤ FN (21) ➤ FA (11) ➤ FB (11)	➤ FN (7) ➤ FA (8) ➤ FB (10)
<i>Chloroforme -méthanol-NH₄ OH (CMN)</i>	➤ FN(14) ➤ FA (18) ➤ FB (8)	➤ FN (19) ➤ FA(18) ➤ FB (7)	➤ FN (2) ➤ FA (11) ➤ FB (4)
<i>Chloroforme-Méthanol-Acide acétique (CMA)</i>	➤ FN (14) ➤ FA (22) ➤ FB (22)	➤ FN (13) ➤ FA (17) ➤ FB (12)	➤ FN (06) ➤ FA (07) ➤ FB (07)
<i>Hexane-Ethyle acétate-Diéthylamine (HED)</i>	➤ FN (30) ➤ FA (0) ➤ FB (11)	➤ FN (20) ➤ FA (4) ➤ FB (4)	➤ FN (6) ➤ FA (0) ➤ FB (0)

Dans le cadre d'une étude préliminaire la CCM va permettre de sélectionner le mélange de solvant à employer pour permettre une séparation efficace des différents extraits alcaloïdiques.



L'éluant étant un mélange d'un solvant polaire et apolaire ce qui permet de faire migrer même les composants qui ont une affinité avec la phase stationnaire.

Les solvants polaire comme l'eau et le méthanol interagissent avec les sites actifs de la surface de l'adsorbant ce qui augmente le Rf, l'ammoniaque aussi est utilisé pour désactiver la surface de l'adsorbant lorsque le soluté est basique comme dans le cas des alcaloïdes. L'ammoniaque ou les amines sont ajoutés à la phase mobile, ces additifs basiques jouent le rôle d'ions supprimeurs et des bloqueurs de silanol qui empêchent une interaction des solutés base avec la surface silanol et améliorent l'efficacité de la séparation (**Petruczynik et al, 2010**).

Les résultats obtenus sont liés directement à la diversité quantitative et qualitative des composés présents dans les trois fractions

La révélation physique des plaques, nous a permis l'observation de nombreux spots avec des couleurs variables, sous les deux longueurs d'onde **254 nm** et **366 nm**.

Les spots réagissant positivement avec le Dragendorff (couleur orange) confirment la présence d'alcaloïdes.

D'après les résultats du **tableau XVII** et l'allure des chromatogrammes après élution par les différents systèmes de solvant qui montrent des fluorescences de couleurs différentes, Les systèmes de migration (**CMN, CMA, HED**) n'ont pas donné une meilleure résolution pour tous les extraits FN, FA, FB en comparaison avec le système éther de pétrole- acétone-triéthylamine (**EAT**), toutefois la révélation physique nous a permis l'observation de différentes taches sous les deux longueurs d'onde **254 nm** et **365 nm**.

Donc la révélation UV des plaques développées dans les quatre systèmes employés, nous a renseignées sur la meilleure résolution du système **EAT** par rapport aux autres, dans la séparation des 3 fractions alcaloïdiques des extraits de *F. agraria*

en terme de nombre de taches obtenus, pour la **FN** le système **HED** a donné un nombre de spots égale à 30 sous UV à 254 nm et **22 spots** à 365 nm ,pour la **FA** le système **CMN** a donné une meilleure séparation avec **18 spots** sous les deux longueurs d'onde, alors que pour la **FB** c'est le système **CMA** qui a donné une meilleure séparation avec **22 spots** à 254 nm et **12 spots** à 365 nm.



Selon le nombre de taches, la fraction FN semble être plus riche quantitativement que la fraction FB et FA.

VII. La séparation des composés phénoliques par chromatographie sur couche mince

Trois systèmes de solvant ont été utilisés pour séparer les composés phénoliques par CCM après fractionnement de l'extrait aqueux par chromatographie sur colonne (CC). Les résultats ont donné une série de spots, qui ont été caractérisés en se basant sur les couleurs des taches apparues sous lampe UV (254nm et 365nm), la révélation par la vanilline sulfurique et la comparaison de leurs « **Rf** » avec les étalons employés.

Les classes des composés phénoliques caractérisées avec les trois systèmes sont résumées dans les **Tableaux XVIII, XX, XXI** et les figures qui leurs correspondes **40, 41, 42** respectivement.

VII.1. Système EEA

Le tableau XVIII donne les caractéristiques des composés phénoliques observés sous UV après séparation par CCM dans le système Ethyle acétate-Eau-Acide formique (85 :15 :10).

Tableau XVIII : Chromatographie sur couche mince de l'extrait des composés phénoliques développée dans le système Ethyle acétate-Eau-Acide formique (EEA) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.

Les fractions	Rf	Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation par la vanilline sulfurique
Acide caféique	0.91	Marron claire	Grise	Grise
Acide p-coumarique	0.94	Bleue nuit	-	Grise
Acide gallique	0.90	Bleue nuit	Marron foncée	Orange claire
Acide fumarique	0.93	-	-	-
Acide 4-hydroxybenzoïque	0.96	Bleue nuit	-	-
Rutine	0.18	Bleue foncée	Marron	Jaune claire
Catéchine	0.90	Bleue foncée	Marron foncée	Rouge



Naringénine	0.25	Jaune foncée	Jaune claire	Rouge
Quercétine	0.96	Bleue foncée	Marron foncée	Orange
F ₁	0.18	Jaune	Jaune	-
F ₂	0.08	Jaune foncée	Jaune foncée	-
	0.15	Jaune claire	Jaune claire	Orange claire
	0.18	Jaune foncée	Jaune foncée	Orange claire
	0.28	Jaune claire	Jaune claire	-
F ₃	0.49	Jaune claire	Jaune claire	-
	0.07	Jaune claire	Jaune claire	-
	0.08	Jaune foncée	Jaune foncée	-
	0.15	jaune	jaune	Orange claire

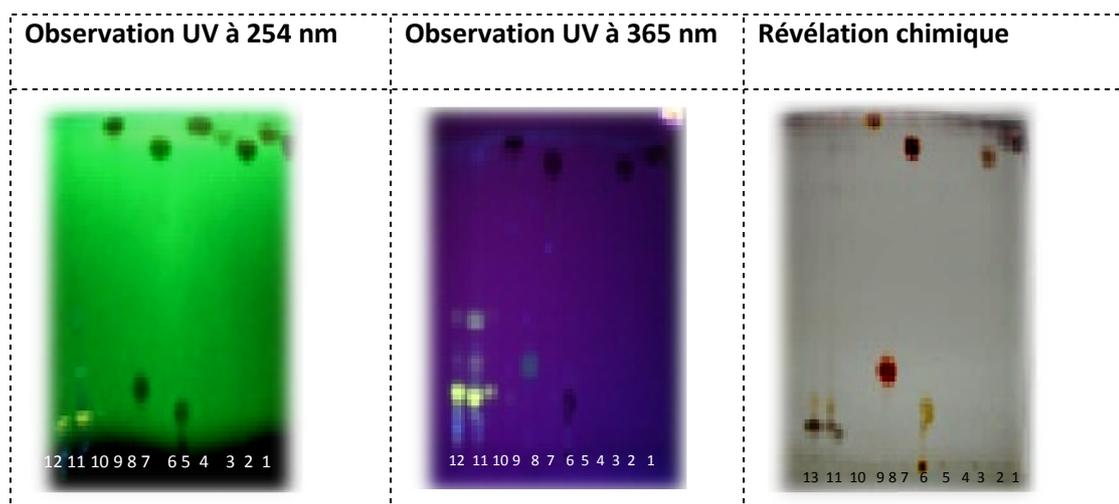


Figure 40 : Chromatogramme obtenu avec le système éthyle acétate -eau-acide formique (EEA) après révélation chimique et physique.

