

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie Physico – chimique.

Filière : Science biologique.

Option : Génétique fondamentale et appliquée.



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

Optimisation de l'extraction, dosage et  
activité antioxydant des feuilles de

*Clematis flammula*

Présenté par :

**HADJIRIOUA Baya**

Soutenu le 16 / 09/ 2023

Devant le jury composé de :

Mme ATMANI D.	Professeur	Encadreur
Mme RAHMANI M.	MCB	Président
Mme BAZIZI N.	MCA	Examinatrice

**Année universitaire : 2021/2022**

## *Dédicaces*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance*

*Je dédie ce travail*

*À Ma mère « Fatiha » qui est la source de tendresse pour moi et l'exemple de Dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager dans ma vie.*

*À mon père « M'hammed » pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordé et aucune dédicace ne saurait exprimer son amour.*

*À ma chère sœur « Kahina » qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études.*

*À mes frère « Sofiane » et « Riadh ».*

*À mon marie « BELBBACHA Akrame » et mes neveux « Ayoub » et « Mayes ».*

*À ma binôme « Samia » et à toute sa famille.*

*À tous les enseignants de la faculté SNV, et tous les étudiants de M2GFA de la promotion 2022/2023, et à tous ceux qui m'aiment.*

**HADJRIOUA Baya**



## REMERCIEMENTS

*Tout d'abord et en première place je tien de remercie le dieu qui ma donné de la santé, le courage, et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*En deuxième place je voudrais adresser toute ma reconnaissance au Encadreur madame ATMANI Dina, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

*Nous remercions aussi les membres de jury : Mme RAHMANI, d'avoir présidé ces jury, et Docteur BAZIZI d'avoir accepté de juger notre travail malgré leurs multiples préoccupations.*

*Et sans oublier de remercier les professeurs et les enseignants de l'université Abderrahmane MIRA de Bejaia, qui m'ont fourni les outils nécessaires à la réussite dans mes études universitaires.*

*Je tiens à exprimer également mes profondes reconnaissances a tous mes collègues plus spécifiquement les ingénieurs de laboratoire de m'avoir aidé et soutenu tous au long de mon parcours.*

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

## **Sommaire**

**Introduction.....1**

### **Chapitre I : synthèse bibliographique**

I.1. Plantes médicinales.....2

I.2. Composés phénoliques.....2

I.2.1. Biosynthèse des composés phénoliques.....2

I.2.1.1. Voie Shikimate.....3

I.2.1.2. Voie de polyacétate.....3

I.2.2. Classification.....5

I.2.3. Activités biologiques des polyphénols.....6

I.3. Stress oxydatif.....6

I.4. Systèmes de défenses antioxydants.....8

I.5. Optimisation de l'extraction des polyphénols.....9

I.5.1. Type de solvant et la concentration.....9

I.5.2. Température.....10

I.5.3. Technique d'extraction des polyphénols.....10

### **Chapitre II : Matériels et méthodes**

II. Matériels végétale .....12

II.1.1. Description botanique « *Clematis flammula* L.».....12

II.1.2. Taxonomie.....13

II.1.3. Toxicité et composition chimique.....13

II.1.4. Utilisation traditionnelle.....13

# Sommaire

---

II.2. Méthodes.....	14
II.2.1. Récolte du matériel végétal.....	14
II.2.2. Extraction.....	14
II.2.3. Dosage des composés phénolique.....	16
II.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	16
II.2.3.2. Evaluation de l'activité anti oxydante .....	17
II.3. Fractionnement des extraits par CCM.....	19
II.3.1. Systèmes d'éluion utilisés.....	19
II.3.2. Caractérisation du pouvoir antioxydant.....	20
II.3.2.1. DPPH.....	20
II.3.2.2. Beta carotène.....	21
II.3.2.3. Vanilline sulfurique.....	21
II.3.2.4. Anisaldhyde.....	22

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1. Rendement de l'extraction.....	24
III.2. Teneur en composés phénoliques.....	25
III.2.1. En fonction du pourcentage d'éthanol.....	25
III.2.2. En fonction du temps d'ultrasonication.....	25
III.2.3. En fonction de la température.....	26
III.2.4. En fonction du ratio.....	27
III.3. Activité antioxydante.....	28
III.3.1. Avec le DPPH.....	28
III.3.2. Avec le $\beta$ -Carotène.....	29

# Sommaire

---

III.4. Analyse des chromatogrammes CCM.....	30
III.4.1. Caractérisation des polyphénols après la révélation avec le $\beta$ -Carotène.....	32
III.4.1.1. Caractérisation dans le système Chloroforme/ M éthanol/ Acide acétique/ Eau.....	32
III.4.1.2. Caractérisation dans le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau).....	33
III.4.2. Caractérisation des polyphénols après la révélation avec le DPPH.....	33
III.4.3. Caractérisation des polyphénols après la révélation avec la Vanilline sulfurique.....	34
III.4.4. Caractérisation des polyphénols après la révélation avec l'Anis aldéhyde.....	35
<b>Conclusion.....</b>	<b>36</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>37</b>

**Annexe**

**Résumé**

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Classification des composés phénoliques.....	5
<b>Tableau II</b> : Les principales espèces réactives de l'oxygène.....	7
<b>Tableau III</b> : Sources endogènes et sources exogènes des ERO.....	8
<b>Tableau VI</b> : Polarité de solvants utilisé pendant l'optimisation.....	10
<b>Tableau V</b> : Classification taxonomique de <i>Clematis flammula</i> L.....	13
<b>Tableau VI</b> : Fractionnement des extraits des feuilles de <i>Clematis Flammula</i> .....	32

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> :Structure chimique d'un polyphénol.....	2
<b>Figure 2</b> : Représentation des voies de biosynthèse des composés phénoliques.....	4
<b>Figure 3</b> : <i>Clematis flammula</i> .....	12
<b>Figure 4</b> : Poudre des feuilles de <i>Clematis flammula</i> .....	14
<b>Figure 5</b> : Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction.....	15
<b>Figure 6</b> : Protocole détaillant le dosage des phénols totaux.....	16
<b>Figure 7</b> : Réaction entre un antioxydant et un radical libre (DPPH).....	17
<b>Figure 8</b> : Protocole détaillant l'évaluation de l'activité anti-radicalaire par le test DPPH.....	18
<b>Figure 9</b> : Protocole détaillant l'évaluation de l'activité anti-radicalaire par le test du $\beta$ -carotène...19	
<b>Figure 10</b> : Protocole détaillant les différentes étapes de l'évaluation du pouvoir antioxydant par la révélation par le DPPH.....	20
<b>Figure 11</b> : Protocole détaillant les différentes étapes de l'évaluation de l'activité antioxydant par le test de blanchiment $\beta$ -Carotène.....	21
<b>Figure 12</b> : Protocole détaillant les étapes de la révélation par la vanilline sulfurique.....	22
<b>Figure 13</b> : Protocole détaillant les différentes étapes de la révélation chimique par l'Anisaldhyde.....	23
<b>Figure 14</b> : Les valeurs du rendement d'extraction utilisant différents méthodes d'extraction.....	24
<b>Figure 15</b> :Teneur en phénols totaux en fonction du pourcentage de l'éthanol.....	25
<b>Figure 16</b> :Teneur en phénols totaux en fonction du temps d'ultrasonication.....	26
<b>Figure 17</b> :Teneur en phénols totaux en fonction de la température d'ultrasonication.....	27
<b>Figure 18</b> :Teneur en phénols totaux en fonction des ratios.....	28
<b>Figure 19</b> :Activité anti-radicalaire de différents extraits des feuilles de <i>Clematis flammula</i> obtenus par le DPPH.....	29
<b>Figure 20</b> :Activité anti-radicalaire de différents extraits des feuilles de <i>Clematis flammula</i> obtenus par le $\beta$ -Carotène.....	30
<b>Figure 21</b> : Profil chromatographique des extraits des feuilles de <i>Clematis flammula</i> avec le système 1 (Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique/ Eau).....	32



<b>Figure 22</b> : Profil chromatographique des extraits des feuilles de <i>Clematis flammula</i> avec le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau).....	33
<b>Figure 23</b> : Profil chromatographique des extraits des feuilles de <i>Clematis flammula</i> avec le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau).....	34
<b>Figure 24</b> : Profil chromatographique des extraits des feuilles de <i>Clematis flammula</i> avec le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau).....	34
<b>Figure 25</b> : Profil chromatographique des extraits des feuilles de <i>Clematis flammula</i> avec le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau).....	35

## *Liste des abréviations*

---

**CAT** : Catalase

**ERO** : Espèce réactive de l'oxygène

**GPXS** : Glutathion peroxydase

**LDL** : Lipoprotéine de faible densité

**SOD** : Superoxyde dismutase

**RLO** : Radicaux libres de l'oxygène

**XO**: Xanthine oxydase

**Co-A**: Coenzyme

**EAM** : Extraction par micro-ondes

**EAU** : Extraction par ultrason

**RMS** : Méthodologie de surface de réponse

**DPPH** : 1-1-diphényl-2-trinitrophénylhydrazine

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

Eq AG : Equivalent acide gallique

**Eq** : Equivalent

**Rf** : Rapport frontal

**PI** : Pourcentage d'inhibition

# *Introduction*

Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurales et urbaines en Afrique et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent (**Fennell et al., 2004**).

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées qui sont indispensables pour leur croissance et leur développement appelé métabolites primaires. En effet à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides et acides nucléiques), ils accumulent des métabolites dits secondaires qui présente une source importante des molécules utilisables par l'homme dans des domaines différents. Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (Alcaloïdes terpènes, composés phénoliques ...), (**Lazare et al., 2005**).

Les polyphénols, métabolites secondaires des plantes, suscitent depuis des dizaines d'années un intérêt croissant de la part des chercheurs, des nutritionnistes, des industriels, des consommateurs, des épidémiologistes, et des fabricants de produits alimentaires (**Georgé et al., 2005**). Ces composés phénoliques participent à la prévention des principales pathologies qui affectent les populations au niveau mondial, telles que les troubles neurodégénératifs, le cancer, les maladies cardiovasculaires et l'inflammation (**Matsumura et al., 2023**), cette prévention étant due à l'effet antioxydant des polyphénols (**Parejoa et al., 2003**).

Le pouvoir antioxydant des polyphénols se définit par leur capacité de piéger les radicaux libres qui agissent comme accepteurs d'électrons (**Finaud et al., 2006**).

L'objectif de ce mémoire a été l'optimisation et la caractérisation de l'activité antioxydante des feuilles de *Clematis flammula*, qui est nommée Azenzu en Kabylie, largement utilisée par les populations locales pour le traitement des rhumatismes articulaires ainsi que les blessures superficielles et les brûlures.

*Synthèse  
bibliographique*

## I.1.Plantes médicinales

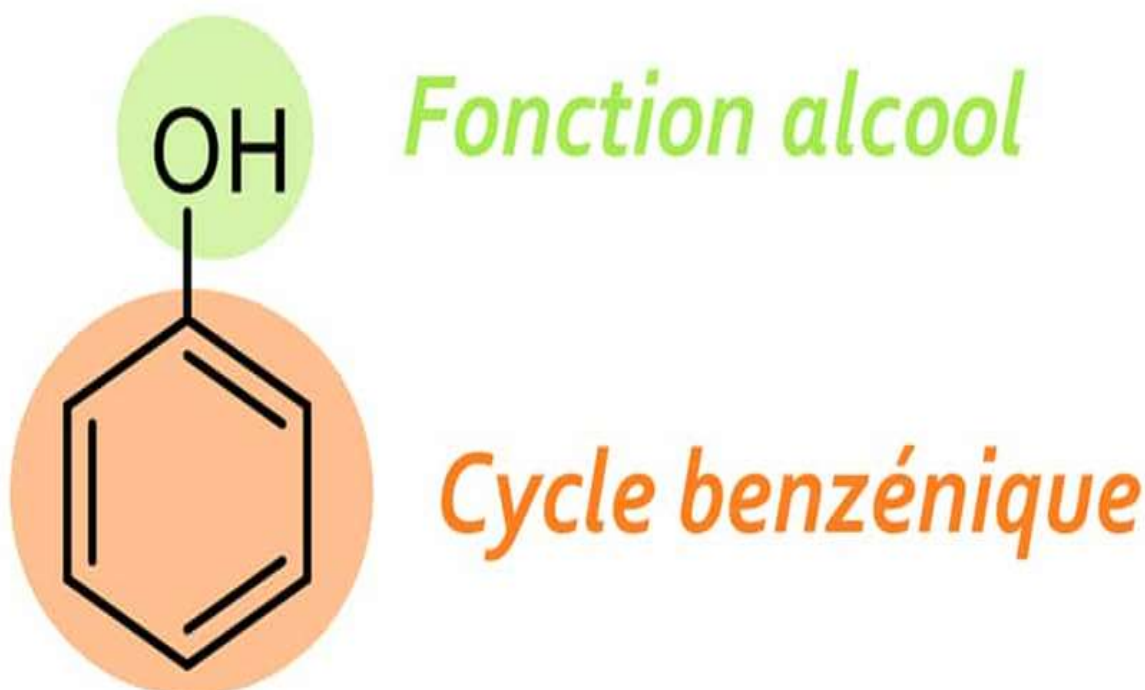
Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps dans plusieurs pays d'Afrique et d'Asie, pour le traitement de plusieurs maladies (**Baaziz et al., 2022**).

Par exemple, la busserole (*Arctostaphylos uva-ursi*) et le jus de canneberge (*Vaccinium macrocarpon*) sont utilisés pour traiter les infections des voies urinaires (**Rios et al., 2005**). Elles sont constituées principalement de composés phénoliques qui leur procurent des vertus thérapeutiques.

## I.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques végétaux sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique qui possède soit un groupe hydroxyle libre, ou une fonction ester ou éther (**Figure 1**) (**Bruneton, 1999**).

Ce sont des métabolites secondaires des plantes, qui contribuent à l'amertume et à la pigmentation de la plupart des plantes, la fonction physiologique de ces composés chez les plantes étant de fournir une protection biologique contre les dommages causés par les ERO émis par les rayons ultraviolets, les agents pathogènes et la prédation par les insectes (**Oksana et al., 2012**).



**Figure 1:** Structure chimique d'un polyphénol (**Bruneton, 1999**).

### **I.2.1. Biosynthèse des polyphénols**

La biosynthèse des polyphénols suit généralement deux principales voies synthétiques : la voie Shikimate et celle de polyacétate (**Figure 2**).

#### **I.2.1.1. Voie Shikimate**

Les composés phénoliques sont synthétisés principalement par la route métabolique shikimique qui existe chez les plantes, les champignons et les bactéries mais pas chez les animaux. Cette route conduit à la synthèse de trois acides aminés essentiels : phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Ces derniers sont utilisés comme précurseurs d'un grand nombre de métabolites secondaires. Leur biosynthèse repose sur l'action de la phénylalanine-ammoniac-lyase, l'enzyme clé de la voie shikimique qui convertit la phénylalanine en acide cinnamique par désamination (**Figure 2**) (**Benhamou, 2009**).

#### **I.2.1.2. Voie de polyacétate**

Une seconde voie de biosynthèse consiste à réaliser un ensemble de noyaux aromatiques par cyclisation des chaînes polycétoniques, ces derniers sont obtenus par condensation de groupement acétates ou par addition d'un second noyau benzénique pour de nombreux composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie de shikimate (**Figure 2**), ce sont les composés mixtes dont les représentants les plus importants sont les flavonoïdes (**Strati et al., 2018**).