1) Acide caféique. 2) Acide p-coumarique. 3) Acide gallique. 4) Acide fumarique. 5) Acide 4-hydroxybenzoïque. 6) Rutine. 7) Catéchine. 8) Naringénine. 9) Quercétine. 10) F₁. 11) F₂. 12) F₃

La visualisation des chromatogrammes (**figure 40**) sous UV à 254 nm et 365 nm dans une chambre noire montrent des fluorescences de couleurs différentes pour les différentes fractions y compris les étalons.



En termes de nombre de spots dans ce système on observe **09 spots** sous les deux longueurs d'onde.

L'allure du chromatogramme montre une bonne séparation et résolution pour les fractions et les standards, par contre l'acide fumarique n'est pas visible sous les deux longueurs d'onde.

En se basant sur la comparaison du rapport frontal (Rf) (**tableau XVIII**), on constate qu'un spot de la sous fraction F₁ et un spot de la sous fraction F₂ possède un **Rf = 0,18** identique à celui de la rutine.

VII.2.Système EEAA :

Ce système de migration est un mélange Ethyle acétate-Eau-Acide acétique-Acide formique (100 : 26 : 11 :11) les résultats obtenus après élution sont reportés sur le **tableau XX**

Tableau XX : Chromatographie sur couche mince de l'extrait des composés phénoliques développée dans le système Ethyle acétate-Eau-Acide formique-acide formique (EEAA) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.

Les fractions	Rf	Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365 nm	Révélation par la vanilline sulfurique
Acide p-coumarique	0.89	Bleue foncée	Jaune claire	orange
Acide gallique	0.84	Bleue foncée	Marron noire	rouge
Naringénine	0.49	Bleue foncée	Jaune verte	rouge
Quercétine	0.94	Bleue foncée	Marron noire	rouge foncée
F₁	0.36	-	Bleue claire	-
	0.42	-	Jaune claire	-
	0.47	-	Jaune foncée	-
	0.57	-	Jaune claire	-
	0.66	-	Jaune foncée	-
	0.96	Bleue foncée	Jaune claire	-
	F₂	0.36	-	Bleue claire



	0.42	Bleue claire	Jaune claire	-
	0.47	-	Jaune foncée	-
	0.54	-	Jaune claire	-
	0.65	-	Jaune foncée	-
	0.98	Bleue foncée	Jaune claire	-
F₃	0.49	-	Jaune foncée	grise
	0.53	Bleue claire	Jaune claire	grise
F₄	0.33	Bleue claire	Jaune claire	-grise
	0.43	Bleue claire	Jaune claire	-
	0.47	Bleue claire	Jaune claire	-
	0.54	Bleue claire	Jaune claire	-
	0.96	Bleue foncée	Bleue claire	-
F₅	0.38	-	Jaune claire	Jaune claire
	0.45	-	Jaune claire	Jaune claire
	0.49	-	Jaune claire	Jaune claire
	0.54	Bleue claire	Jaune foncée	-
F₆	0.38	-	Jaune claire	grise
	0.43	-	Jaune claire	-
	0.48	-	Jaune claire	-
	0.54	Bleue claire	Jaune foncée	-
F₇	0.30	Bleue claire	-	grise
	0.36	Bleue claire	-	-
	0.42	Bleue claire	Jaune claire	-
	0.95	Bleue foncée	Bleue claire	-
F₈	0.44	Jaune claire	Jaune claire	jaune
	0.50	Jaune foncée	Jaune foncée	grise
	0.54	Bleue ciel	Bleue claire	grise
F₉	0.44	Jaune foncée	Jaune foncée	-



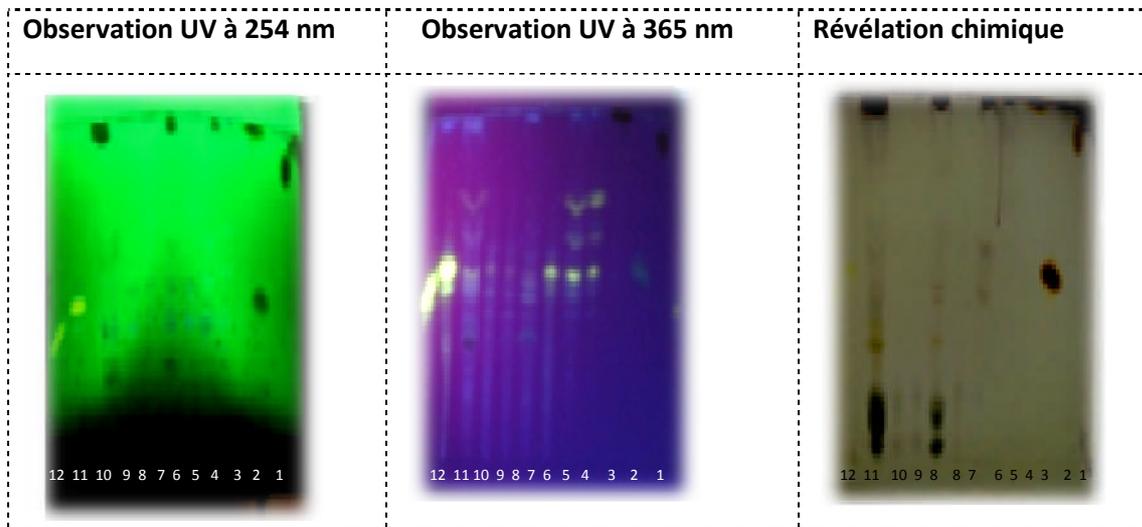


Figure 41 : Chromatogramme obtenu avec le système éthyle acétate -eau-acide acétique- acide formique (EEA) après révélation chimique et physique.
1) Acide p-coumarique.**2)**Acide gallique.**3)** Naringénine.**4)** Quercétine.**5)** F₁.**6)** F₂.**6)** F₃.**7)** F₄.**8)** F₅.**9)** F₆.**10)** F₇.**11)** F₈.**12)** F₉.

Les chromatogrammes (**figure 41**) montrent une bonne séparation et résolution par rapport au système précédent EEA avec des spots de couleurs et de distances de migration différentes

Les standards utilisés sont visibles sous les deux longueurs d'onde et révélés par la vanilline sulfurique, en terme de nombre de taches ce système a permis de visualiser **19 spots** à 254 nm et **33 spots** à 365 nm, **11 spots** sont révélés par la vanilline sulfurique.

En se basant sur la comparaison des Rf des différentes sous fractions, on note la présence de la naringénine avec un Rf = 0,49 identique à celui d'un spot de la sous fraction F₃ et F₅, un spot de la sous fraction F₆ (Rf = 0,48) peut aussi correspondre à la naringénine.

Un spot de la sous fraction F₇ (Rf = 0,95) peut correspondre à la quercétine qui à un Rf =0,94.



VII.3. Système EME :

Ce système consiste en un mélange Ethyle acétate-Méthanole- Eau (100-15-13), le tableau XXI donne les caractéristiques des plaques sous UV et après la révélation chimique.

Tableau XXI : Chromatographie sur couche mince de l'extrait des composés phénoliques développée dans le système Ethyle acétate-Méthanol-Eau (EME) après observation sous UV à 254 nm et 365 nm et la révélation chimique.