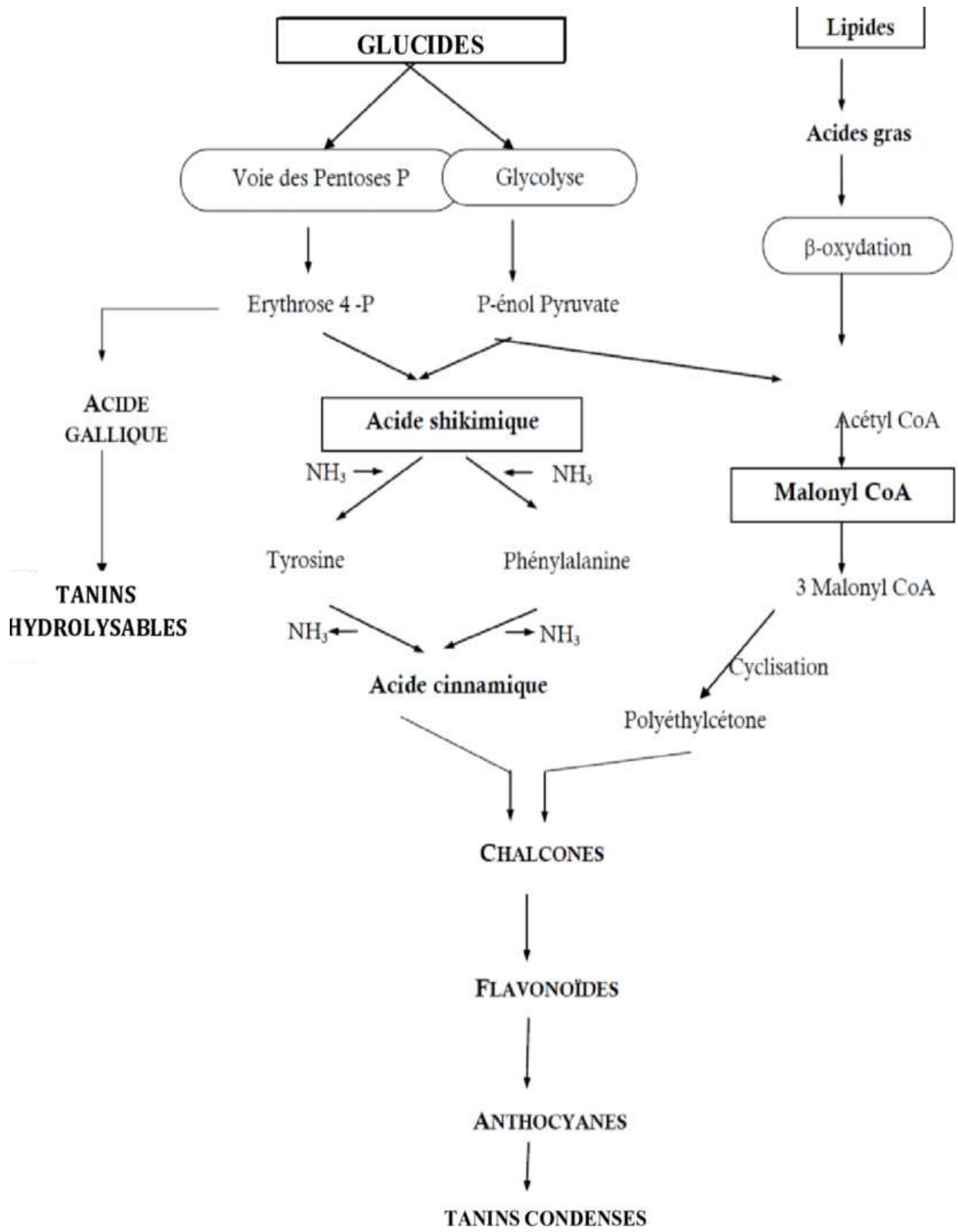



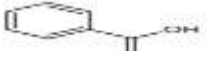
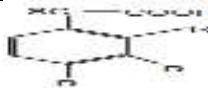
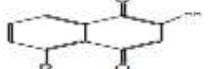
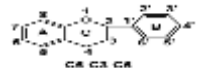
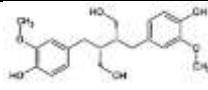
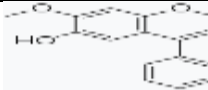
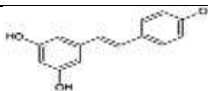
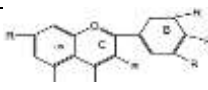
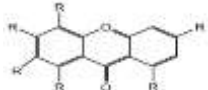
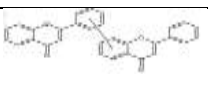
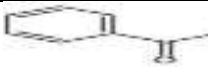
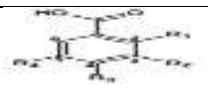
Figure 2 : Représentation des voies de biosynthèse des composées phénoliques (Med chaouche, 2014)



**I.2.2. Classification**

La classification des composés phénoliques se base sur la structure chimique et le nombre d'atomes de carbone. Ils sont divisés en deux grandes classes principales qui sont les phénols simples et les polyphénols de structure plus complexe (Delgado et al., 2023).

**Tableau I :** Classification des composés phénoliques (Justin, 2014 ; Lattanzio, 2013).

Squelette carboné	Structure	Phénols simples	Polyphénols de structure plus complexe
C6		Benzoquinones	
C6—C1		acide phénolique	
C6—C3		acide hydroxycinnamique	
C6—C4		Naphtoquinones	
(C6—C3) <sub>n</sub>			Lignine
(C6—C3) <sub>2</sub>			Lignanes
(C6—C3—C6)		Anthocyanes	
C6—C2—C6			Stilbènes
C6—C3—C6			Flavonoïdes
C6—C1—C6			Xanthones
(C6—C3—C6) <sub>2</sub>			Biflavonoids
C6—C2		Acétophénone	
C6—C1		Acide hydroxybenzoïque	

### **I.2.3. Activités biologiques des polyphénols**

Les composés phénoliques présentent beaucoup d'intérêt en raison de leurs bienfaits pour la santé humaine. Ils affectent différents types de processus physiologiques et sont considérés comme des puissants antioxydants, du fait qu'ils empêchent les biomolécules (protéines, acides nucléiques, lipides polyinsaturés et sucres) de subir des dommages oxydatifs par réactions induites par les radicaux libres (**Morandi et al., 2019**). Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation puisque l'apport quotidien moyen est d'environ 1g, ce qui représente presque 10 fois l'apport en vitamine C, 100 fois l'apport en vitamine E et 500 fois l'apport en caroténoïdes (**George et al., 2005**). Leurs propriétés antioxydantes sont dues aux deux principaux types, les primaires (rupture de la réaction en chaîne, piègeurs de radicaux libres) et secondaires qui peuvent inclure la désactivation des métaux, la régénération des antioxydants primaires et l'élimination de l'oxygène singulet (**Francenia Santos-Sanchez et al., 2019**).

Il y a deux mécanismes principaux par lesquels les antioxydants exécutent ces propriétés : l'inactivation du radical libre par le transfert d'électrons et/ou son atome d'hydrogène au radical qui conduit à sa neutralisation (**Malgorzata, 2019**).

### **I.3. Stress oxydatif**

Le stress oxydatif est l'une des causes majeures de l'étiologie des maladies cardiovasculaires, neuro-dégénératives, le diabète et le cancer (**Halliwell et al., 1989**). Il se définit par un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires ou réactives de l'oxygène (ERO) et le potentiel antioxydant de la cellule (**Migdal et al., 2011**). Plusieurs types d'ERO sont produits dans la cellule (**Tableau II**). Elles sont générées par les cellules endothéliales, les cellules musculaires conséquentes, les monocytes, les macrophages et les lipoprotéines (**Gardés-Albert et al., 2003; Lobo et al., 2010**).

**Tableau II** : Les principales espèces réactives de l'oxygène (**Gardés-Albbert et al, 2003**).

Espèces réactives	Réaction de formation	Propriétés
L'Anion super oxyde ( $O_2^-$ )	$O_2 + e^- \Rightarrow O_2^-$	C'est le radical le moins réactif mais le précurseurs ERO.
Le radical Hydroxyle (OH)	$(Fe_2^+) + H_2O_2 \Rightarrow Fe_3^+ + (OH) + (OH)$	Le radical hydroxyle (OH) est le radical le plus avide d'électron et le plus dangereux pour l'organisme.
Le peroxyde d'Hydrogène ( $H_2O_2$ )	$2O_2 + 2H^+ \Rightarrow H_2O_2 + O_2$	La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle.
Le Monoxyde d'azote ( $NO^\circ$ )	$(O_2^-) + (NO^-) \Rightarrow OONO$	Le NO est un radical libre qui est surtout réputé pour ces propriétés physiologique (agit sur le tonus vasculaire).
Le peroxydinitrite ( $ONOO^-$ )	$(ONOO^-) + (H^+) \Rightarrow (OH) + NO_2$	Très réactif et sans doute responsable d'un stress oxydant. Il engendre des oxydations irréversibles et de nitration diverse (surtouts des résidus tyrosines).

Ils peuvent aussi être d'origine exogène. Les différentes sources des ERO sont citées dans le (**Tableau II**). Les ERO sont présents dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants de la cellule (**Halliwell et al., 1989**). Leur excès peut mener à des altérations de plusieurs molécules biologiques (ADN, protéines et sucres), qui est à l'origine de plusieurs pathologies humaines, comme l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, la dégénérescence maculaire et l'arthrite (**Pincemail et al., 2007**).

**Tableau III** : Sources endogènes et sources exogènes des ERO (Lobo et al., 2010).

Sources endogènes	Sources exogènes
<b>La respiration aérobie normale</b>	La fumée de tabac
<b>Xanthine oxydase</b>	Les radiations
<b>Peroxisomes</b>	Polluants
<b>Inflammation</b>	Solvant organique
<b>Phagocytose</b>	Pesticides
<b>Voies de l'arachidonate</b>	Environnementaux
<b>Lésion d'ischémie reperfusion</b>	Ozone

La peroxydation lipidique, l'une des principales causes de détérioration des aliments et de maladies cardiovasculaires, se produit en présence de l'oxygène, entraînant une perte de propriétés fonctionnelles et de la valeur nutritionnelle (Yen et al., 1999).

La principale voie de peroxydation lipidique est la réaction en chaîne radicalaire auto catalytique. Cependant, la peroxydation des lipides peut être catalysée par des facteurs environnementaux, tels que la lumière, l'oxygène, les radicaux libres et les ions métalliques (Franke, 1991).

#### I.4. Systèmes de défenses antioxydants

La production physiologique d'ERO est régulée par des systèmes de défense qui contiennent différentes enzymes endogènes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPXS), couple thiorédoxine /thiorédoxine réductase, hème oxygénase ...), des molécules antioxydantes de petite taille ( caroténoïdes , vitamine C et E , glutathion, acide Urique, bilirubine, acide lipoïque, Ubiquinone ,...),et de protéines (transferrine, ferritine, cérulé plasmine ) (Pincemail et al., 2002). Les antioxydants exogènes fournis par les aliments, les suppléments nutritionnels ou les produits pharmaceutiques contribuent aussi à la réduction du stress oxydant en éliminant les ERO (Francenia Santos-Sanchez et al., 2010). La plupart de ces

antioxydants sont constitués de micronutriments, comme des polyphénols qui se trouvent principalement dans les plantes.

### **I.5. Optimisation de l'extraction des polyphénols**

Généralement, le procédé d'extraction est déterminé par la nature du matériel végétal et des composés bioactifs à récupérer ; les deux doivent être pris en compte afin d'obtenir une bonne efficacité d'extraction (Chenni et al., 2017). La récupération des polyphénols est considérée comme une tâche difficile, car les composés phénoliques existent sous forme d'aglycones libres, de conjugués avec des sucres ou des esters, ou de polymères à plusieurs unités monomères. De plus, les composés phénoliques ne sont pas uniformément répartis et peuvent être associés aux parois cellulaires, aux glucides ou aux protéines (Strati et al., 2018).

Les techniques d'extraction peuvent être divisées en traditionnelles et innovantes. Dans les extractions traditionnelles, on distingue l'extraction par solvant, Soxhlet ou macération. Les inconvénients de ces extractions sont la durée, la consommation d'énergie, et le besoin d'utiliser des solvants organiques chers qui sont en général toxiques (Sharma et al., 2019). Les technologies innovantes incluent l'ultrason, l'extraction enzymatique, extraction par micro-ondes (MAE) et avec un champ de pulses électrique (PEF). Ces technologies sont considérées vertes à cause de leur efficacité en terme de basse consommation d'énergie et leur non toxicité.

-L'extraction par solvant : les solvants d'extraction (le méthanol, l'éthanol, acétone) sont mélangés avec de l'eau, après ils sont utilisés pour extraire les composés phénoliques.

-Les principaux facteurs influençant de manière significative l'efficacité de l'extraction :

Le type de solvant (polarité), le temps, la température d'extraction, le nombre de cycles d'extraction, le rapport solvant/matière végétale (concentration du solvant) et la technique d'extraction.

#### **I.5.1.Type de solvant et la concentration**

Le méthanol aqueux (50 à 80 %, en volume) a été utilisé pour extraire les acides phénoliques des flavonoïdes et des polymères de flavonoïdes (Alara et al., 2021). L'augmentation de la proportion d'eau dans le mélange de solvants (le méthanol, l'éthanol) facilite l'extraction des composés polaires tels que les glycosides. A l'inverse, certains groupes de flavonoïdes, comme les flavones et les flavanols, du fait de la complexité des combinaisons hétérosidiques, ne sont généralement pas caractérisés comme des composés intacts mais par la forme de leurs aglycones (Tsoa et al., 2004). La polarité des solvants utilisés est citée dans le tableau VI suivant. La

concentration du solvant a également un impact significatif sur l'extraction optimale (**Howard et al., 2008**).

**Tableau VI :** Polarité de solvants utilisé pendant l'optimisation (**Bourgou et al., 2016**).

Solvants d'extraction	Formules	Polarité
Acétone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	0,355
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	0,054
Méthanol	CH <sub>4</sub> O	0,762
Eau	H <sub>2</sub> O	1

### I.5.2.Température

Des études qui ont étudié l'impact de la température de séchage sur les rendements polyphénoliques ont fourni des informations sur le comportement des polyphénols à ces températures (30, 40, 50,60°C) (**Antony et al., 2022**). La dégradation thermique des polyphénols pendant l'extraction explique le faible rendement à des températures élevées. Est le mécanisme le plus couramment utilisé pour expliquer la baisse du rendement en polyphénols lors des extractions à haute température. Cependant, ce n'est pas la seule interprétation. Il est proposé que les liaisons lignines acides phénoliques soient rompues libérant les acides phénoliques et amenant à la dégradation de la lignine. Une dégradation thermique des polyphénols peut se produire à 80°C. L'oxydation des polyphénols à des températures élevées pourrait également entraîner une perte de l'activité antioxydant observée. Les flavonoïdes sont plus sensibles aux températures (**Antony et al., 2022**). Cependant, une forte diminution de l'extraction des anthocyanes a été observée à 45 °C.

### I.5.3.Technique d'extraction des polyphénols

#### ➤ Extraction assistée par ultrason (EAU)

C'est une méthode efficace, vert, économiquement viable, facile à utiliser et largement applicable, en raison des températures relativement basses utilisées au cour de processus, ont un impact minimal sur la stabilité des composés cibles. Cette méthode a un potentiel élevé pour éliminer l'utilisation de produits chimiques toxiques, l'augmentation de l'efficacité du processus et l'amélioration du rendement et la qualité des produits cibles. La fréquence de bain à ultrasons a un

effet sur le processus d'extraction et l'irritation par ultrasons aide à réduire le temps de réaction et augmenter la transfert de masse (**Chemmat et al., 2011**).

## ➤ **Extraction Assistée par Micro-onde (EAM)**

L'EAM est une nouvelle technique d'extraction utilisée pour extraire des polyphénols et pour extraire les acides phénoliques et les flavonoïdes à partir des plantes (**Routray, 2012**).

L'EAM présente l'intérêt d'être une source d'énergie contrôlable de façon instantanée et réglable avec précision. Elle permet d'accélérer la cinétique d'extraction et de réduire le ratio solvant/charge, ce qui permet de préserver les composés les plus thermolabiles des réactions de dégradation traditionnelles (**Anizony et al., 2003**).

## ➤ **Méthodologie de surface de réponse (RSM)**

RSM est une méthode utile pour évaluer les effets de plusieurs facteurs et leurs interactions sur une ou plusieurs variables de réponse. RSM est utilisé pour développer et optimiser des processus qui prennent en compte les interactions probables entre les paramètres opérationnels (**Khedher et al., 2020**).

*Matériel*  
*et*  
*Méthodes*



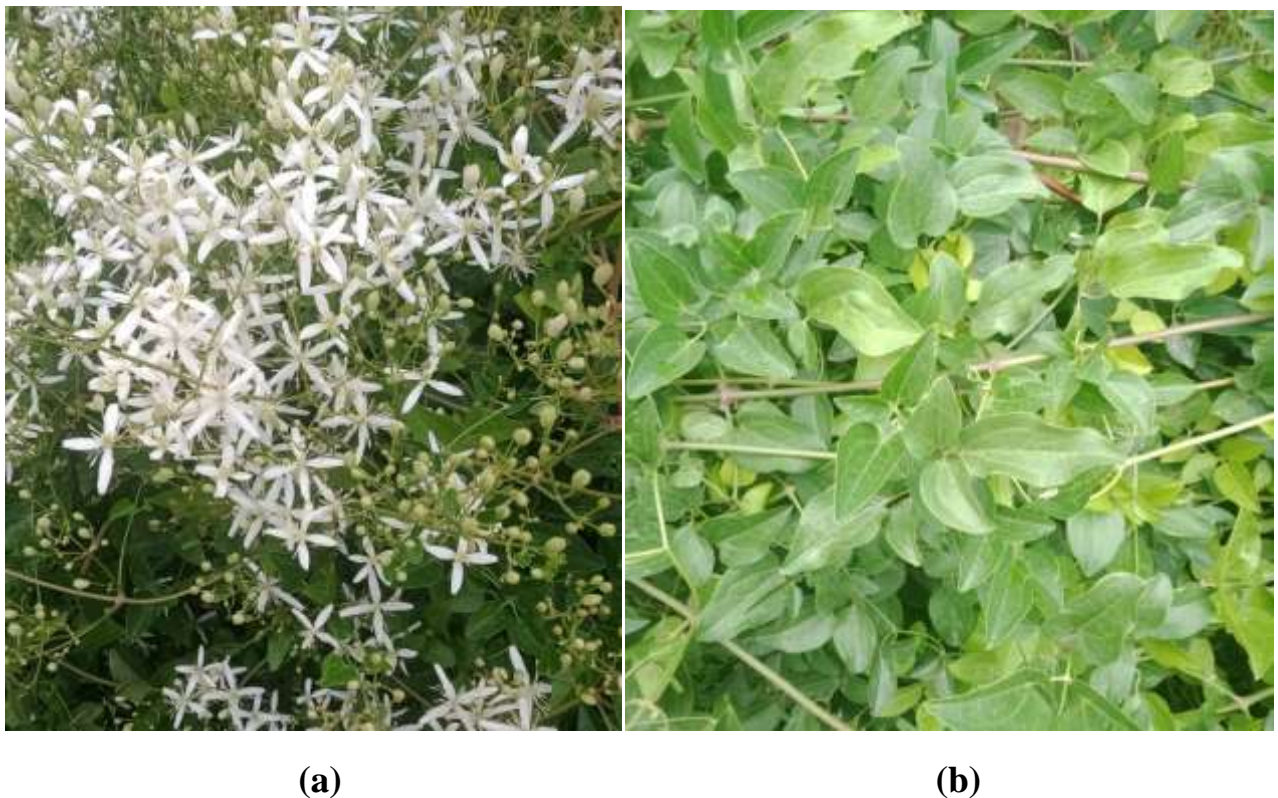
## II-Matériel et méthodes

### II.1.Matériel végétal

Ce présent travail a été réalisé sur l'extrait d'une plante qui est largement utilisée en médecine traditionnelle « *Clematis flammula L.* », à fin d'optimiser de l'extraction et le dosage et l'activité antioxydante de ses feuilles.

#### II.1.1. Description botanique «*Clematis flammula L.*»

*Clematis flammula L.*, également connue sous le nom de clématite brûlante, en arabe El Yasmine elbari et dans la région de Kabyle c'est Azenzou. C'est une plante à feuilles caduques avec une base ligneuse et une hauteur de 3 à 5 m. Ses feuilles sont composées de 9 à 15 folioles, largement ovales et longues, allant de 1,5 à 4 cm. Il présente de nombreuses fleurs blanches odorantes disposées en panicules lâches de 3 cm de diamètre, composées de quatre sépales blancs et de nombreuses étamines blanches de 5 à 10 mm de long. Elle fleurit de mai à août puis produit des fruits plumeux et couronnés. (Eichler et al., 2011), (Figure 3).



**Figure 3:** *Clematis flammula L.* (a) fleurs, (b) feuilles (Photos originale)

### II.1.2. Taxonomie

La systématique de *Clematis flammula* L est présentée dans le (Tableau V) comme suit :

**Tableau V** : Classification taxonomique de *Clematis flammula* L. (Miikeda et al., 2006).

Règne	plantes
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsides (dicotylédones)
Sous classe	Magnolides (polypetales)
Ordre	Ranunculales
Famille	Ranunculaces
Genre	Clematis
Espèce	<i>Clematis flammula</i> L.

### II.1.3. Toxicité et composition chimique

La clématite contient des coumarines, des flavonoïdes, des tri-terpènes, des lignanes, des alcaloïdes, des huiles volatiles, des huiles essentielles, des stéroïdes, des composés macrocycliques, des polyphénols et des saponines. Ces différentes molécules sont utilisées pour traiter diverses pathologies. Bien qu'utilisées en médecine traditionnelle, ces espèces possèdent également d'autres molécules toxiques, comme le protoanémone, l'acide aristolochique, l'anémone et la clématine, qui sont des produits chimiques pouvant irriter la peau et les muqueuses. Or, lorsque la plante se dessèche, les effets néfastes de ces molécules disparaissent (Chawla et al., 2012).

### II.1.4. Utilisation traditionnelle

Les parties aériennes des différentes espèces de clématites sont particulièrement utilisées en comme anti dysentérique, diurétique, antipaludéen, antidote aux morsures de serpent, dans le traitement des affections cutanées chronique, goutte, varice, des maladies osseuses, cataplasme pour traiter les plaies purulentes, les cloques ainsi que les ulcères cutanés, elles sont aussi utilisées pour traiter les rhumatismes, traiter l'asthme, le bérubéri et comme anti-inflammatoire (Chawla et al., 2012). les feuilles de *Clematis flammula* L. sont utilisées pour traiter l'arthrite, les brûlures superficielles et comme insectifuge pour prévenir la détérioration des céréales (Atmani et al., 2011).

## II.2. Méthodes

### II.2.1 Récolte du matériel végétal

Les feuilles de *Clematis flammula* ont été récoltées en juin 2021 de la forêt de Tizi Neftah , Amizour. Elles ont été séchées dans une zone aérée à l'abri de la lumière. Après trois semaines, les feuilles ont été triées et mises dans l'étuve à 30°C. Elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique (Kika) et tamisées afin d'obtenir une poudre de 63 µm de diamètre (**Figure 4**). La poudre a été conservé dans un bocal en verre hermétique et teinté, à -20°C.



**Figure 4** : poudre des feuilles de *Clematis flammula* L. (Photo originale)

### II.2.2. Extraction

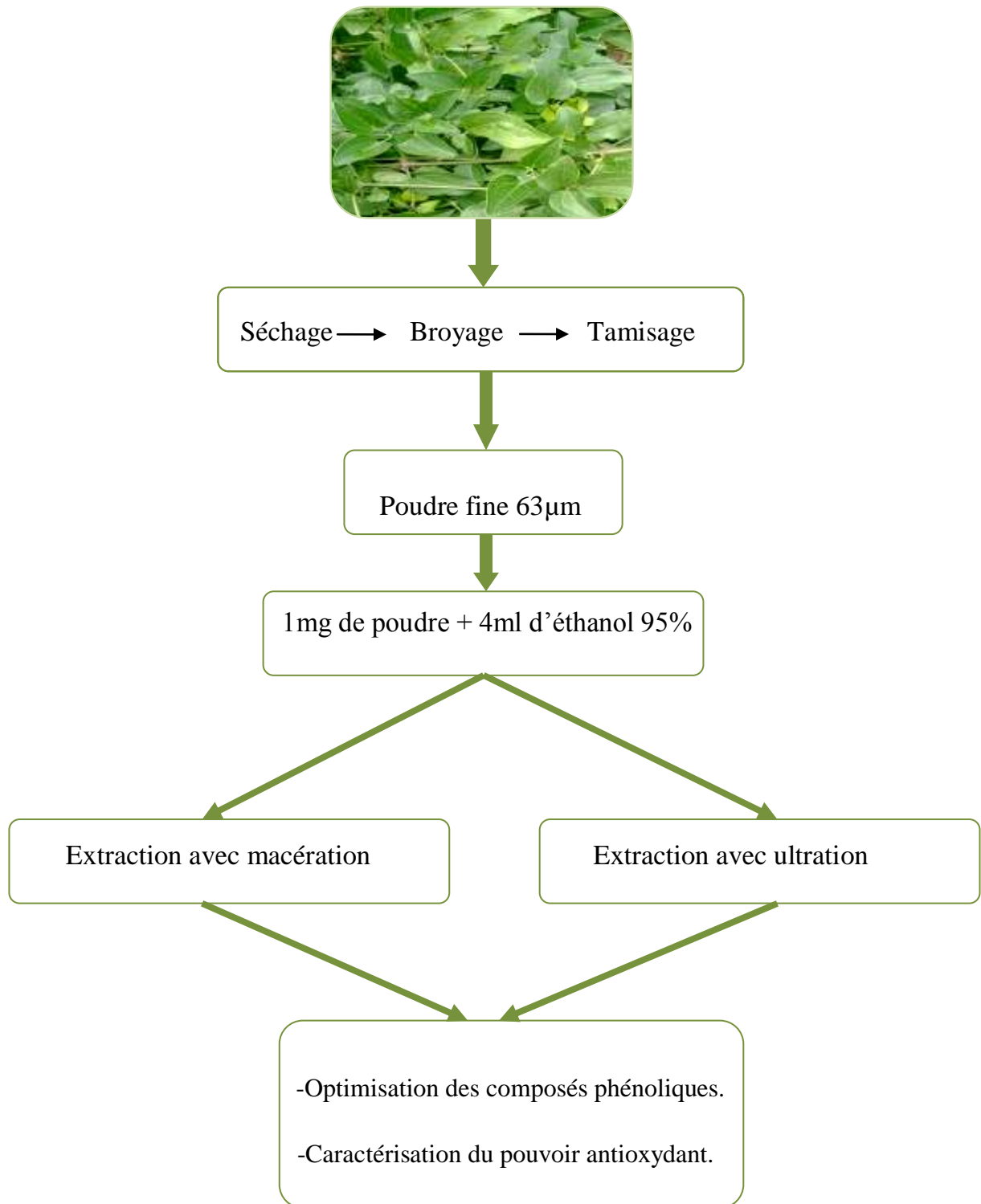
L'extraction a été optimisée en variant différents paramètres : le pourcentage de solvant (25%, 50%, 75%, 95%, 100%), le temps d'ultrasonication (10, 20, 30, 40, 50 min), la température pendant l'ultrasonication (30°, 40°, 50°, 60°), le ratio de dilution (1/4, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25) aussi, deux types d'extraction ont été réalisés (**Figure 5**) : avec ultrason et sans ultrason (macération)

**\*Extraction par macération** : consiste à mélanger 1g de poudre dans 4ml d'éthanol, puis après agitation, l'extrait a été centrifugé 10min à 3000rpm. Le surnageant obtenu a été séché dans une boîte pétri à température ambiante.

**\*Extraction par ultrason** : consiste à mélanger 1g de la poudre dans 4ml d'éthanol et à l'aide d'un vortex on le mélange puis on le met dans un sonicateur à 30°C. Pendant l'étape de l'ultrasonication, les paramètres ont été variés. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 10min, le surnageant a été récupéré pour une utilisation ultérieure.

Le rendement a été calculé suivant la formule suivante :

$$[\text{Rendement (\%)} = (\text{poids de l'extrait sec} / \text{poids de la matière première végétale}) \times 100]$$



**Figure 5:** Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction.

Afin de déterminer si le mode d'extraction est optimal, le dosage des polyphénols et l'activité antioxydante ont été réalisés.

### II.2.3. Dosage des composés phénoliques

#### II.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

La détermination de la concentration des polyphénols totaux dans l'extrait de *Clematis flammula* L. est effectuée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Atmani-Kilani *et al*, 2018). Le dosage a été calculé par référence à une courbe d'étalonnage avec l'acide gallique.

Le mécanisme principale de ce réactif c'est la réaction d'oxydo-réduction, car il possède des complexes d'acides phosphomolybdiques/ phosphotungstiques avec les groupements hydroxyles des polyphénols. A la suite de cette réaction, un chromophore bleu est formé (Ali-Rachedi, 2018). L'absorption maximale dépend de la concentration des composés phénoliques dans l'extrait. Le protocole est représenté dans la figure ci-dessous :

- **Protocole**

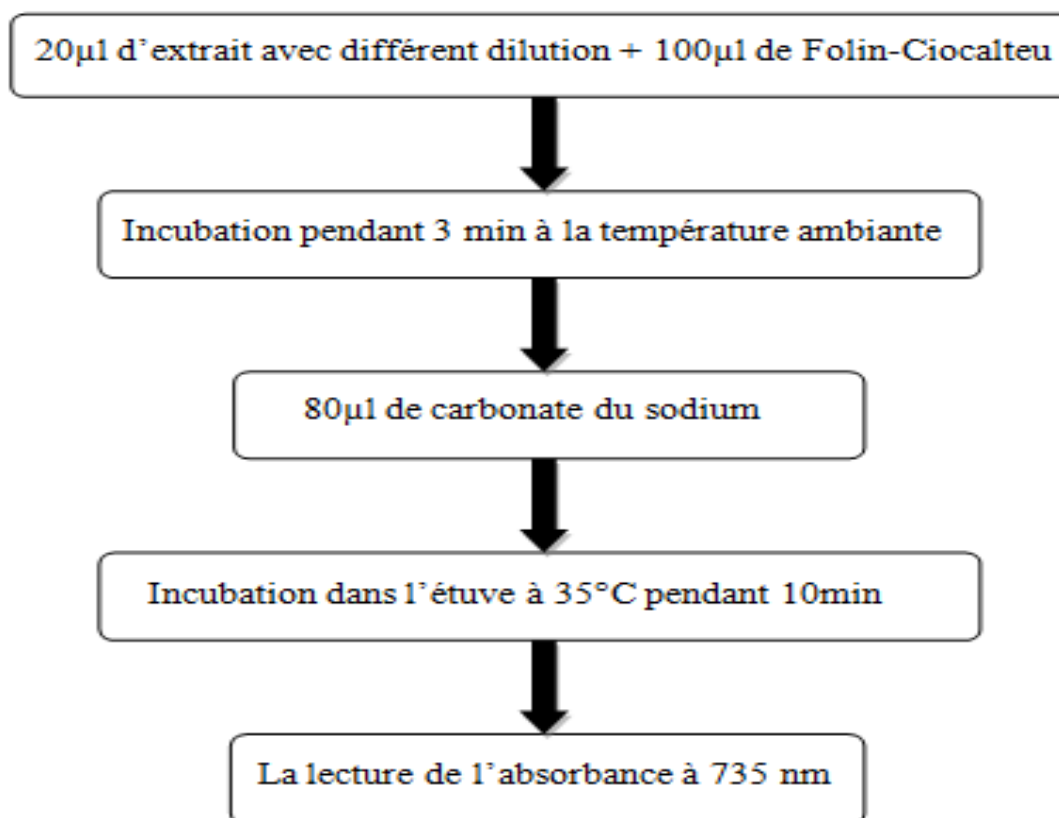


Figure 6: Protocole détaillant le dosage des phénols totaux.

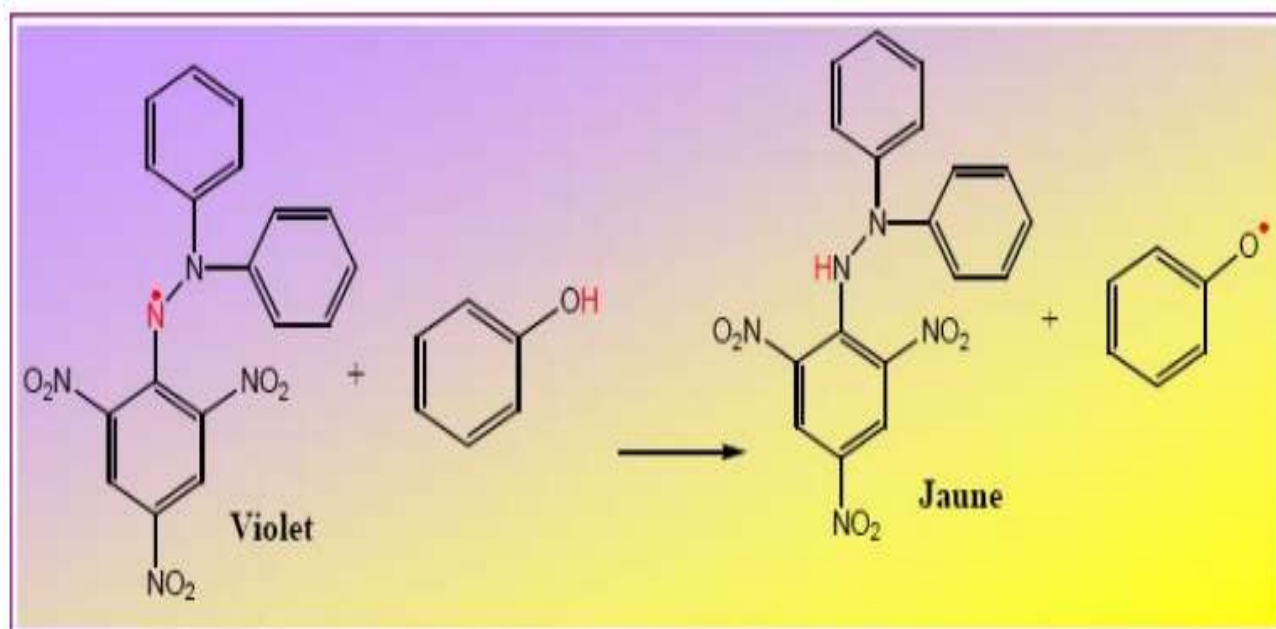
### II.2.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante

La détermination de l'activité antioxydant de *Clematis flammula* a été effectuée par l'utilisation de deux tests : le test DPPH et le test du  $\beta$ - carotène.