Les fractions	Rf	Observation UV à 254 nm	Observation UV à 365nm	Révélation par la vanilline sulfurique
Acide p- coumarique	0.84	Bleue foncée	Marron claire	grise
Acide gallique	0.81	Bleue claire	Marron foncée	grise
Acide caféique	0.85	Bleue foncée	Bleue violet	grise
F₁	0.30	Bleue claire	Jaune foncée	jaune
	0.35	Bleue claire	Jaune claire	jaune
	0.55	-	Bleue claire	-
	0.61	-	Jaune claire	-
	0.65	Bleue claire	Jaune claire	grise
	0.73	Bleue claire	Jaune claire	-
	0.79	-	Bleue claire	-
	0.83	-	Jaune claire	-
	0.85	-	Jaune foncée	-
F₂	0.08	-	Jaune claire	-
	0.59	-	Jaune claire	jaune
	0.66	Bleue claire	Bleue claire	grise
	0.73	Bleue claire	-	grise
	0.77	-	Jaune claire	grise
	0.80	-	Jaune claire	grise
	0.91	-	Bleue claire	-
	0.93	Bleue foncée	-	-
F₃	0.19	-	Jaune	noire



	0.32	-	Jaune	jaune
	0.36	Bleue claire	-	jaune
	0.40	Bleue claire	-	-
	0.63	Bleue claire	-	-
	0.96	Bleue foncée	-	-
F₄	0.35	Bleue foncée	-	grise
	0.41	Bleue foncée	-	grise
	0.64	Bleue claire	-	-
	0.94	Bleue foncée	Jaune claire	-
F₅	0.28	Bleue foncée	-	grise
F₆	0.35	Bleue foncée	Jaune claire	jaune
F₇	0.17	-	Jaune	noire
	0.23	-	Bleu	jaune
	0.38	Bleue claire	-	-
F₈	0.12	Bleue foncée	Jaune	-
	0.20	Bleue foncée	Bleue claire	-
F₉	0.17	Orange	Jaune	-
F₁₀	0.12	Orange	Jaune	-
	0.18	Bleue claire	Bleue claire	-



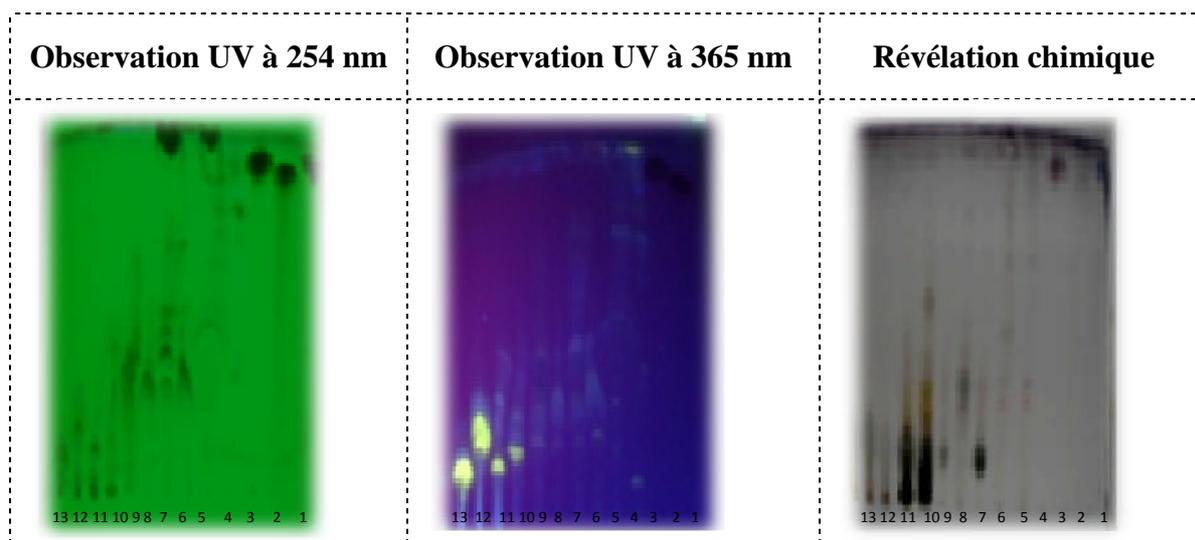


Figure 42 : Chromatogramme obtenu avec le système (EME) après révélation chimique et physique.

1) Acide p-coumarique .2) Acide gallique .3) Acide caféique .4) F₁ .5) F₂ .6) F₃ .7) F₄ .8) F₅ .9) F₆ .10) F₇ .11) F₈ .12) F₉ .13) F₁₀.

L'allure des chromatogrammes (**figure 42**) montre une bonne séparation avec différents spots sous les deux longueurs d'onde, on terme de nombre de spots on distingue **23 spots** à 254 nm et **26 spots** à 365 nm avec des distances de migration différentes.

La F₁ montre un spot de R_f = 0,85 identique à celui de l'acide caféique, un autre spot de la F₁ avec un R_f de 0,83 peut correspondre à l'acide p- coumarique (R_f = 0,84).

Un spot de la sous fraction F₂ (R_f = 0,80) peut également correspondre à l'acide gallique (R_f = 0,81).

Tous les standards ont tous migré et observé sous les deux longueurs d'onde et révélé par la vanilline sulfurique.



Tableau XXII : Comparaison entre les résultats les différents systèmes d'éluion par CCM

<i>Système de migration</i>	<i>Nombre de taches (254 nm)</i>	<i>Nombre de taches (365 nm)</i>	<i>Révélation chimique</i>
Ethyle acétate-Eau-Acide formique	09	09	07
Ethyle acétate-Eau-Acide acétique-Acide formique	19	33	11
Ethyle acétate-Méthanol-Eau	23	26	17

Dans le système « Ethyle acétate - Eau - Acide acétique - Acide formique » (**EEAA**), le criblage physique en CCM de notre extrait aqueux a permis de mettre en évidence la présence d'un nombre important de taches, à des couleurs distinguables et significatives sous les deux longueurs d'onde **254 nm** et **365nm** (**Figure 50**). Cette révélation physique nous a informés sur la richesse de notre plante en composés phénoliques, comme elle a confirmés l'abondance des Acides organiques dans la partie aérienne de cette plante (**Sousek et al, 1999**).

Les spots observés sur les chromatogrammes sous UV peuvent correspondre à différentes classes de composés phénoliques.

Certaines taches n'ont pas presque subi une éluion, cela peut s'expliquer par le fait que ces taches sont des flavonoïdes apolaires (**Benkiniouar, 2006**).

Certaines classes phénoliques notamment « les Flavanes » nécessitent une révélation chimique spécifique (Réactif de Neu) pour les mettre en évidence (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Des taches ont été identifiées par comparaison de leurs « Rf » a ceux des standards élués sur la même plaque, à savoir la « rutine » (Rf = 0,18), « l'acide caféique » (Rf = 0,85), « la naringénine » (Rf = 0,49).

L'intensité des spots nous renseigne sur la concentration de la molécule en question. *F. agraria* semble être riche en « acide caféique », en « Acide fumarique », en « acide coumarique » et en « rutine », chose qui a été déjà confirmée par les travaux de **Sousek et al., (1999)**.



La classe correspondant à chaque tache a été déterminée par référence à la littérature en ce basant sur la couleur sous UV (**Tableau XXIII**) (**Markham, 1982 ; Chantal et al, 2009**).