#### ➤ Test DPPH

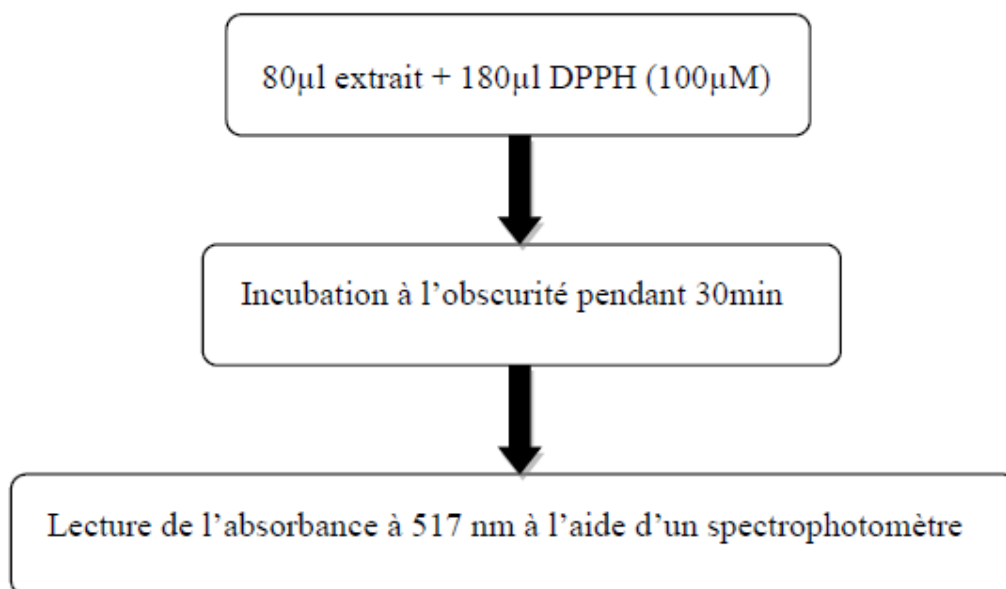
Le DPPH (1-1-diphényl-2-trinitrophénylhydrazine) est un radical libre stable couramment utilisé dans les tests d'antioxydants. Le radical DPPH est de couleur violet foncé et possède une bande d'absorption caractéristique à 517 nm associée à une forte résonance électronique non appariée (Foti, 2015). Le test DPPH est basé sur la réduction de la 2,2-phényl-L-trinitrophénylhydrazine (DPPH) est un radical libre stable qui devient violet foncé après réduction. Ce radical libre devient jaune clair en raison de l'hydrogène généré par les antioxydants contenus dans l'extrait selon la réaction suivant:  $\text{DPPH}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}\cdot$  (Bougatef et al, 2009), comme est démontré dans la **figure (7)** si dessous. L'absorbance de la couleur a été mesuré à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition du DPPH été calculé par l'équation suivante :

$$I_{\text{DPPH}} (\%) = 100 \times \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - (A_{\text{test}} - A_{\text{blanc du blanc}})}{A_{\text{contrôle}}} \right], \text{ (Nickavar et al., 2012)}$$



**Figure 7** : Réaction entre un antioxydant et un radical libre (DPPH) (Triki et al., 2016).

- **Protocole :**



**Figure 8:** Protocole détaillant l'évaluation de l'activité anti-radicalaire par le test DPPH

➤ **Beta carotène**

L'activité antioxydante a été déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative (décoloration) du  $\beta$ -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

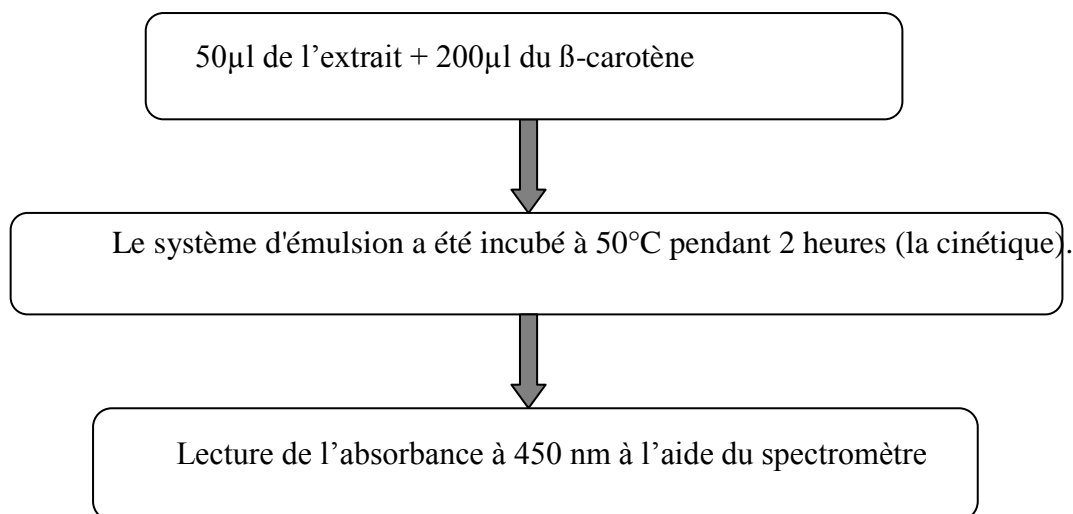
La beta Carotène (Vitamine A) est un antioxydant alimentaire utilisé comme colorant dans différents tests biologiques. Par exemple le test de blanchiment au  $\beta$ -carotène qui est utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons, cette méthode est basée sur la mesure de l'effet inhibiteur sur la dégradation du  $\beta$ -carotène en présence d'acide linoléique oxydé (Touvier *et al*, 2006). Lorsque des antioxydants sont présents dans la solution, ils réduisent les radicaux libres et empêchent le bêta-carotène de s'oxyder, réduisant ainsi la perte de couleur de la solution (Deba, 2008 ; Alexander *et al.*, 2019) .

- **Protocole**

L'évaluation de l'activité anti oxydante été réalisé par Système modèle b-carotène-acide linoléique d'écrite par (kabouche *et al.*, 2007), la préparation de la bêta carotène été préparé comme suite: 1mg de  $\beta$ -carotène dissous dans 200µl de chloroforme ajouter à 50 µl d'acide linoléique et 200 mg Mélange émulsifiant Tween 40. Après évaporation du chloroforme sous vide, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés sous agitation vigoureuse. L'absorbance de la couleur a été mesuré à 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH été calculé par l'équation suivante :

$I_{\text{blanchiment}} (\%) = 100 \times (\text{Absorbance après 2 h de test} / \text{Absorbance initial})$ , (Nickavar et al., 2012)



**Figure 9 :** Protocole détaillant l'évaluation de l'activité anti-radicalaire par le test du β-carotène

### II .3. Fractionnement des extraits par CCM

La caractérisation des différents polyphénols de l'extrait des feuilles du *Clematis flammula* a été effectuée par la chromatographie sur couche mince (CCM), qui consiste à séparer les différentes substances et composés de l'échantillon. La CCM se base sur l'adsorption et sur la capillarité, qui influencent la vitesse de migration de chaque composant de l'échantillon (Riant et al., 2010).

Les échantillons (l'extrait et les standards qui sont : la quercétine, la lutéoline, la rutine, kaempférole et le kaempférole dérivé) ont été déposés sur des plaques de silice (aluminium (20/20cm), silice de 200µm), ces dernières seront mises dans une cuve qui contient un système d'éluant. La silice est caractérisée par une polarité et une porosité élevées. En chromatographie liquide, l'éluant monte à travers la phase stationnaire selon l'action capillaire, et différents composés de l'échantillon migreront à des vitesses différentes, en fonction des forces électrostatiques polaires retenant les composés sur la phase stationnaire et sur l'éluant.

#### II.3.1.Systèmes d'élution utilisés

Deux systèmes sont été testés pour séparer les différents composés de l'extrait des feuilles de *Clematis flammula*.



-**Système 1** : Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique/ Eau (50 ; 7,5 ; 0,25 ; 0,15).

-**Système 2** : Acide d'éthyle/ Chloroforme/ Acide acétique/ Acide formique/ Eau (30 ; 3,8 ; 3,3 ; 3,3 ; 7,8).

Une quantité d'éluant est versée dans la cuve en verre (à une hauteur de 1cm).

### II.3.2.Caractérisation du pouvoir antioxydant

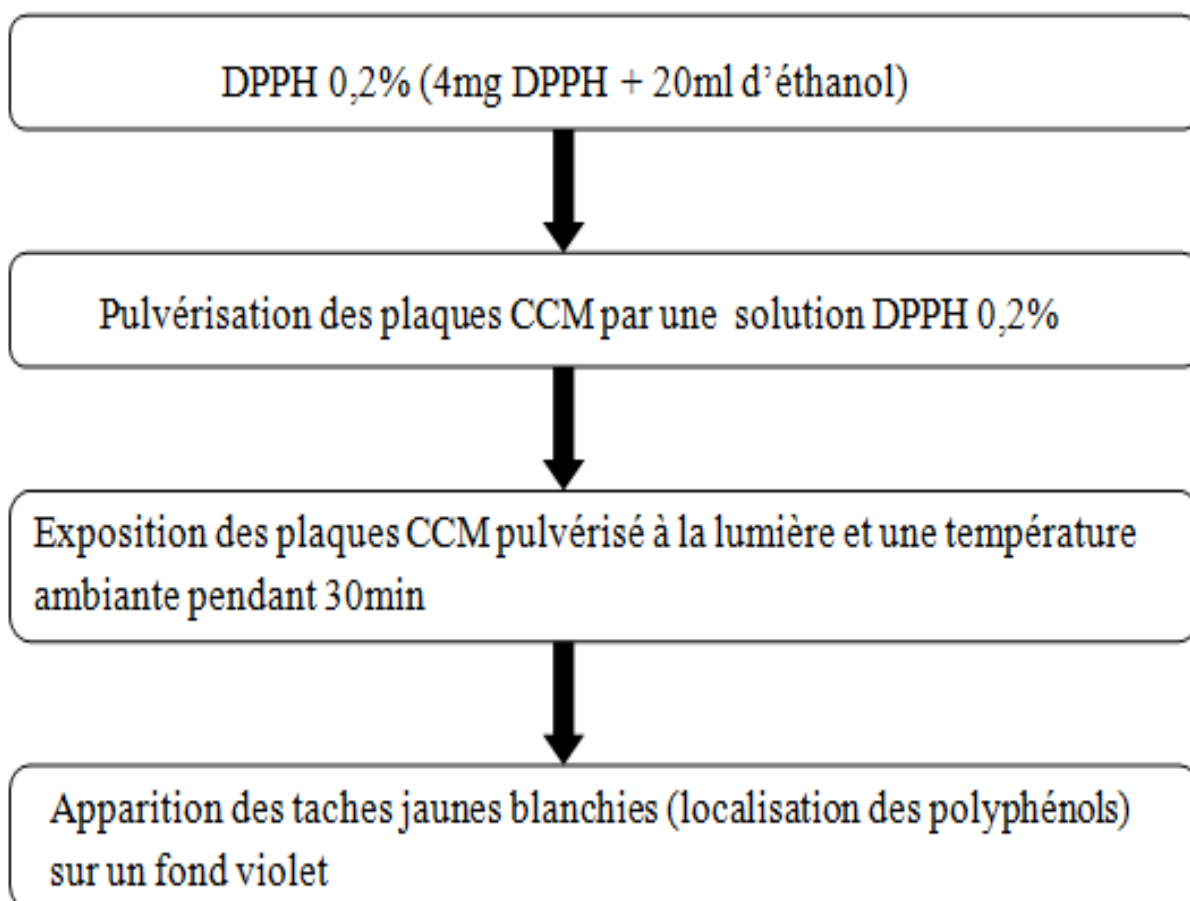
La caractérisation des polyphénols a été identifiée par la révélation:

\***Révélation physique** : qui été effectué par l'analyse des chromatogrammes par l'UV à 256 nm

\***Révélation chimique** : qui permet de visualiser de manière aisée la position des tâches obtenues après la migration des différents composés. Cette révélation a été réalisée avec trois réactifs:

#### II.3.2.1. DPPH

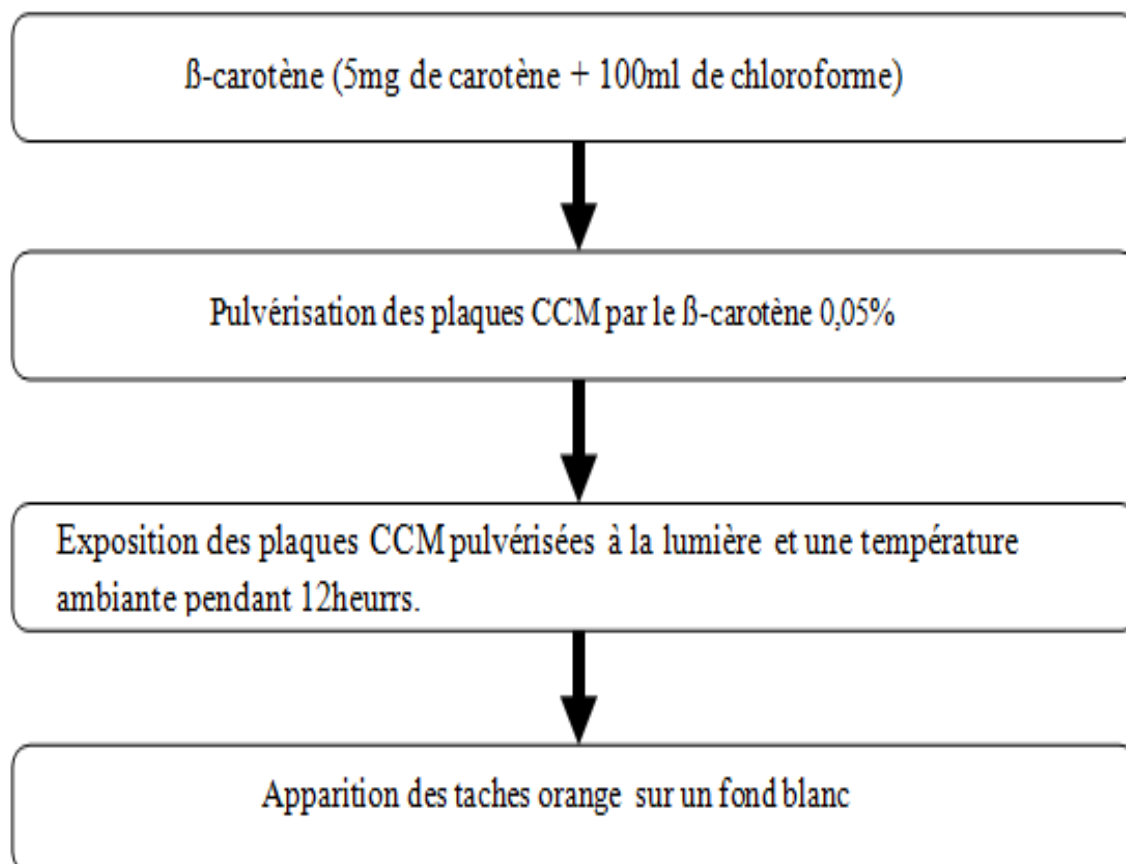
Le protocole et la méthode utilisée sont représentés dans la figure ci-dessous :



**Figure 10** : Protocole détaillant les différentes étapes de l'évaluation du pouvoir antioxydant par la révélation par le DPPH.

### II.3.2.2. Beta-Carotène

- **Protocole :**

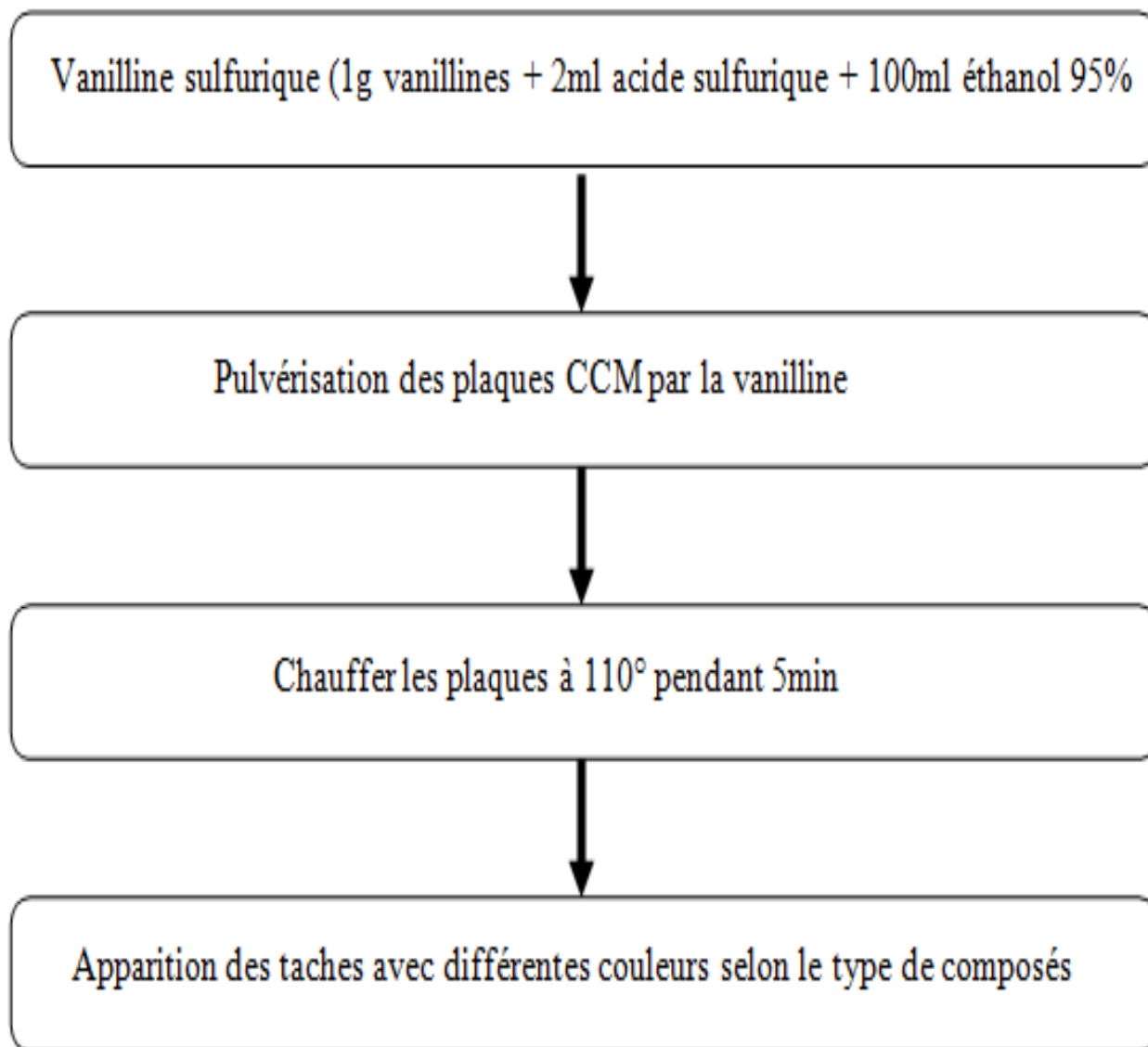


**Figure 11:** Protocol détaillant les différentes étapes de l'évaluation de l'activité antioxydant par le test de blanchiment β-Carotène.

### II.3.2.3. Vanilline sulfurique :

La vanilline sulfurique est un réactif qui est utilisé pour la détection de composés phénolique, est préparé en mélangeant de l'acide sulfurique concentré et de la vanilline. Lorsqu'il réagit avec des composés phénoliques il produit une couleur qui est spécifique pour chaque composé.

- **Protocol :**

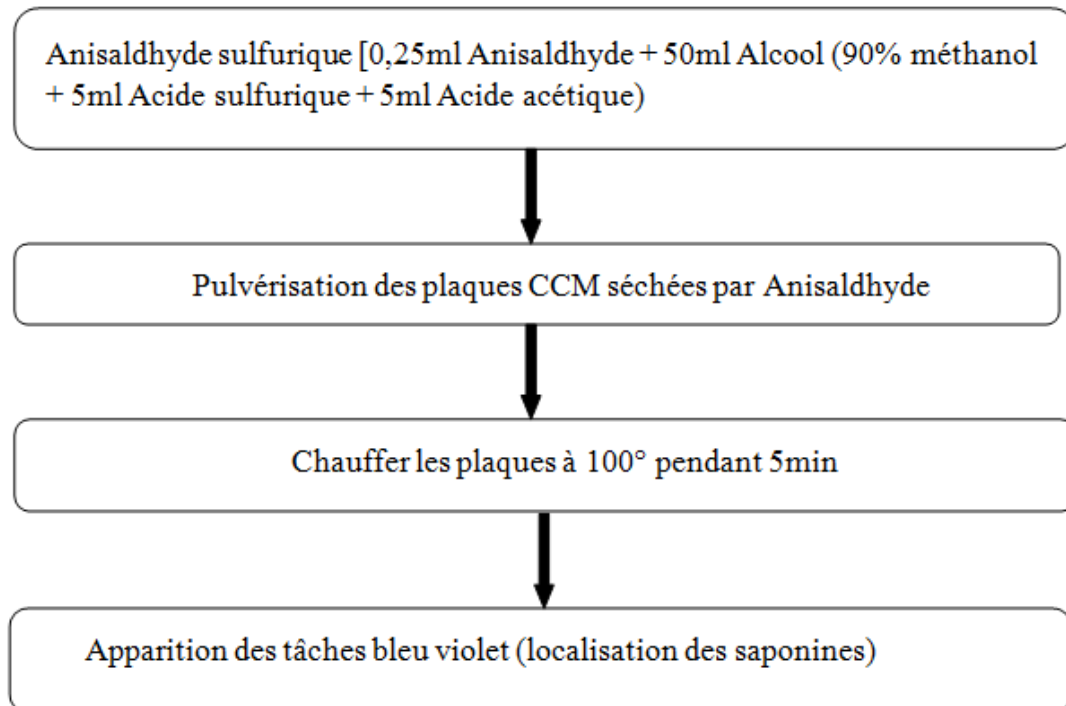


**Figure 12 :** Protocol détaillant les étapes de la révélation par la vanilline

#### II.3.2.4. Anisaldhyde:

L'Anisaldhyde est un isomère de méthoxybenzaldhyde, largement utilisé dans la chromatographie sur couche mince comme un colorant ou un révélateur de saponines. Sa réaction avec ces composés va donner une couleur rouge violet ou bleu violet à la suite de la réduction ou l'oxydation de sa fonction aldéhyde.

• **Protocol :**



**Figure 13:** Protocol détaillant les différentes étapes de la révélation chimique par l'Anisaldehyde.

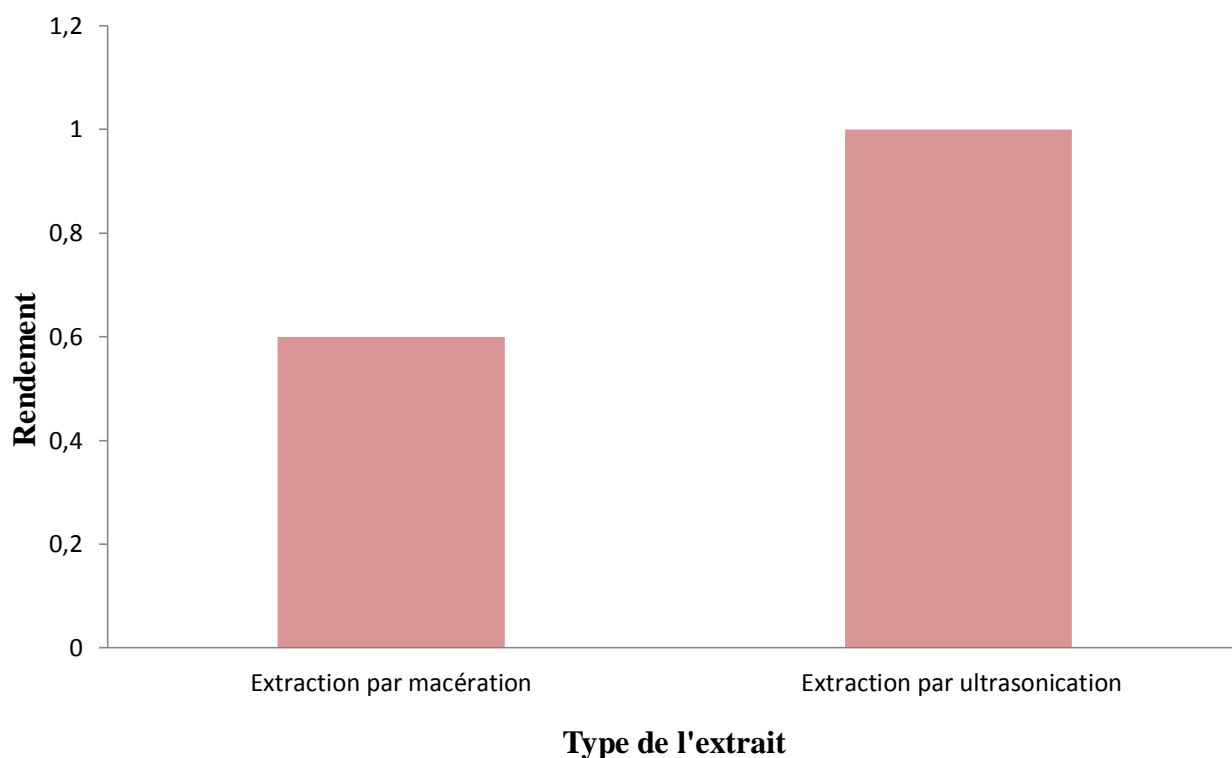
*Résultats*  
*et*  
*Discussion*

Ce travail avait pour but l'optimisation de l'extraction des feuilles de *C. flammula* en termes de teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante.

Dans cette perspectives, deux types d'extraction ont été testés l'extraction par macération (EAM) et assistée par l'ultrason (EAU) des feuilles de *Clematis flammula*, et leurs rendements ont été comparés.

### III.1. Rendement de l'extraction

A la lumière des résultats obtenus (**figure 14**), le rendement par EAU (1%) est plus important que celui d'EAM (0,6%). Le rendement varie selon la méthode d'extraction, cette différence étant due à la meilleure pénétration de l'éthanol qui est polaire dans la poudre de la plante qui est aidée par l'énergie de l'ultrasonication (**Barroso et al 2014**).

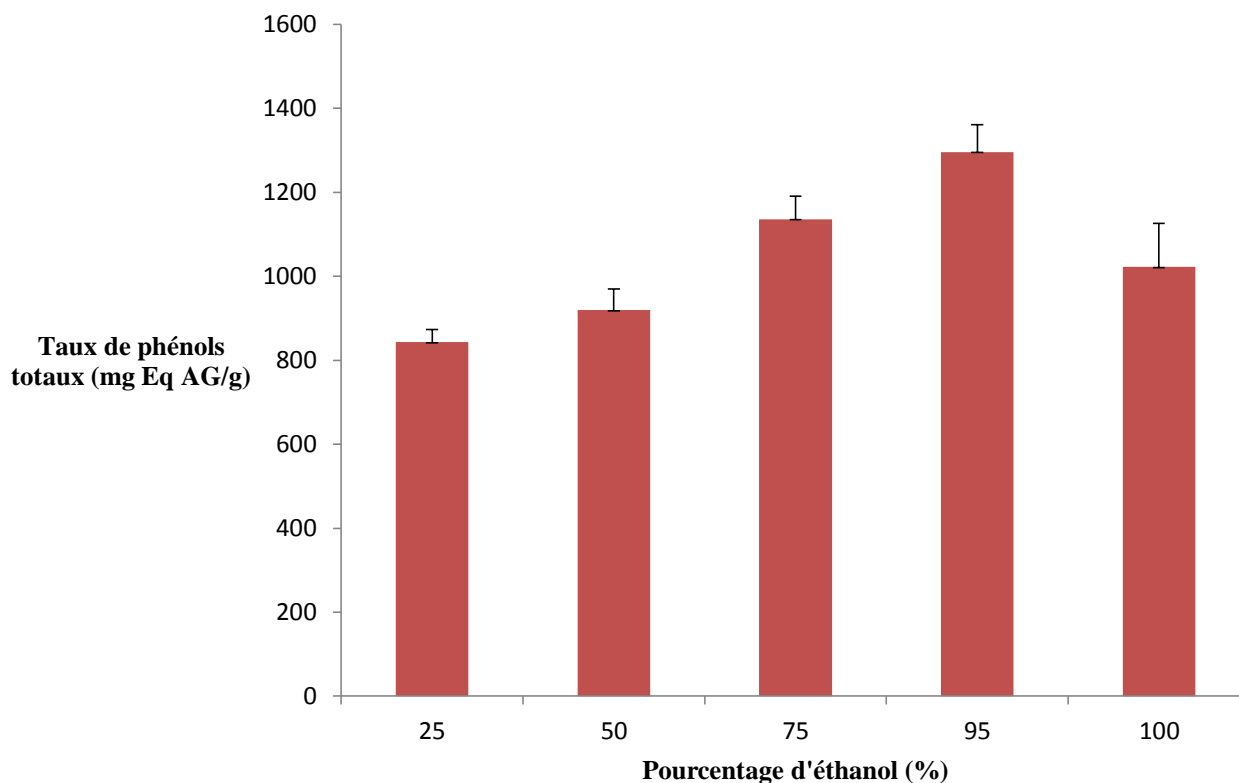


**Figure 14** : Les valeurs du rendement d'extraction utilisant différents méthodes d'extraction

### III.2. Teneur en composés phénoliques

#### III.2.1. En fonction du pourcentage d'éthanol

La teneur en composés phénoliques a varié en fonction de la concentration de l'éthanol utilisé lors de l'extraction comme le montre la **figure 15** ci-dessous, où la meilleure concentration s'est avéré être à 95%.

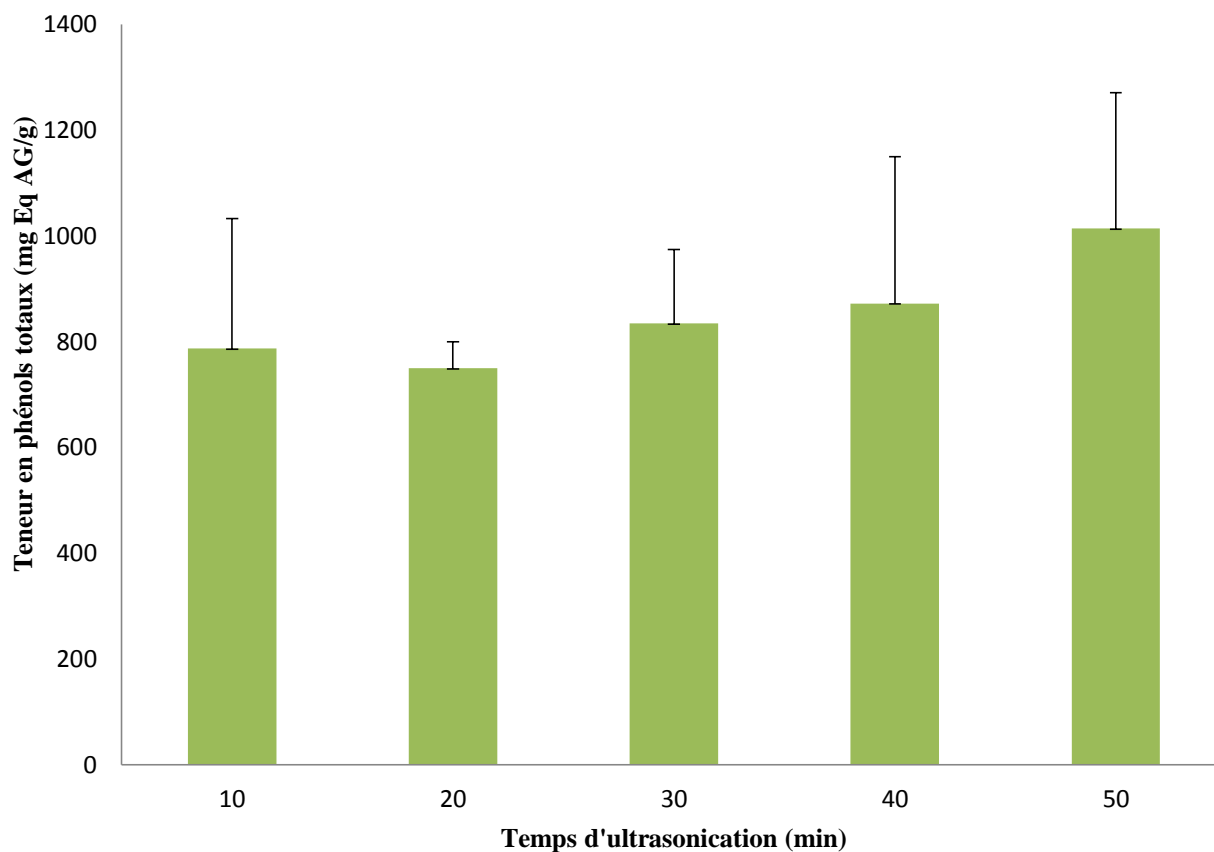


**Figure 15:** Teneur en phénols totaux en fonction du pourcentage de l'éthanol.

Les teneurs en phénols totaux solubles d'extrait des feuilles de *Clematis flammula* varient entre 842 mg Eq /g extrait (éthanol 25%) et 1022 mg Eq /g (100%), atteignant un pic à 95% (1295,7 g Eq/g extrait). L'addition d'eau dans une solution organique fragilise les liaisons d'hydrogène dans l'extrait (Mahmoudi et al, 2013).

### III.2.2. En fonction du temps d'ultrasonication

Les résultats illustrés dans la **figure 16** ci-dessous représentent l'influence de temps d'ultrasonication sur la teneur en composés phénoliques de l'extrait, qui a atteint son maximum à 40 minutes (différence non significative avec 50 min).



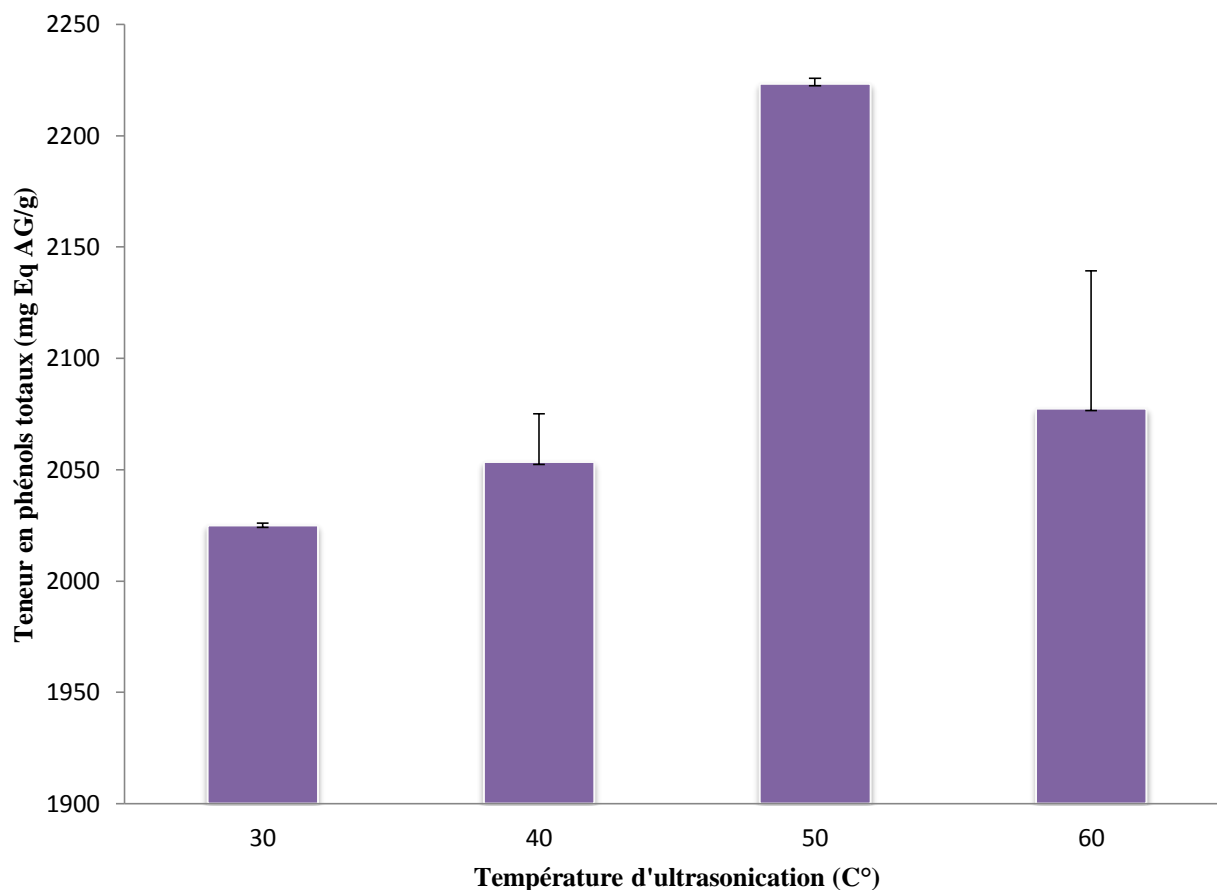
**Figure 16:** Teneur en phénols totaux en fonction du temps d'ultrasonication.