Tableau XXIII : Composés phénoliques probable identifier par CCM (**Markham, 1982**).

Couleur sous UV	Composé probable
Rouge	Anthocyanidine 3 glucoside
Rose	Anthocyanidine 3,5 glucoside
Orange	Anthocyanidine 3 glucoside
Orange pale	Anthocyanide 3 glucoside
Jaune	Flavonols
Jaune pale	Flavonols
Vert	coumarine
Bleu sombre	Flavonols, flavonones, aurone
Bleu vif	Hydroquinone
Bleu pale	Acide phénol
Mauve	Flavonol, flavonone, isoflavonone, flavone, flavane
Violet	Flavonols, flavonone, isoflavonone, flavone
Pourpre sombre	chalcone

L'observation sous UV à 365 nm nous a permis une bonne visualisation des composés phénoliques, vu que la majorité absorbe à cette longueur d'onde (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

La séparation des composés phénoliques est en relation avec le choix du système de migration.

Un métabolite polaire est mieux élué en employant un système de migration de même charge autrement dit, une molécule polaire liée au groupement OH du gel (aux groupements Silanols de surface) sera entraînée par un système de migration polaire qui favorise la rupture de cette liaison. Par contre quand l'éluant est de faible polarité, la liaison sera moins altérée et par conséquent une mauvaise séparation des constituants de l'échantillon soumis à l'analyse sera observée. (**Wink, 1999 ; Mohammad et Bhawani, 2007**).



Il est important de signaler qu'on ne peut pas confirmer que *F. agraria* contient en total que **33** fractions phénoliques et **07, 11, 10** alcaloïdes dans les fractions FN, FA, FB respectivement. On peut suggérer que certains composés phénoliques ou alcaloïdes n'ont pas été observés par révélation physique vu leurs concentration dans les fractions (une faible concentration) ou encore, certaines substances nécessitent des révélateurs chimiques spécifiques.



Conclusion

Conclusion

Les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives. Plus de 85000 métabolites secondaires sont déjà connus, la plupart sont des molécules pharmaceutiquement très actives, certaines sont des médicaments connus à vertus thérapeutiques avérés. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale, les plus grandes firmes pharmaceutiques investissent d'importants capitaux pour trouver de nouvelles substances chimiques afin de les commercialiser.

L'extraction des alcaloïdes et des composés phénoliques de la partie aérienne d'une plante médicinale locale *Fumaria agraria* nous révèle que la plante est riche en alcaloïdes avec un rendement de **0.8%** qui est comparable aux taux trouvés lors de différentes études phytochimiques effectuées sur d'autres espèces du même genre, les fractions obtenues par partition dans divers solvants montrent des taux variables la fraction **FN** (chloroformique) enregistre le rendement le plus élevé de **0.4%** suivi de la **FB** (fraction basidifiée) avec un taux de **0.25%** puis la **FA** (fraction acidifiée) avec un taux de **0.04 %**.

Le taux de composés phénoliques est de **4.28 mg EAG/g d'extrait** alors que celui des flavonoïdes est de **0.21 mg AQ/g d'extrait** ces taux restent supérieurs à ceux trouvés chez d'autres espèces du genre *Fumaria*.

La meilleure activité anti-radicalaire contre le radical DPPH est enregistrée avec l'extrait d'alcaloïdes totaux suivi des fractions FA, FB, FN avec des taux respectifs d'inhibition allant de **80,49 %** pour les alcaloïdes totaux à **55.41 %** pour la fraction FN la moins active.

Concernant les composés phénoliques les acides phénols exercent un puissant effet scavenger contre le radical DPPH avec un taux d'inhibition de **83.66%** à une concentration de **300 µg/ml** alors que le taux enregistré avec les composés phénoliques à la même concentration n'est que de **67,92 %**, les acides phénols montrent aussi un meilleur pouvoir réducteur.

Les résultats de l'activité antioxydante des différents extraits alcaloïdiques et composés phénoliques étudiés *in vitro* par deux méthodes différentes, effet scavenger contre le radical DPPH et le pouvoir réducteur montrent que les extraits alcaloïdiques de notre plante par rapport aux composés phénoliques exercent un fort potentiel antioxydant.



A fin d'optimiser les paramètres conduisant à la meilleure séparation des constituants de la plante, le fractionnement sur colonne nous à permis l'obtenir jusqu'à 10 sous fractions en fonction du système d'élution utilisé ,l'analyse de chaque sous fraction par CCM nous à permis de définir le système d'élution optimal quand à la résolution (allure du chromatogramme) en l'occurrence le système **EAT** (**E**ther de pétrole-**A**cétone-**T**riéthylamine) pour les alcaloïdes et le système **EEAA** (**E**thyle acétate-**E**au-**A**cide acétique-**A**cide formique) pour les composés phénoliques .

La comparaison avec les standards utilisé en CCM, nous permet de suggérer la présence éventuelle de **06** alcaloïdes différent dans notre extrait alcaloïdique (la berbérine, la scopolamine, la trihydropalmitine, la boldine, la coridaline, la palmitine) et de **04** composés phénolique (la rutine, la naringénine, la quercétine, l'acide gallique).

En perspective il serait intéressant d'identifier les structures moléculaires des fractions isolées par la combinaison d'autres méthodes physico-chimique a savoir la spectrophotométrie UV-visible , la RMN et ses séquences bidimensionnelles ainsi que la spectrométrie de masse qui peuvent donner une indication importante sur la nature des composés et leurs mode de substitution. Toutefois la fluorescence sous lumière UV et le comportement chromatographique en CCM dans différents systèmes de solvants nous donnent déjà des informations préliminaires utiles.

Il serait également intéressant de réaliser d'autres études plus approfondies et complémentaires de diverses activités biologiques des alcaloïdes et des composés phénoliques de cette plante *in vitro* et *in vivo*. D'autre part la détermination de nouvelles substances bioactives naturelles peut répondre à différents problèmes de la santé et constitue une alternative ou un complément des médicaments synthétique à effet secondaire indésirable.



Références bibliographiques

Références bibliographique

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

Ali, S.S., Kasoju, A., Luthra, A., Singh, H., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U.(2008).Indian medicinal herbs as sources of antioxidants .*Food research international.*(**41**).1-15.

Alqasoumi, s., Al-dosari, M., Alsheikh, A.M. and Abdel-Kader, M.S.(2009).Evaluation of the hepatoprotective effect of *Fumaria parviflora* and *Momordica balsamina* from Saudi folk medicine against experimentally induced liver injury in rats .*Research journal of Medicinal plant* **3(1)**.9-15.

Amarowicz, R ., Estrella, I ., Hernandez, T ., Roberdo, S ., Troczynska, A ., Kosinska, A ., Pegg , R.B . (2010). Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaria*).*Food chemistry*.xxx-xxx.

Amarowicz, R ., Pegg, R.B ., Pahimi-Moghaddme, P ., Barl, B., Weil, J.A.(2004).Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies.*Food chemistry.*(**84**).p: 551-562.

Ammar, R.B., Bhourri, W., Sghaier, M.B., Boubaker, J., Skandrani, I., Neffati, A., Boulilel, I., Kilani, S., Rariote, A., Chekir-Ghedira, L., Dijoux-Franca, M., Ghedira, K. (2009).Antioxidant and free radical –scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L (*Rhamnaceae*) : A structure –activity relationship study. *Food chemistry.* (**116**). 258-264.