La teneur en composés phénoliques de l'extrait de *C. flammula* a été influencée par la durée du traitement par ultrasons. Pour les feuilles de *Terminalia*, des durées de sonication supérieures à 20 minutes se sont révélées inappropriées (Annegowda et al., 2010). En raison de la cavitation des bulles d'air lors de la propagation des ondes sonores, le temps de sonication affecte la teneur en composés phénoliques. Les ultrasons produisent des ondes de haute pression qui provoquent la formation et l'effondrement de bulles, entraînant la libération de composés phénoliques à partir de la matière végétale (Lohani et al., 2021).

### III.2.3. En fonction de la température

Les résultats schématisés dans la **figure 16** montrent que la variation de la température lors de l'ultrasonication induit une variation dans la concentration des composés phénoliques, où la teneur est maximale à 40°C



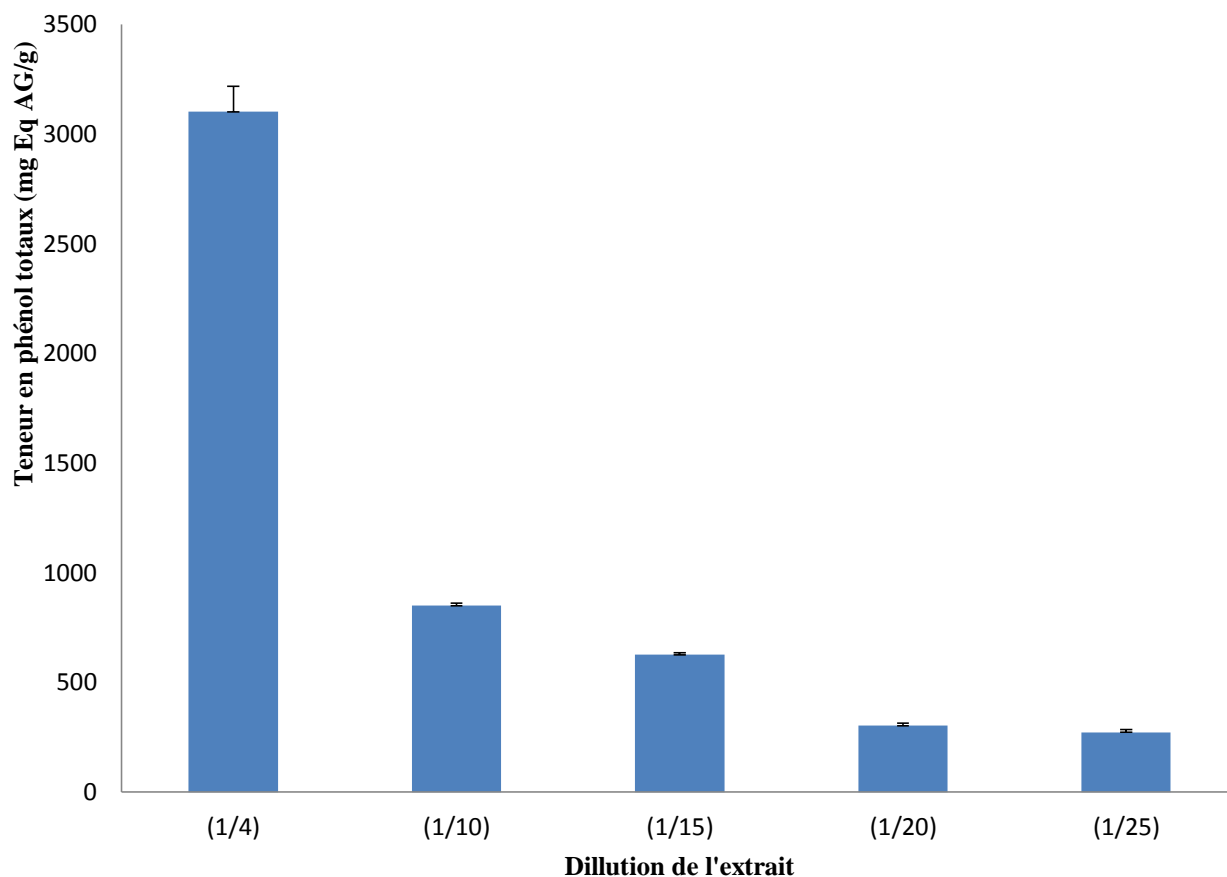


**Figure 17:** Teneur en phénols totaux en fonction de la température d'ultrasonication.

La température de sonication est l'un des facteurs qui doivent être optimisés pour une extraction maximale des composés phénoliques (Lohani et al 2021), en agissant sur la solubilité de ces composés et leur vitesse de libération du matériel végétal. La température optimale pour la sonication varie en fonction du matériel végétal extrait. Pour le marc de raisin, les rendements d'extraction des esters phénoliques totaux et des esters phénoliques tartriques augmentent avec l'augmentation de la température jusqu'à 40°C, au-delà de quoi les rendements d'extraction diminuent (Tao et al 2014). En revanche, pour *Alati kempi*, la récupération des composés phénoliques augmente avec l'augmentation de la température jusqu'à 50 °C (Arruda et al. 2019).

#### III.2.4. En fonction de la dilution

La figure 18 ci-dessous montre que la variabilité en teneur en composés phénoliques dans l'extrait est en fonction de la concentration de l'extrait, ayant donné le meilleur taux à un ratio de 1/4.



**Figure 18:** Teneur en phénols totaux en fonction des ratios.

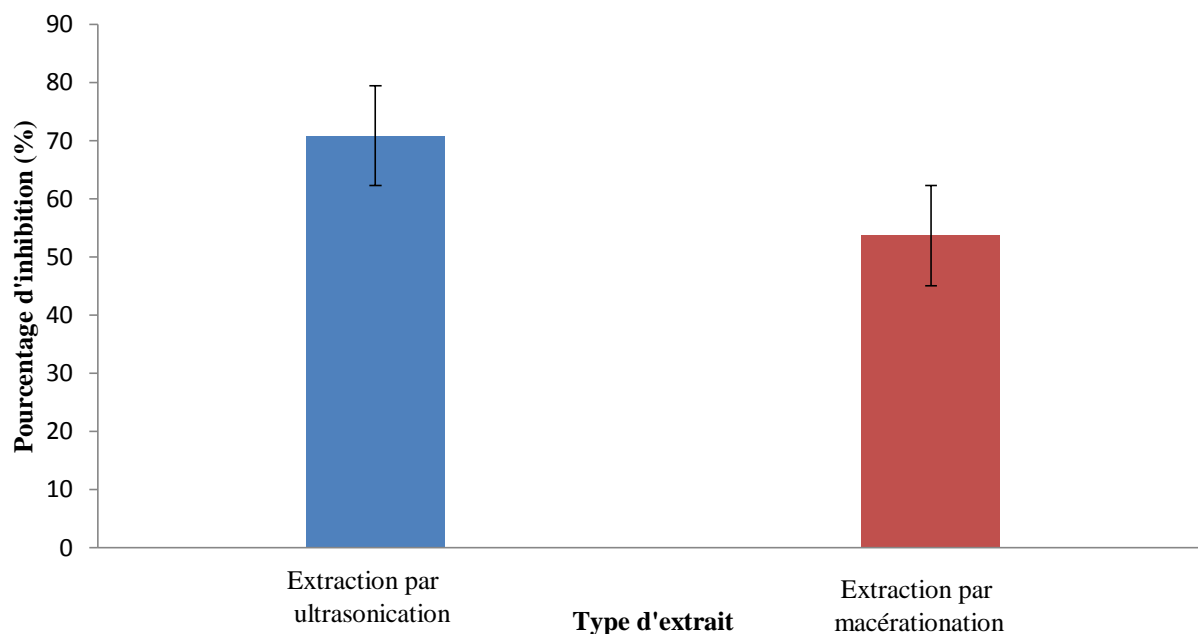
La concentration de l'extrait végétal influence sur la teneur en composés phénoliques en raison de la solubilité de ces composés et de la présence de substances interférentes. La teneur en composés phénoliques dans l'extrait végétal diminue en fonction de l'augmentation de la dilution en raison de la concentration élevée des glucides et de lipides (Dai et al 2010).

### III.3. Activité antioxydante

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la détermination de l'effet antioxydant de l'extrait : la méthode du DPPH et celle de la  $\beta$ -carotène qui sont basés sur deux mécanismes différents de l'effet antioxydant de l'extrait.

#### III.3.1. Avec le DPPH

L'activité antioxydante mesurée par l'utilisation du radical synthétique, le DPPH (figure19), indique une nette hausse de l'activité antioxydante (70%) après le traitement avec l'ultrasonication, comparée avec le traitement par macération (40%).

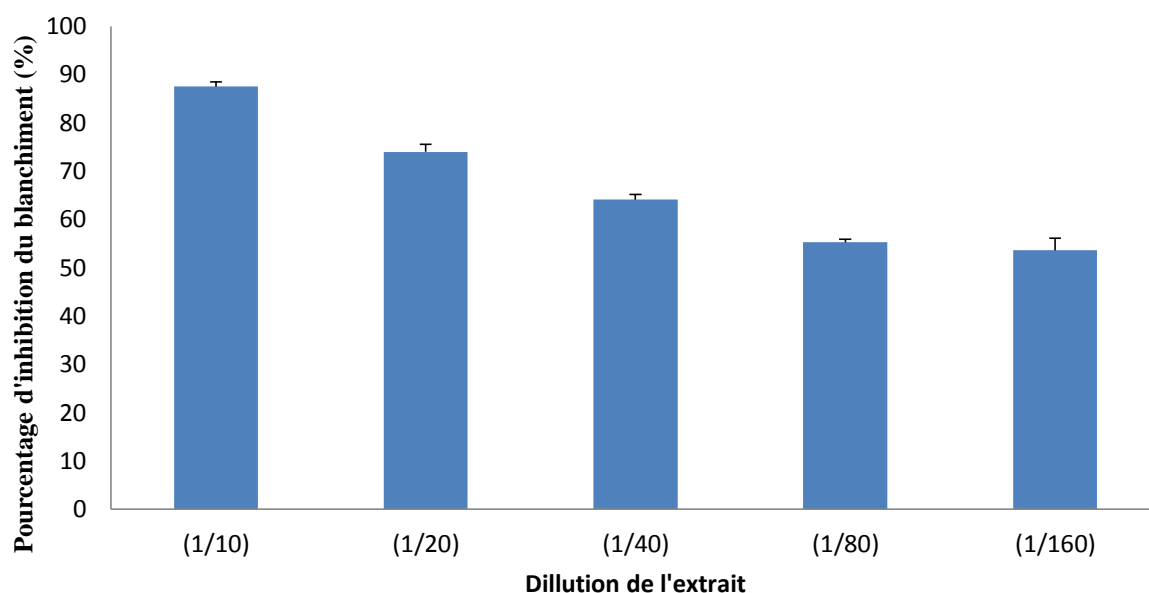


**Figure 19:**Activité anti radicalaire de différents extraits des feuilles de *Clematis flammula* obtenus par le DPPH.

Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude précédente (**Arruda et al., 2019**), qui a démontré que l'intensification du processus de sonication affecte positivement la récupération des composés phénoliques et l'activité antioxydante des peaux d'arachide. Une étude comparant le pouvoir antioxydant de la sonication et de la macération sur les anthocyanes et les caroténoïdes de la tomate a révélé une augmentation de l'activité antioxydante (DPPH) par rapport à la macération de 40,55 % (**Puspawati et al 2019**). Par contre, une étude comparant l'activité antioxydante des composés médicinalement actifs de la valériane avec l'extraction traditionnelle et l'extraction assistée par ultrasons, a montré que l'extrait de macération a montré l'activité la plus élevée dans le test du pouvoir réducteur, tandis que l'extrait ultrasonique a montré l'activité la plus élevée dans l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH (**Niknamian 2021**). Ceci peut être dû à des mécanismes différents du pouvoir antioxydant, où le DPPH est basé sur les échanges des ions H<sup>+</sup> des groupements OH des polyphénols, alors que le pouvoir réducteur est basé sur la réduction par les e<sup>-</sup>.

### III.3.2. Avec le $\beta$ -Carotène

Les résultats illustrés dans la **figure (20)** présentent la variation de l'activité antioxydante déterminée par la beta-carotène en fonction de la concentration de l'extrait.



**Figure 20:**Activité anti radicalaire de différents extraits des feuilles de *Clematis flammula* obtenus par le  $\beta$ -Carotène.

Activité antioxydante des extraits de plantes mesurée par le test de blanchiment au  $\beta$ -carotène en fonction de la concentration (**Ghasemzadeh et al.,2015**) qui montre une meilleure activité optimale de 80% avec le minimum de dilution (1/10) démontrant l'importance de la concentration des composés phénoliques dans l'extrait pour une meilleure activité antioxydante.

#### III.4. Analyse des chromatogrammes CCM

L'analyse chromatographique des deux extraits des feuilles de *Clematis flammula* (par EAU et EMU) a été effectuée pour comprendre si les deux extractions affectent la nature des composés phénoliques ou leur quantité.

Les spots varient en fonction de l'éluant utilisé (**Tableau VI**). Ces spots sont distingué par la leurs coloration avant et après la révélation et avec la valeur du rapport frontal qui est calculé par la formule suivante :

$$R_f = \frac{h}{H}$$

\***h** : La distance parcourue par l'échantillon

\***H** : La distance parcourue par l'éluant

Deux systèmes d'éluants ont été utilisé : le système (A) (Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique/ Eau) et le système (B) (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau), qui est Suivant leur polarité et leur solubilité dans l'éluant les constituants des extraits migrent avec ce dernier. Les spots ont été révélés d'abord par l'UV ensuite par la vanilline et l'anis aldéhyde.

**Tableau VI :** Fractionnement Des Extraits Des Feuilles De *Clematis Flammula*

(A)							(B)						
E	Rf	Rβ.c	Rd	Rv	Ra	Lj	E	Rf	Rβ.c	Rd	Rv	Ra	Lj
Em	0,39	Jaune Clair	\	\	\	Vert Clair	Em	0,318	Jaune	Jaune Claire	Violet Clair	violet clair	Vert
Eu	0,395	Jaune Clair	\	\	\	Vert	Eu	0,326	Jaune	Jaune Clair	Violet	Violet	Vert
Que	1	Orange	\	\	\	Jaune	Que	0,74	Orange	Orange	Orange	jaune	Jaune
Rut	0,3	Orange Jaunâtre	\	\	\	Jaune	Rut	0,22	Orange Jaunâtre	Orange Jaunâtre	Violet Foncé	marron	Jaune
Lut	\	Invisible	\	\	\	Invisible	Lut	0,92	Orange Clair	Jaune Clair	Beige Clair	invisible	Invisible
Ka	0,973	Orange	\	\	\	Jaune	Ka	0,96	Orange	Orange	Orange Jaunâtre	orange	Jaune
Ka.D	0,684	Jaune	\	\	\	Invisible	Ka.D	0,66	Jaune	Jaune Clair	Orange		Invisible
A.Ca	0,925	Marron	\	\	\	Marron Clair	A.Ca	0,9	Marron	Marron	Violet	Violet clair	Beige

**Systèmes d'éluion :** (A) Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique/ Eau (50 ; 7,5 ; 0,25 ; 0,15). (B) Acide d'éthyle/ Chloroforme/ Acide acétique/ Acide formique/ Eau (30 ; 3,8 ; 3,3 ; 3,3 ; 7,8).

**Couleur :** (LJ) couleur à la lumière du jour, (Rv) couleur après révélation à la vanilline sulfurique, (Ra) couleur après révélation à l'anisaldéhyde, (Rd) couleur après révélation par le dpph, (Rβ.c) couleur après révélation par le β-carotène.