Amié, D., Davidovié-Amié, D., Bešlo, D., Trinajstić, N. (2003).Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids .*Croatica chemical acta* **76(1)**.55-61.

Anrti, A.E., Messouri, I., Bouktaib, M., Alami, R.E., Bolte, M., Bali, B.E., Lachkar, M.(2004)Isolation and X-ray crystal structure of tetrahydroisoquinoline alkaloids from *Calycolome villosa* Sub sp.*Intermedia molecules* .(**9**).650-657.

Anton, R., Bernard, M.(2003).Plantes thérapeutiques 2^{ème} édition *Tec et doc*. Paris .p:229-230.

Aquilano, K., Baldelli, S., Rotillo, G., Ciriolo, M.R. (2008).Role of nitric oxide synthases in parkinson's disease: A review on the antioxidant and anti -inflammatory activity of polyphenols .*Neurochem Res (33)*.2416-2426.

Ara, N., Nur, H. (2009). In vitro antioxidant activity of methanolic leaves and flowers extracts of *Lippia alba*.*Research. journal of medicine and medical sciences* .**4(1)**.107-110.

Baerheim, A., Svendsen, R., Verpoorte,(1983).Chromatography of alkaloids : Thin layer chromatography.*Edition :illustrée publié par Elsevier*.P: 11-17.

Bahorun, T. (1997).Substances naturelles actives la flore Mauricienne une source d'approvisionnement potentielle .Food agricultural research council,réduit Mauritius.Université de Maurice.

Benkiniowar, R (2006) .Contribution à l'étude des composés phénoliques des labiées de la flore Algérienne (these de doctorat) de l'université de Constantine P : 58

Bennick, A. (2002).Interaction of plant polyphenols with salivary proteins .*Critical Reviews in Oral Biology Medicine*.**13 (2)**.184-196.

Benzie, I.F.F. and Straine, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a mesure of antioxidant power: The FRAP Assay analytical biochemistry 239, 70-76.

Berthillier, A. (1972).La chromatographie et ses applications .Dunod. Paris.p :21-24.

Bhuiyan, M.A.R ., Hoque, M.Z ., Hossain, S.J. (2009) . Free radical scavenging activities of *Zizyphus mauritiana* .*Would Journal of Agricultural Science* **5(3)**. P: 318-322.

Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W. (2001).Dietary agents in cancer Prevention: flavonoids and isoflavonoids.*pharmacology et therapeutics (90)*.157-177.

Bobbitt, J.M., Schwarting, A.E., Gritter, R.J. (1972).Introduction à la chromatographie .*Gauthier-villars éditeur*.Paris.P :02-03.

Bougoffa, K. (2007).Identification par HPLC des polyphénols et alcaloïdes de deux espèces de *Fumaria* et leurs activités antioxydantes et anti-péroxydase. Thèse de magister. Université de Bejaia .145.95-98

Bruneton, J. (1987).Éléments de phytochimie et de pharmacognosie .1^{ère} édition .*Technique et Documentation Lavoisier* p : 345-510.

Bruneton, J. (1993).Phytochimie, plante médicinale, pharmacognosie. 2^{ème} édition .*Lavoisier*. p : 224-228.

Bruneton, J. (1999).Phytochimie, plante médicinale, pharmacognosie. 3^{ème} édition .*Technique et documentation Lavoisier*. p : 783-800.

Burgot, G., Burgot, J. (2006).Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications méthodes chromatographiques, électrophorèse et méthodes spectrales 2^{ème} édition *Tec et Doc Lavoisier* .Paris P :04-77.

Choi, Y., Jeong, H., Lee, J. (2007).Antioxydant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea .*Food chemistry*. (103). 130-138.

Ciesla, L., Waksmundzka-hajnos, M. (2009).Two dimensional thin layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites .*Journal of chromatography A*. 1216 .1035-1052.

Dawidowicz, A., Wianowska, D., Baramiak, B. (2006).the antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* .L(antioxidant properties of extracts) .*LWT* (39) p: 308-315.

Debuigne, G. (1991). Dictionnaire des plantes qui guérissent. *Edition Larousse*. P : 74.

Dellile .A. L. (2010) : les plantes médicinales d'Algérie .*Edition Berti* .Alger p : 239.

Delluc, L. (2004).Identification et caractérisation fonctionnelle de deux gènes régulateurs du métabolisme des composés phénoliques de la baie de raisin. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux 1.

Deysson, G. (1979).Organisation et classification des plantes vasculaires .deuxièmes partie systématique .*Edition Sedes* .Paris.p :277-279.

Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K., Maiga, A. (2004). Etude de constituants de feuilles de *Ziziphus mauritiana* .Lam (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali .*C.R.chimie (7)*.1073-1080.

Dimitrios, B. (2006).Source of natural phenolic antioxidants *Trends in food science et technology (17)* 505-512.

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

Doat, J. (1974). Application de la chromatographie sur couche mince à l'analyse des gommés et des bois tropicaux .*Revue Boie et forêts des Tropiques* n° 156.

Erdogan, T.F. (2009).Brines hrimp lethality bioassay of *Fumaria densiflora* DC and *Fumaria officinalis* L.extractes.Hacettepe university.*Journal of the faculty of pharmacy. (28)* N°2 125-132.

Farzana,A. (1997).Isolation and structural studies on the chemical constituents of *Withania somnifera*,*Fumaria flabellate* and X-ray diffraction studies these de doctorat .International centre for chemical sciences H.E.J.Reseach institute of chemistry université of Karachi.

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

Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., Caristi, C.(2007).Flavonoid composition of citrus juices molecules (12).1641-1673.

Ghedira, K. (2005).Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie. N° (4)*.162-169.

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

Goetz, P., Ghedira, K., Le Jeune, R. (2009).*Fumaria officinalis* L. (Fumariaceae).*Phytothérapie*. (7).221-225.

Golkiewicz, W., Wawrzynowicz, T.(1970).Adsorption chromatography of alkaloids of *Fumaria officinalis*.*Chromatographia* 3.

Grémy, F., Leterrier, F. (1966).Biophysique générale et médicales tome 1 .*Médecine –science Flammarion*.Paris.p :390-399.

Greave, J.D., Berthou , F., Prost, M. (1986). Méthodes chromatographique couplée à la spectrométrie de masse. *Massson* .Paris .26-29.

Griffin, S.P., Bhagooli, R.(2004).Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay.*Journal of experimental Marine Biology and Ecology* (302).201-211.

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

Guignard, J.L.(2000).Biochimie végétales 2^{ème} édition .Dunod.Paris .

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

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004).Polyphénols végétaux sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif .*Phytothérapie* .Numéro (1).3-6.

Hoffmann, L. (2003).Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes : analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMTT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase ,l'hydroxynnamoyl-coa : shikimate / quinatehydroxynnamoyl transférase(HCT) .thèse dedoctorat de l'université de Louis Pasteur-Strasbourg I.

Houghton, P.J., Rahman, A. (1998). Laboratory Hand book for fractionation of natural extracts .Chapman et Hall, Londre. *1^{ère} edition* .29-31

Hwang, J.M ., Wang, C.J ., Chou, F.P ., Tseng, T.H., Hsich, Y.S ., Lin, W.L ., Chu, C.Y. (2002). Inhibitory effect of Berberine on tert-butyl hydroperoxide induced oxidative damage in rat liver. *Arch Toxicol.* **76.**646-670.