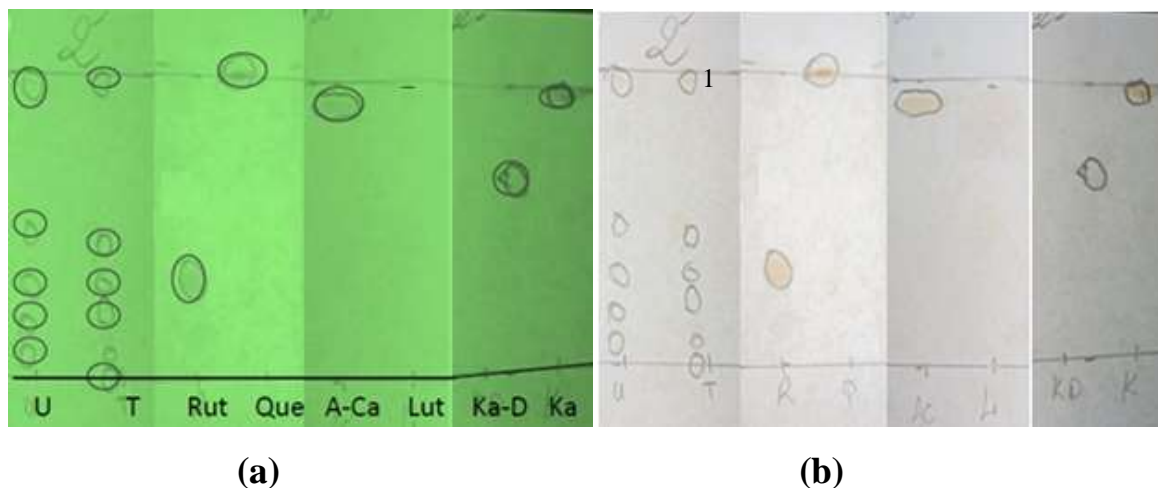
**Echantillons :** (Em) Extrait de feuilles de *Clematis flammula* obtenus par macération, (Eu) Extrait de feuilles de *Clematis flammula* obtenue par ultrasonication.

**Standards :** (Que) Quercétine, (Rut) rutine, (A.Caf) acide caféique, (Lut) lutéoline, (Ka.D) kaemferol dérivé, (Ka) kaemferol.

### III.4.1. Caractérisation des polyphénols après la révélation avec le $\beta$ -Carotène

#### III.4.1.1. Caractérisation dans le système Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique/ Eau

Les fractionnements des différents composés phénoliques des extraits des feuilles de *Clematis flammula* par révélation avec le  $\beta$ - Carotène et dans le premier système sont illustrés dans la **figure (21)** ci-dessous :



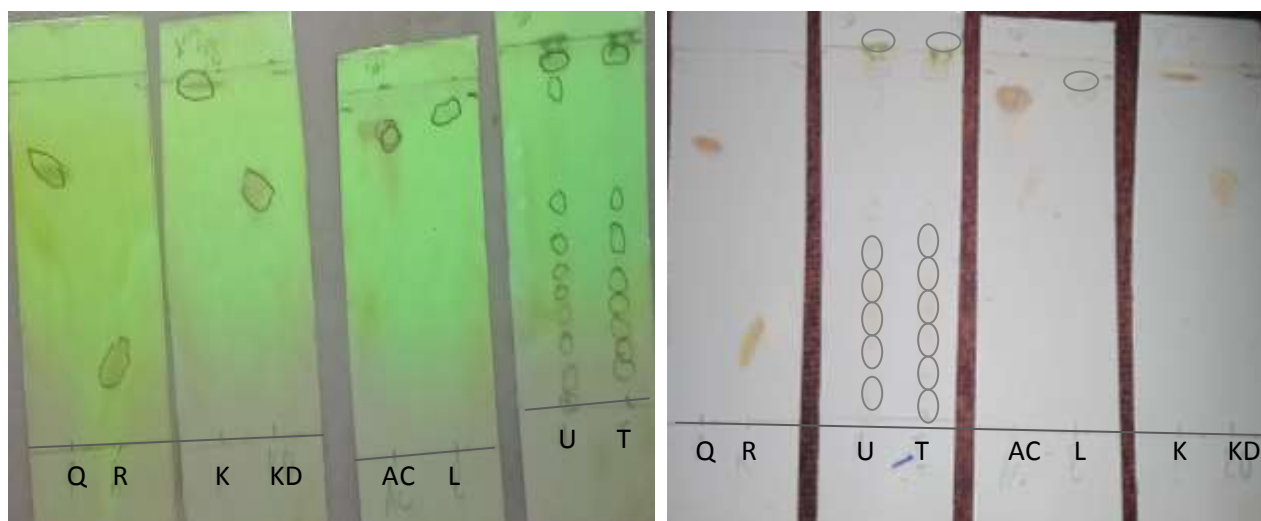
**Figure 21:** Profil chromatographique des extraits des feuilles de *Clematis flammula* avec le système 1 (Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique/ Eau).

(a) sous UV (256nm), (b) à l'œil nu à la lumière du jour après la révélation par le  $\beta$ - Carotène. (U) extrait obtenue par ultrasonication, (T) extrait obtenue par macération, (Que) Quercétine, (Rut) rutine, (A.Caf) acide caféique, (Lut) lutéoline, (Ka.D) kaempférole dérivé, (Ka) kaempférole.

Le profil chromatographique montre que les fractions des deux extraits (U et T) séparées par ce système ont montré qu'une seule fraction (1) possède une activité antioxydante qui empêcherait le blanchiment de la beta carotène. Les composés actifs restent jaune-orangés, telle la couleur observée pour la rutine, la quercétine, et le kaemferol indiquant une activité antioxydante plus élevée que celle des extraits. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces fractions ne soient pas aussi concentrées que les standards, ou qu'elles aient un pouvoir antioxydant moins fort que les standards.

### III.4.1.2. Caractérisation dans le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau)

Les fractionnements illustrés dans la **figure (22)** ci-dessous présentent la migration des différents composés phénoliques des extraits des feuilles de *Clematis flammula* qui sont révélés par le  $\beta$ - Carotène et dans le deuxième système :



(a)

(b)

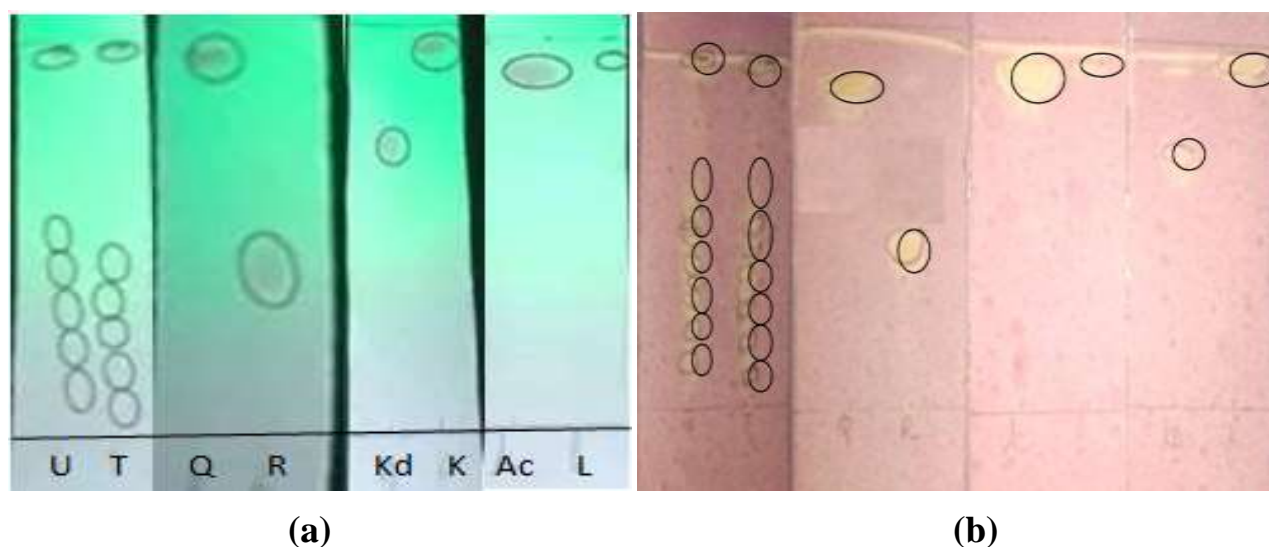
**Figure 22 :** Profil chromatographique des extraits des feuilles de *Clematis flammula* avec le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau).

(a) sous UV (256nm), (b) à l'œil nu à la lumière du jour après la révélation par le  $\beta$ - Carotène. (U) extrait obtenu par ultrasonication, (T) extrait obtenu par macération, (Que) Quercétine, (Rut) rutine, (A.Caf) acide caféique, (Lut) lutéoline, (Ka.D) kaempférole dérivé, (Ka) kaempférole.

Selon la **figure (a, 22)**, a révélé plusieurs fractions, montre que les différents extraits présentent presque les mêmes fractions où y'a six composés en communs et les profils chromatographiques obtenus à l'œil nu après la révélation avec le  $\beta$ -carotène (**figure b,22**) montrent que les deux extraits constituent le Kaempférol.

### III.4.2. Caractérisation des polyphénols après la révélation avec le DPPH

Les fractionnements des différents composés phénoliques des extraits des feuilles de *Clematis flammula* par révélation avec le DPPH et dans le deuxième système sont illustrés dans la **figure (22)** ci-dessous :

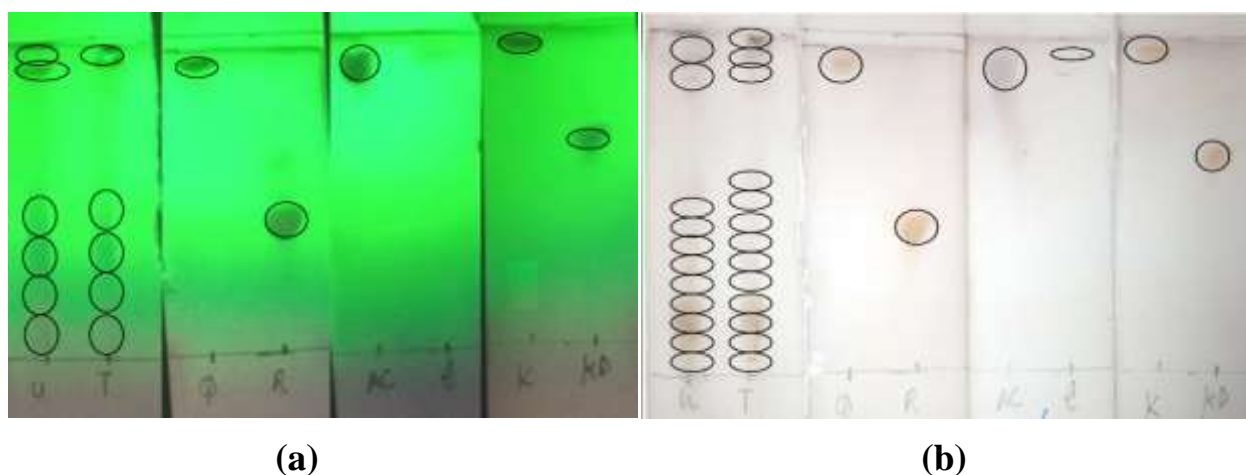


**Figure 23 :** Profil chromatographique des extraits des feuilles de *Clematis flammula* avec le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau).

(a) sous UV (256nm), (b) à l'œil nu à la lumière du jour après la révélation par le DPPH. (U) extrait obtenue par ultrasonication, (T) extrait obtenue par macération, (Q) Quercétine, (R) rutine, (A.Caf) acide caféique, (Lut) lutéoline, (Ka.D) kaempférole dérivé, (Ka) kaempférole.

Suivant la **figure (23)** presque toutes les fractions (sauf la dernière) des deux extraits ont montré une décoloration du DPPH indiquant une activité antioxydante. De même, tous les standards ont montré une décoloration conséquente du DPPH, la plus évidente étant celle de l'acide caféique.

### III.4.3. Caractérisation des polyphénols après la révélation avec la Vanilline sulfurique



**Figure 24:** Profil chromatographique des extraits des feuilles de *Clematis flammula* avec le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau).



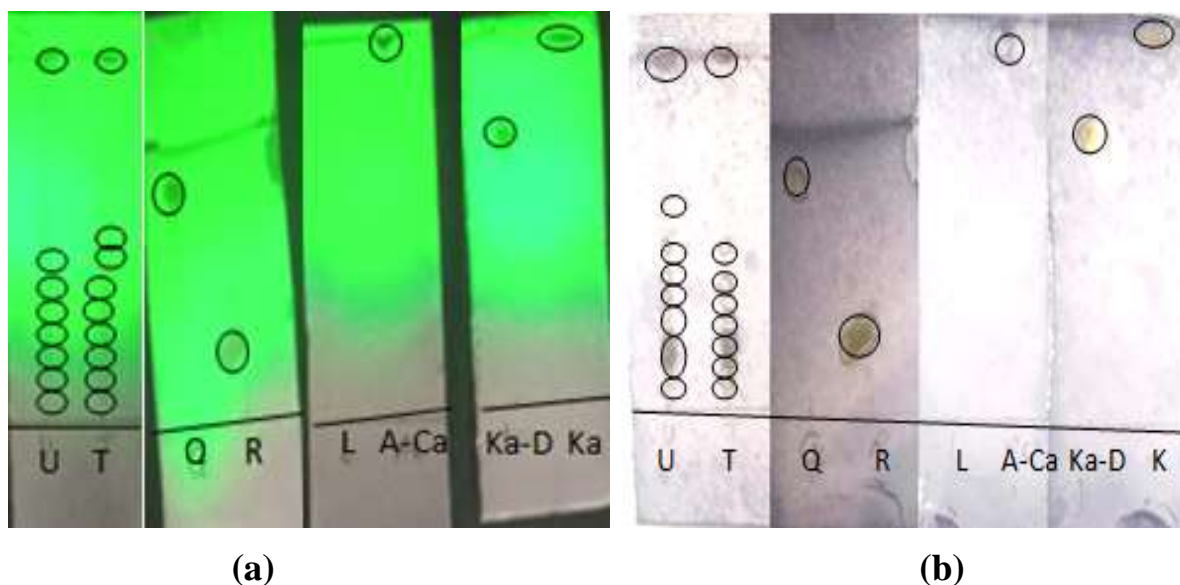
(a) sous UV (256nm), (b) à l'œil nu à la lumière du jour après la révélation par la vanilline sulfurique. (U) extrait obtenue par ultrasonication, (T) extrait obtenue par macération, (Que) Quercétine, (Rut) rutine, (A.Caf) acide caféique, (Lut) lutéoline, (Ka.D) kaempférole dérivé, (Ka) kaemferol.

Les profils chromatographiques sous UV et avec la vanilline sulfurique montrent que cette dernière a révélé beaucoup plus de fractions.

Les deux extraits U et T présentent presque le même profil chromatographique indiquant dix composés en commun. Les deuxième et troisième composés de couleur violette semblable à celle de la rutine ou le kaemferol peuvent être assimilés à des anthocyanes ou des flavanols. La dernière fraction (13) a une couleur marron qui démontre la présence d'un sucre. L'acide caféique a une couleur bleu foncé caractéristique des acides phénoliques avec la vanilline.

#### III.4.4. Caractérisation des polyphénols après la révélation avec l'Anis aldéhyde

Les fractionnements illustrés dans la **figure (25)** ci-dessous présentent la migration des différents composés phénoliques des extraits des feuilles de *Clematis flammula* qui sont révélés par l'Anisaldhyde et dans le système 2. L'anis aldéhyde est connu pour révéler la présence de saponines (bleu violet), des stérols (violet) ou des sucres (gris) (**Moritz et al., 2022**). L'extrait U montre 9 composés dont 8 en commun avec l'extrait T.



**Figure 25 :** Profil chromatographique des extraits des feuilles de *Clematis flammula* avec le système 2 (Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Chloroforme/ Eau).

(a) sous UV (256nm), (b) à l'œil nu à la lumière du jour après la révélation par l'Anisaldhyde.

(U) extrait obtenue par ultrasonication, (T) extrait obtenue par macération, (Que) Quercétine, (Rut) rutine, (A.Caf) acide caféique, (Lut) lutéoline, (Ka.D) kaempférole dérivé, (Ka) kaemferol.

La révélation par l'UV montre 8 fractions pour l'extrait U et 9 fractions pour l'extrait T. La fluorescence des composés phénoliques sous UV est due à leurs doubles liaisons dans le noyau aromatique (**Cerovic et al.,1999**). L'anis aldéhyde a permis de révéler la présence probable de saponines (3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> spots) vu leur couleur. Seulement, comme ces spots donne une fluorescence avec les UV, les composés en question ne peuvent pas être des saponines qui ne possèdent presque pas de double liaisons mais des acides phénoliques puisque leurs couleurs ressemblent à celle de l'acide caféique.

# *Conclusion*

## Conclusion

---

Notre travail a été réalisé sur la poudre des feuilles de *Clematis flammula*, une plante médicinale largement connue de par ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires attribuées aux polyphénols, ainsi l'objectif de cette étude est l'optimisation de l'extrait des feuilles de *Clematis flammula* et le dosage et l'évaluation de l'activité antioxydante de cet extrait. Cette étude a été effectuée par l'utilisation de deux types d'extraction qui sont la macération et l'ultrasonication et par la variation de différents paramètres : le ratio, la concentration de l'éthanol, le temps de l'ultrasonication et la température d'ultrasonication suivi par une classification des polyphénols par la chromatographie.