Huang,D .,Ou,B ., Prior,R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assay. *J.Agric.Food Chem.* (**53**),P :1841-1856.

Iserin, P. (1999): l'action des plantes médicinales .Encyclopédie des plantes médicinales *larousse*.Edit p: 10

Jauzein, P.(1995). Flore des champs cultivés .Ed: *INRA*.Paris.P: 554-555.

Karou, D., Dicko, M.H ., Simporé, J., Traore, A.S. (2005) . Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomédicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology* Vol (8) p: 823-828.

Komaszewska, E.,Petruczynik, A .Joswiak, G.,Kesik, T., Waksmundzka-Hajnos,M.(2007).Quantitative determination of protopine in *Fumaria officinalis* extracts by high performance liquid chromatography university Mariae Curie Sklodowska Lublin-Polonia section+ DDD vol xx N°2 (10)

Kouamé, J ., Gnoula, C.,Palé, H., Bassolé, H., Guissou, I.P ., Simporé, J., Nikiéma, J.B.(2009) :Etude des propriétés cytotoxique et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J.F.Gmel(Combretaceae) .*Science et technique*,**32** n° 1 et 2

Kouassi, A. (2007). Etude phytochimique de cinq plante de cote d'ivoire *Zanthoxylum atchoum*, *Zanthoxylum psammophilum*, *Zanthoxylum mezoneurispinosum*, *Baphia bancolensis*, *Rhaphioshyllis beninensis*. Thèse de doctorat de l'université de Cocody-Abidjan

Kumaran, A., Joel Karunakaran, R. (2006).Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food chemistry*. (97). 109-114.

Küplei, E., Kosar, M., Yesilada, E., Hüsü, K., Baser, C., Baser, C. (2002).A comparative study on the anti-inflammation ,antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species.*Life sciences*(72),645-657.

Labbé, D (2008).Les flavonoïdes d'origine alimentaire et le cancer inhibition de l'angiogénese tumorale et du potentiel invasif des médulloblastomes .thèse de doctorat de l'université du Québec à Montréal.

Lacourt, A., Sommereyns, G .De Greyndt, E. Baruh, J., Gillard, J. (1949). Le pouvoir séparateur des solvants organiques dans la séparation chromatographique quantitative des composés minéraux à l'échelle de Gamma. Centre de microchimie de l'université de Bruxelles.

Laguerre, M., Lopez-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P. (2007).Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante.*OCL*.vol 4 (5).

Lee, Y., Hwang, W., Lin, S. (2004). Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *platycodon grandiflorum* A De condolle roots .*journal of Ethnopharmacology* (93). 409-415.

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

Lhuillier, A. (2007).Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes Malagaches : *Agaura salicifolia* Hook.Fex olivier,*Agaura Polyphyllia* Backer(Ericaceae),*Tambourissa Trichoohylla* Backer(Monimiaceae) et *Embeliaconcinna* Backer (Myrsinaceae) thèse de doctorat de l'université de Toulouse.

Lidén, M., Fukuhara, T., Rylander, J, Oxelman, B. (1997).Phylogeny and classification of Fumariaceae with emphasis on *Dicentra S.I.*,based on the plastid gene rps 16 intron.*Pl.Syst.Evol*(206).411-420.

Li, W., Cuiping, Y., Jie, F., Kechang, X. (2006). Influence of column chromatography and Soxhlet extraction on the composition of coal pyridine-soluble.*Chinese Journal of analytical chemistry* 34(7). 905-909.

Liu, J., Hu, L., Dong, Z., Hu, Q.(2004).DPPH radical scavenging activity of ten Natural p-Terphenyl derivatives obtained from three Edible Mushrooms indigenous to China .*chemistry et biodiversity* vol (1).

Mahuzier, G., Hammon, M. (1978).Abrégé de chimie analytique.méthodes de séparation .Tome II.*Masson*.Paris. p : 152-159.

Maiza-Benabdesselem, F., Chibane, M., Madani, K., Max, H and Adach.S. (2007).Determination of isoquinoline alkaloids contents in two Algerian species of *Fumaria* (*Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardi*).*African journal of biotechnology* Vol 6 (21).2487-2492.

Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccamand, M., Fritsch, P.(2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments .*Médecine/Science* (20).458-463.

Markham, K.R.(1982).Technique of flavonoid identification .*Biological Techniques*,Ed :Treherne.J.E ; et Rubery P.H.*Academic Press* P :113.

Mbodj, N.A. (2003).étude de l'activité diabétique des extraits acétonique méthanoliques et hexaniques de *Vernonia colorata* (Willd/Drake) composées chez des rats Wistar .thèse de doctorat de l'université de Cheikh Anta de Dakar

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

Mendham, J., Vogel, A.L., Denney, R.C., Toullec, J., Barnes, J.D., Mottet, M., Tomas, M.J.K.(2005).Analyse chimique quantitative de Vogel. *De Boeck et Larcier* .

Meziti, A. (2009).Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L étude in vitro et in vivo. Thèse de magister de l'université d'El-Haj Lakhdar de Batna.

Mohammad,A and Bhawani, S.A.(2007). Silica gel thin layer chromatography separation of cetylpyridinium chloride (CPC) from polyoxyethylene (20) scorbitan monolaurate ,*Acta chromatographica* .(18) p: 238-248.

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

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

Muniz, M.N. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs la (+) -anatoxine-a et la (±) camptothécine .Thèse de doctorat de l'université de Joseph Fourier Grenoble I

Nagendran,B., Kalayana,S, et Samir,S.(2005).Phenolic compounds in plants and agriindustrial by products:Antioxidant activity occurrence and potential user.*Food chem.*(54),p: 1991-1973.

Nacz, M., Shahidi, F. (2006). Phenolic in cereals fruits and vegetables: occurrence extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomédical analysis*. (41). 1523-1542.

Nadal, B.(2009).synthèse et évaluation de nouveaux agents de protection contre les rayonnements ionisants thèse de doctorat de l'université de paris sud .

Obeid,H.K .,Bedgood,d.R .,Prenzler, P.D et Robards, K.(2007).Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: biophenol content antioxidant antimicrobial and molluscicidal activities.*Food chem Toxicol.*(45).1238-1248.

Odabasoglu,F ., Aslan,A ., Cakir,A .,Suleyman,H ., Karagoz,Y ., Halici,M ., Bayir,Y. (2004) . Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *phytotherapie research*.**18**. p: 983-941.

Okafor,J., Ham,R.(1999).Identification ,utilization et conservation des plantes médicinales dans le sud est du Nigeria.*Thème de la biodiversité Africaine*.N°(3).

Orhan, L., özçelik, B., Karaoğlu, T., Sener, B. (2007).Antiviral and antimicrobial profiles of selected isoquinoline alkaloids from Fumaria and Corydalis species .Faculty of veterinary, Ankara University Turkey.

Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R. Akev, N. (2008). Antioxidant activity of Snilax exelsa L. leaf extracts .*Food chemistry*. (110),571-583.

Parsae, H., Shafei, M.N., Boskabady, M.H. (2006). Effects of hydro ethanolic extract of Berberis vulgaris fruit on rabbit isolated .*Heart Daru*.vol (14).N°4.

Pérez, E., Saez, J., Blair, S., Franck,X., Figadère, B.(2004).Isoquinoline alkaloids from Duguetia vallicola stem Bark with antiplasmodial activity.*Letters in organic chemistry* (1).102-104.

Perveen,A and Qaiser,M.(2004).Pollen flora of Pakistan-xl.Fumariaceae *pak.j.bot* **36(3)**.467-473.