La première étape dans cette étude c'est l'identification des meilleurs paramètres d'extraction ou les ces derniers sont : concentration d'éthanol (95%), le temps optimal c'est 50min, la température d'ultrasonication est 50°C et le ratio 1/4 ainsi que l'ultrasonication a été la meilleure méthode d'extraction. Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode colorimétrique du réactif Folin-ciocalteu et l'activité antioxydante a été évaluée par le test DPPH et le test du blanchiment du  $\beta$ -Carotène où les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanoïque optimisé possède une teneur importante en polyphénols qui assure son activité antioxydante.

La séparation par CCM des extraits de feuille de *Clematis flammula* a montré la présence des fractions de type « flavonoïdes » (rutine et quercétine) et d'autres composés non-identifiés.

*Références  
bibliographiques*

## Référence bibliographique

---

### A

- 1-Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI.** Extraction of phenolic compounds. *Curr Res Food Sci.* 2021;4:200-214.
- Ssamula, A., Ogwal, G., Okiror, A., Mukasa, B. S., Wasswa, P.** Heritability of reversion from Sweet potato feathery mottle virus infection in sweetpotato.2019; *14(32)*, 1601–1612.
- 2-Anizon J.Y., Lemaire B., Surbled M.** Extraction assistée par microondes. *Techniques de l'ingénieur Agroalimentaire.* 2003,2:F3060.
- 3-Annegowda HV, Anwar LN, Mordi MN, Ramanathan S, Mansor SM.** Influence of sonication on the phenolic content and antioxidant activity of *Terminalia catappa* L. leaves. *Pharmacognosy Res.* 2010;2(6):368-373.
- 5-Arruda HS, Silva EK, Pereira GA, et al.** Effects of high-intensity ultrasound process parameters on the phenolic compounds recovery from araticum peel. *Ultrason Sonochem.* 2019;50:82-95.
- Atmani, D., Ruiz-Larrea, M. B., Ruiz-Sanz, J. I., Lizcano, L. J., Bakkali, F., &**
- 6-Atmani, D.** Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research.*2011; *5(4)*, 589-598.

### B

- 7-Baaziz I, Ghazouani L, Rjeibi I, Feriani A, Mnafgui K, Mufti A, Traikia M, Le Cerf D, Michaud P, Pierre G, et al.** Structural Characterization and Cardioprotective Effect of Water-Soluble Polysaccharides Extracted from *Clematis flammula*. *Applied Sciences.* 2022; *12(21)*:10818.
- 8-Baaziz I, Ghazouani L, Rjeibi I, Feriani A, Mnafgui K, Mufti A, Traikia M, Le Cerf D, Michaud P, Pierre G, et al.** Structural Characterization and Cardioprotective Effect of Water-Soluble Polysaccharides Extracted from *Clematis flammula*. *Applied Sciences.* 2022; *12(21)*:10818.
- 9-Barroso, M. R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Ferreira, I. C.** Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. *Industrial crops and products.* 2014 *53*, 330-336.
- 10-Benhamou, N.** La résistance chez les plantes: principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Paris(France) Edition Tec et Doc ; 2009;90:45-85.
- 11-Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R.** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences.* 2016 ; *28*.
- 12-Bruneton, J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 1999.

## Référence bibliographique

---

### C

**13-Cerovic, Z. G., Samson, G., Morales, F., Tremblay, N., Moya, I.** Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. *Agronomie*. 1999; 19(7), 543-578.

**14-Chawla, R., Kumar, S., & Sharma, A.** The genus Clematis (Ranunculaceae): chemical and pharmacological perspectives. *Journal of ethnopharmacology*.2012; 143(1), 116-150.

**15-Chemat, F.** Zill-e-Huma; Khan, MK Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing. *Preservation and Extraction. Ultrason. Sonochem*.2011;18(4), 813-835.

### D

**16-Dai J, Mumper RJ.** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313-7352.

**17-Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., Tawata, S.** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food control*. 2008; 19(4), 346-352.

**18-Delgado, A., Gonçalves, S., Romano, A.** Mediterranean Diet: The Role of Phenolic Compounds from Aromatic Plant Foods. *Foods*. 2023;12(4), 840.

### E

**19-Eichler H, Jeanes J A, Walsh N G.** Ranunculaceae. In : *Kellermann Jürgen* (ed). Flora of south Australia (ed.5) stat herbarium of south Australia. Australia (Adelaide) : Kellermann;2011, :1-18.

### F

**20-Fennell, C. W., Lindsey, K. L., McGaw, L. J., Sparg, S. G., Stafford, G. I., Elgorashi, E. E., Van Staden, J.** Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *Journal of ethnopharmacology*. 2004; 94(2-3), 205-217.

**21-Finaud, J., Lac, G., Filaire, E.** Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports medicine*. 2006 ;36, 327-358.

### G

**22-Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D.** Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*. 2003 ;91.

**23-Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M. J.** Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry* . 2005;53(5), 1370-1373.

**24-Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z., Juraimi, A. S., & Tayebi-Meigooni, A.** Comparative evaluation of different extraction techniques and solvents for the assay of phytochemicals and antioxidant activity of hashemi rice bran. *Molecules*. 2015;20(6), 10822-10838.

**25-Halliwel, B., Gutteridge, J. M.** Free radicals in biology and medicine,1985.

## Référence bibliographique

---

**Howard, L., Pandjaitan, N.** Pressurized liquid extraction of flavonoids from spinach. *Journal of food science*. 2009;73(3), C151-C157.

### K

**26-Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., He, X.** Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 2014 2(7), 377-392.

**27-Kabouche, A., Kabouche, Z., Öztürk, M., Kolak, U., Topçu, G.** Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food chemistry*. 2007;102(4), 1281-1287.

### L

**28-Lattanzio, V.** Phenolic compounds: introduction 50. *Nat. Prod.* 2013; 1543-1580.

**29-Lazare Jean-Jacques, J., Macheix, J., Fleuriet, A., C. Jay-Allemand.** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, collection biologie, Lausanne ; 2005. In: *Le Journal de botanique*, n°33, 2006. *Le journal de botanique*. p.94.

**30-Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*. 2010;4(8), 118.

**31-Lohani, U. C., Muthukumarappan, K.** Study of continuous flow ultrasonication to improve total phenolic content and antioxidant activity in sorghum flour and its comparison with batch ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021;71, 105402.

### M

**32-Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*. 2013.(9), 35.

**33-Matsumura, Y., Kitabatake, M., Kayano, S. I., Ito, T.** Dietary Phenolic Compounds: Their Health Benefits and Association with the Gut Microbiota. *Antioxidants*. 2023;12(4), 880.

**34-Migdal, C., Serres, M.** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/science* . 2011 ;27(4), 405-412.

**35-Miikeda, O., Kita, K., Handa, T., Yukawa, T.** Phylogenetic relationships of *Clematis* (Ranunculaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2006 152(2), 153-168.

### N

**36-Nickavar, B., Esbati, N.** Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. *Journal of acupuncture and meridian studies* . 2012 5(3), 119-125.



## Référence bibliographique

---

**37-Niknamian, S.** Comparison of Classical and Ultrasound-Assisted Extraction Methods on Antioxidant Activities of Pharmaceutically Active Compounds from Valeriana Officinalis. Available at SSRN 3845135, 2019.

### O

**38-Oksana, S., Marian, B., Mahendra, R., Bo, S. H.** Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012; 6(13), 2526-2539.

**39- Olszowy, M.** What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;144, 135-143.

### P

**40-Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A., Codina, C.** Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life sciences*. 2003;73(13), 1667-1681.

**41-Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J. O.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*. 2002;16(4), 233-239.

**42-Pincemail, J., Vanbelle, S., Gaspard, U., Collette, G., Haleng, J., Cheramy-Bien, J. P., Defraigne, J. O.** Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40–48 years from the ELAN study in the province of Liege, Belgium. *Human Reproduction*. 2007; 22(8), 2335-2343.

**43-Puspawati, G. A. K. D., Marsono, Y., Supriyadi, S., Armunanto, R.** Comparison of sonication with maceration on antioxidant potency of anthocyanin and karotenoid of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). *Agritech*. 2019;38(3), 304-312.

### R

**44-Riant, F., Bergametti, F., Ayrignac, X., Boulday, G., Tournier-Lasserre, E.** Recent insights into cerebral cavernous malformations: the molecular genetics of CCM. *The FEBS journal*. 2010;277(5), 1070-1075.

**45-Rios, J. L., Recio, M. C.** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(1-2), 80-84.

**46-Routray, W., Orsat, V.** Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*. 2012, 409-424.

### S

**47-Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B.** Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*. 2019; 10, 1-29.

## Référence bibliographique

---

**48-Ssamula, A., Ogwal, G., Okiror, A., Mukasa, B. S., Wasswa, P.** Heritability of reversion from Sweet potato feathery mottle virus infection in sweetpotato.2019; *14*(32), 1601–1612.

**49-Strati, I. F., Kostomitsopoulos, G., Lytras, F., Zoumpoulakis, P., Proestos, C., Sinanoglou, V. J.** Optimization of polyphenol extraction from *Allium ampeloprasum* var. porrum through response surface methodology. *Foods*. 20187(10), 162.

**50-Sharma, M., Dadhwal, K., Gat, Y., Kumar, V., Panghal, A., Prasad, R., Gat, P.** Newer techniques in extraction of oleaginous flaxseed constituents. *OCL*. . 2019; 26, 14.

### T

**51-Tao, Y., Zhang, Z., Sun, D. W.** Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014; *21*(4), 1461-1469.

**52-Touvier, M., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M. C.** Consommation élevée de  $\beta$ -carotène: un risque de certains cancers diminué chez les non-fumeuses, mais augmenté chez les fumeuses. *M/S: médecine sciences*. 2006; *22*(3), 319-320.

**53-Tsao, R., Deng, Z.** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of chromatography B* . 2004 *812*(1-2), 85-99.

### V

**54-Van Wyk, B. E.** Commercially important African medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*. 2015;*176*, 118-134.

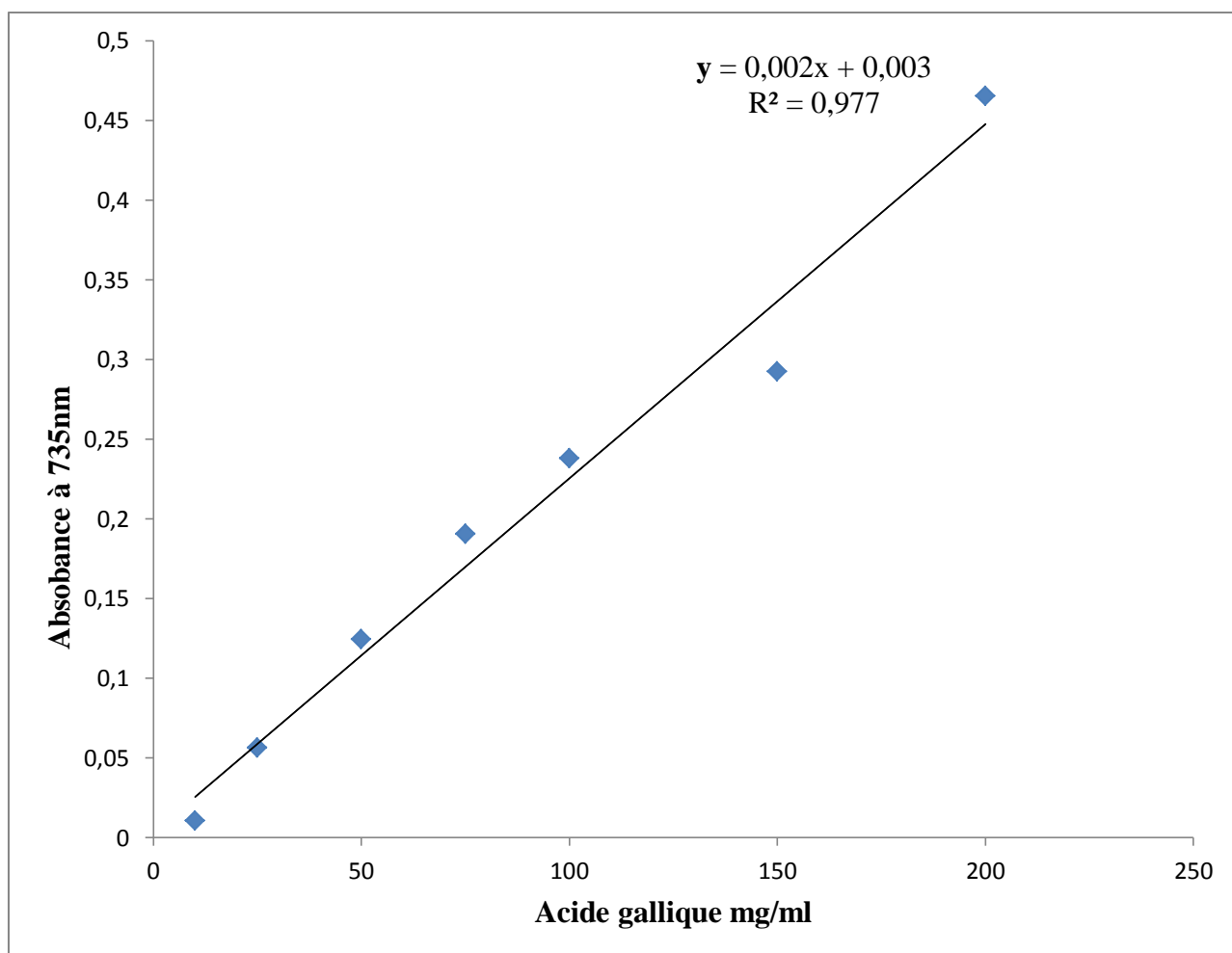
**55-Vuolo, M. M., Lima, V. S., Junior, M. M.** Bioactive compounds: health benefits and potential applications . 2019; 33-50.

### Y

**56-Yen G.C, Chen H.Y, Lee J.C.E.** *Sci. Food Agriculture*. 1999;*79*:1213-1217.

**57-Yous, F., Atmani-Kilani, D., Debbache-Benaid, N., Cheraft, N., Sebaihi, S., Saidene, N., Atmani, D.** Anti-ulcerogenic and proton pump (H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase) inhibitory activity of *Clematis flammula* L. extract. *South African Journal of Botany*. 2018*119*, 390-399.

# *Annexes*



**Annexe** : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

## Résumé

*Clematis flammula* L. est une plante appartenant à la famille des Ranunculaceae, largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter l'arthrite rhumatoïde, les brûlures et les plaies superficielles. Le but la présente étude est d'optimiser l'extraction afin d'obtenir un taux maximal en composés phénoliques, ainsi qu'un pouvoir antioxydant optimal. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'activité antioxydants a été réalisée par le test de DPPH et le test du blanchiment du  $\beta$ -carotène, ainsi que la caractérisation des polyphénols par CCM. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait de *Clematis flammula* L. contenait un taux en polyphénols totaux important et constituait des différents polyphénols  $450 \pm 300$ mg AG Eq/g d'extrait. Dans le test DPPH, les extraits étudiés ont une importante activité anti-radicalaire avec un pourcentage d'inhibition égale à  $55 \pm 70\%$ , et le test de blanchiment de beta carotène confirme cette propriété anti-radicalaire par un pourcentage d'inhibition  $58 \pm 87\%$ .

**Mots clés :** *Clematis flammula* L., polyphénols totaux, activité antioxydants

## Summary

*Clematis flammula* L. is a plant belonging to the Ranunculaceae family, widely used in traditional medicine to treat rheumatoid arthritis, burns and superficial wounds. The aim of the present study is to optimize the extraction in order to obtain a maximum level of phenolic compounds, as well as optimal antioxidant power. The total polyphenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was carried out by the DPPH test and the  $\beta$ -carotene bleaching test, as well as the characterization of polyphenols by TLC. The results obtained showed that the *Clematis flammula* L. extract contained a high level of total polyphenols and constituted different polyphenols  $450 \pm 300$ mg AG Eq/g of extract. In the DPPH test, the extracts studied have significant anti-radical activity with an inhibition percentage equal to  $55 \pm 70\%$ , and the beta carotene bleaching test confirms this anti-radical property with an inhibition percentage of  $58 \pm 87\%$ .

**Key words:** *Clematis flammula* L., total polyphenols, antioxidant activity.

## ملخص

الياسمين البري هو نبات ينتمي إلى عائلة الحدان، ويستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج التهاب المفاصل الروماتويدي والحروق والجروح السطحية. الهدف من هذه الدراسة هو تحسين عملية الاستخراج من أجل الحصول على أقصى مستوى من المركبات الفينولية، فضلاً عن القوة المثلى المضادة للأكسدة. تم تحديد إجمالي محتوى البوليفينول تم بواسطة Folin-Ciocalteu. تم تنفيذ نشاط مضادات الأكسدة بواسطة اختبار DPPH واختبار تبييض البيتا كاروتين، بالإضافة إلى توصيف البوليفينول بواسطة طريقة TLC. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلص الياسمين البري يحتوي على مستوى عالٍ من إجمالي البوليفينول ويشكل بوليفينول مختلف  $300 \pm 450$  ملجم مكافئ/جم من حمض قالك. في اختبار DPPH أظهرت المستخلصات المدروسة نشاطاً كبيراً مضاداً للجذور بنسبة تثبيط تساوي  $55 \pm 70\%$ ، ويؤكد اختبار تبييض البيتا كاروتين هذه الخاصية المضادة للجذور بنسبة تثبيط  $58 \pm 87\%$ .

**المفتاحية الكلمات:** الياسمين البري، نشاط مضاد للأكسدة، البوليفينول الكلي.