Portes, E. (2008).synthèse et études de tetra hydrocurcuminoide propriétés photochimique et antioxydants. Applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle, thèse de doctorat de l'université de Bordeau 1.

Preininger, V. (1986).Chemotaxonomy of papaveraceae and fumariaceae in Brossi A (Ed), the Alkaloids .*Academic Press. New York*.vol (29).1-98.

Rakotondramasy-Rabesiaka, L., Havet, J.L., Porte, C., Faudwt, H. ((2009). Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L-kinetic modelling of influential parameters *.Industrial crops and products (29)*.516-523.

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

Rolland, Y.(2004).Antioxydants naturels des végétaux *.OCL*.vol (11) n°6.

Ronald, L.P., Xianli,W., Schaich,K.(2005).Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements *.J.Agric.Food.chem.***53**.p: 4290-4302.

Rouessac, F., Rouessac, A. (1995).Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes 2^{ème} édition *Masson*.Paris.P : 71-76.

Rouessac, F., Rouessac, A. (2004).Méthodes et techniques instrumentales modernes 6^{ème} édition *.Donod*, Paris P : 100-106.

Saadaoui, B ., Bekir, J ., Akrouit, J., Ammar, S., Mahjoub, A., Mars, M. (2006). Etude de la composition et du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de quelque espèces végétales de l'aride Tunisien *.Revue des régions arides SIPAM* Numero spécial actes du séminaire international « Les plante à parfum, aromatiques et médicinales ».

Salinas, M.J ., Romero, A.T., Blanca, G ., De la Herran, R ., Garrido-Ramos, M ., Ruiz-Rejon, C ., Morales, C ., Ruiz-Rejon, M ., Suârez, V.(2003).Contribution to the taxonomy and phylogeny of *Sarcocapnos* Dc(Fumariaceae).*Plant Sys Evol (237)*.153-164.

Scalzo, R.L. (2008).Organic acid influence on DPPH by ascorbic acid. *Food chemistry*.**107**.40-43.

Schauenberg, P., Paris, F. (1977).Guide des plantes médicinales .*Delachaux et Niestlé* .Paris
p : 08-24

Sener, B. (2002).Molecular diversity in the alkaloids of Turkish *Fumaria* species .*Acta Pharmaceutica Turcica*.**44**.205-212.

Sener, B., Orhan, L. (2005) .Discovery of drug candidates from some Turkish plants and conservation of biodiversity .*Pure Appl.Chem.* (**77**) N°1 .53-64.

Shakil, A. (1998).Isolation and structure elucidation of chemical constituents from *Fumaria indica* *Ferula oopoda* and *Withania somnifera* .thèse de doctorat international centre for chemical sciences H.E.J.research institute of chemistry.Université of Karachi.

Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M. (2009).Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L.*Food chemistry* (**112**).885-888.

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

Siouffi, A., Dauplin, M. Pradeau, D. (2003). Chromatographie planaire *Ed: IT.* p: 1473-14734.

Sarma, B.K., Panday, V.B., Mishra, G.D., Singh, U.P.(1999).Antifungal activity of Berberine iodide a constituent of *Fumaria indica*.*Folia Microbio*.**44**(**2**).164-166.l

Sine, J. (2003).Biochimie biologie séparation et analyse des biomolécules *Ellipses Edition Marketing S.A.P* :99-101

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.R., Simanič, M., Knez, Z.(2005).Phenols proanthocyanidins ,flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities .*food chemistry* .**89** .191-198.

Soares, A.A., Marques de Souza, C.G., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., Gomes de Costa, S.M., Piralta, R.M. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murrik) in two stages of maturity. *Food chemistry* (112).775-781.

Son,S ., Lewis, B.A.(2002).Free radical scavenging and antioxydative activity of caffeic acid amide and ester analogues Structure-activity relationship. *J.Agric food chem.*(50),p: 408-472.

Souège, R. (1961).Ressources médicinales de la flore française tome 1 *Vigot Frères Editeurs*, Paris.p :508-509.

Souley Amadou, B.(2005).étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr.ex DC (Combretaceae). Thèse de doctorat. Université de Bamako.République du Mali.

Sousek, J.,Guédon, D., Adam, T.,Bochorakova, H.,Tabarska, I.,Valka, I and Simanek, V.(1999).Alkaloids and organic acids content of eight *Fumaria* species *Phytochem.Anal*(10).6-11.

Sturm, S., Strasser, E., Stuppner, H. (2006).Quantification of *Fumaria officinalis* isoquinoline alkaloids by nonaqueous capillary electrophoresis electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of chromatography A*.(1112).331-338.

Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Lopez-Romero, J.M .,Najera, F. (2002).Alkaloids from *Fumaria sepium* and *Fumaria agraria* .*Biochemical Systematics and Ecology* (30).263-265.

Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Najera, F.,Manuel, J., Lopez-Romero, J.M.,Cuevas, A. (2004).Phytochemical variations within populations of *Platycapnos saxicola willk.**Biochemical Systematics and Ecology* .(32).565-572.

Susplugas, J., Massa, V., Susplugas, P., Taillade, R., Susplugas, G., Salabert, J. (1975).Fumeterres en Languedoc Roussillon. *Anal.Inst.Bot.Cavanilles* 32(2).233-239.

Tanguy, J. (1971). Quelque aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les Nicotina hypersensible au virus de la mosaïque du tabac souche commune (V.M.T). *Physiol.vég* **9 (2)**.169-187.

Timbo, B(2003). Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* VAHL(MELIACEAE).thèse de doctorat de Bamako .république du Mali.

Orhan, E.I., Sener, B., Musharraf, S.G. (2010). Antioxidant and hepatoprotective activity appraisal of four selected *Fumaria* species and their total phenol and flavonoid quantities .*Experimental and Toxicologic pathology* .xxx-xxx.

Petruczynik, A., Sliwka, K., Waksmundzka-Hajnos, M. (2010). Effect of the vapour phase on the separation of isoquinoline alkaloids by thin layer chromatography .*Acta chromatographica* **22(3)**. P: 391-404.

Wall, P.E (2005): Thin layer Chromatography: a modern practical approach .Edition: *illustrée royal society of chemistry* (Great Britan) p: 2-10.

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

Wangchuk,P .(2004).Bioactive alkaloids from medicinal plants of Bhutan .These de Master of science de l'université de Wollongong.

Wen, D.,Liu Wei Li, Y., Liu, H.(2004).Separation methods for antibacterial and antirheumatism agents in plant medicines..*Journal of chromatography B*. **(812)**.101-117.

Wilson, J.B.,Daber, M.G., Savidge, J.P. (1990).A phenetic comparison of some *Fumaria* spp (fumariaceae).*Plant Systematic and Evolution*.(**172**).51-63.

Venkateswara Rao, C., Verma, A.R., Gupta, P.K., Vijayakumar, M. (2007).Anti-inflammatory and anti-noceptive activities of Fumaria indica whole plant extraction experimental animals .*Actra Pharm (57)*,491-498.

Vercauteren, J., Cheze, C., Triaud, J. (1998): Polyphenols 96,18th international conference on polyphenols.*INRA*. p: 32-33.

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

Yang, J., Guo, J., Yuan, J. (2008).In vitro antioxidant properties of Rutin .*LWT. (41)*.1060-1066.

Yost, R., Ettore, L., Conlon, R.(1981).Pratique de la chromatographie liquide .*Technique et documentation,Lavoisier* Paris p :60-62.

Annexes

Annexe I : Matériel et produits utilisés

1- Appareillage

- Ampoule à décanter.
- Balance de précision : BP 310P.
- Barreaux magnétiques.
- Bêchers.
- Broyeur : KILA Labortechnik M20.
- Cuve chromatographie et couvercle
- dessiccateur
- Entonnoir.
- Etaleur de la silice.
- Etuve : BINDER BD 53.
- Fioles.
- Haute a vapeur : KIKA labortechnik.
- Lampe à UV : VL-6. LC.
- Micropipette.
- Papier aluminium.
- PH metre : WTWPH 422.
- Pipette.
- Plaques en verres (CCM).
- Rotavapor BUCHI CONTROLLER V-800, BUCHI ROTAVAPOR R-200.
- Soxhlet : BEHR labortechnik.
- Spatule métallique
- Tubes à essai.
- Eprouvettes graduées.
- Erlenmeyer.
- Burette
- Verre de montre

2-Produit chimique utilisés :

- Acide acétique
- Acide gallique
- Acide chloroacétique (TCA)
- Acide formique
- Acide sulfurique
- Ammoniaque
- Acétone
- 1,1diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
- Chlorure ferrique (FeCl_3)
- Chlorure d'aluminium (AlCl_3)
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3)
- Chloroforme
- Dragendorff
- Diéthylamine
- Ethanol
- Ethylacétate
- Hexane
- Eau distillée
- Ether de pétrole
- Folin –ciocalteu
- Ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]
- Gel de silice
- Méthanol
- Quercétine
- Sulfate de magnésium
- Tampon phosphate (pH = 6.6, M = 0.2)
- Triéthylamine
- Vanilline

Glossaire botanique

Corolle : Ce terme désigne l'ensemble des pétales d'une fleur.

Eperon : prolongement fin tubuleux des pièces du périanthe de certaines fleurs souvent l'éperon est une dépendance de la corolle, plus rarement du calice, parfois plusieurs pièces de la corolle se prolonge en éperon.

Folioles : Chacun'une des divisions d'une feuille composée.

Indéhiscence : Qualifie un fruit qui ne s'ouvre pas à maturité par un mécanisme propre.

Mucilage : Production végétale liquide à base de glucide très divers (mais surtout pectosique), hydrolysés les mucilages donnent de l'arabinose et du galactose, les algues en sont particulièrement riches.

Pédicelle : (Petit pied) partie fine, longue qui existe chez les sporophytes de nombreuse bryophyte et qui prenant appui sur le gamétophyte par l'intermédiaire d'un pied se dilate à son sommet en une urne.

Pétales : Chacune des pièces normalement colorées de la corolle d'une fleur d'angiosperme

Sépales : chacune des pièces normalement vertes, du calice d'une fleur d'angiosperme.

Silicule : (lat. silique) chez les Brassicacées ce terme désigne un fruit sec, déhiscent à peine plus long que large dérivant d'un gynécée à deux carpelles avec fausse –cloison.

Zygomorphe : se dit d'une fleur dont la symétrie n'est pas axiale, elle accepte donc alors un plans de symétrie

Glossaire médicale

Dépurative : Qui favorise l'élimination des toxines et des déchets de l'organisme.

Spasme : Contraction involontaire et brusque et persistante d'un muscle ou d'un groupe de muscles, certains réservent le terme de spasme à la contraction tonique persistante des muscles lisse.

Dartre : Terme générique désignant de nombreuses maladies cutanées notamment l'eczéma.

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

Résumé :

Fumaria agraria est une plante utilisée en médecine traditionnelle notamment en cas de dysfonctionnement hépatobiliaire. Ce présent travail porte sur l'extraction des composés alcaloïdiques et phénoliques de la partie aérienne, suivi du fractionnement de ces extraits et leur analyse par CCM, aussi que sur l'évaluation de l'activité antioxydant des extraits, le meilleur effet scavenger contre le radical DPPH sont enregistrés avec les alcaloïdes totaux et les acides phénols avec des taux respectifs de 80,49 % et 83,66 % d'inhibition, les deux classes de substances montrent aussi une capacité réductrice importante.

L'optimisation des paramètres de fractionnement et l'étude du comportement chromatographique par CCM nous a permis de sélectionner deux systèmes EAT (Ether de pétrole-Acétone-Triéthylamine) pour les alcaloïdes et le système EEAA (Ethyle acétate-Eau-Acide acétique-Acide formique) pour les composés phénoliques.

L'analyse des résultats de la CCM nous laisse suggérer la présence de la berbérine, la scopolamine, la trihydroalmitine, la boldine, la coridaline, la palmitine pour les alcaloïdes et la rutine, la naringénine, la quercétine et l'acide gallique pour les composés phénoliques

Mots clés : *Fumaria agraria*, polyphénols, alcaloïdes isoquinoléique, chromatographie sur colonne, CCM, DPPH.

Abstract:

Fumaria agraria is used in traditional medicine in case of hépatobiliary dysfunctionnement .The aim of this present study is to evaluate the chemical composition of aerial part of the plant (alkaloids and polyphénols),chromatographic fractions are obtained and are screened by TLC ,also both extracts antioxidant activities are carried out using DPPH essay and reducing power, the best scavenger effect was obtained with total alkaloids and phenolic acid with respectively inhibition rate of 80,49% and 83,66 % , in the other hand both extracts showed a good reducing power.

The two best system which showed the best separation was EAT (Petroleum ether-Acetone-Triethylamine) for alkaloids and EEAA (Ethyl acetate-Eau-Acetic acid-formic acid) for phenolic compounds.

The TLC analysis has shown the probability presence of Berberine, Scopolamine, Trihydroalmitine, Boldine, Coridaline, and Palmitine as alkaloids and Rutine, Naringénine, Quercétine, and gallic acid as phenolic compounds.

Key words: *Fumaria agraria*, polyphenols, isoquinoline alkaloids, column chromatography, T LC, DPPH

ملخص:

فوماريا أغراريا *Fumaria agraria* نبتة طبية مستعملة في الطب التقليدي خاصة في حالة مرض الكبد، ركزت هذه الدراسة على دراسة المستخلصات الألكليدية و الفينولية لهذه النبتة و الفصل الكروماتوغرافي بطريقة TLC و تم تقييمها بتحديد فعاليتها ضد الأكسدة في قوة تثبيط الجذر الحر DPPH و قوتها الإرجاعية، نتاجنا بينت أن المستخلصات الألكليدية الكلية (AT) و الأحماض الفينولية تملك قوة تثبيط كبيرة للجذر الحر DPPH بنسبة 80,49% و 83,66% و قوة إرجاع شوارد Fe^{+++} مرتفعة أيضا.

أحسن أنظمة المحلولات المستخدمة في الفصل الكروماتوغرافي بطريقة TLC بينت أن نظام EAT أفضل بالنسبة للمستخلصات الألكليدية و نضام EEAA بالنسبة للمستخلصات الفينولية. استعمال طريقة TLC سمحت لنا إحتمال إحتواء المستخلصات الألكليدية على العناصر الأتية Rutine و Palmitine و Cordaline, Boldine, Trihydroalmitins, Scopolamine, Bérberine و L'acide gallique, Quercétine, Naringénine.

مفتاح (الكلمات) : فوماريا أغراريا، متعدد الفينول المستخلصات الألكليدية الأيزوكينولية، كروماتوغرافيا، TLC، جذر حر DPPH.