République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Spécialité Génétique fondamentale et appliquée

جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Dosage et révélation des saponines totaux dans trois extraits de *Clematis flammula*

Présenté par :

BOUAKAZ Radhouane

Soutenu le : 26/06/2018

Devant le jury composé de :

Mme RAHMANI - BERBOUCHA M.	MAA	Présidente
Mme ATMANI D.	MCA	Promotrice
Mlle REMILA S.	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Tout d'abord, louange à « ALLAH » : le tout puissant, le très miséricordieux qui m'a donné la santé, la force, le courage et l'opportunité de mener ce travail à terme.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme Atmani d'avoir accepté d'être promotrice de ce mémoire.

Je la remercie pour son encadrement de qualité, sa disponibilité, et pour la confiance qu'elle m'a accordée tout en me laisser libre dans mon choix.

Je la remercie ainsi pour ses pertinents conseils, ses orientations et pour les efforts qu'elle avait consentis avec beaucoup de sympathie et de patience, ce qui m'a permis de mener à terme ce projet.

Mes Remerciements vont également à Mme Berboucha pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury .

Je adresse mes remerciements aussi à Mlle Remila, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je ne saurais remercier assez les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail, qu'ils trouvent ici notre profonde gratitude.

Je cite spécialement,

Mme Naima l'ingénieure du laboratoire de génétique, que je remercie infiniment pour son aide.

Sans oublier de remercier l'ensemble des enseignants et doctorants du laboratoire de génétique.

Ainsi que tous les enseignants, et les dirigeants du département de Biologie Physico-Chimique.

Et à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms ne sont pas cités.

Dédicaces

Que ce travail témoigne de mes respects :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et
Source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour
ma réussite, que dieu te garde, à toi Mon père ; Boubeker.
A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de
mon coeur, ma vie et mon bonheur ; maman Samira que j'adore.
A mon grand pere: Said
A ma petite soeur : Merieme et mon grand frère : Khaled.
A ma tante: Warda.
A mon meilleur ami: Fateh
Pour votre soutient et encouragements, vous occupez une place particulière
dans mon coeur. Je vous dédie ce travail en vous souhaitant un radieux plein de
bonheurs et de succès.
A tous mes amis: Hichem, Houssem, Nassim, Khaoula, Hassna,
A tous ceux qui me sont chers de près et de loin Ils vont trouver ici l'expression de
mes sentiments de respect et de reconnaissance Pour le soutien qu'ils n'ont cessé de
me porter.

RADHOUANE

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction…….....1

Chapitre I: Revue Bibliographique

I.1. Plantes médicinales.……..……...2

I.2. Métabolites secondaires……..…….…2

I.3. Saponines…….……3

I.4. Structure des saponines……6

I.5. Chromatographie……11

Chapitre II: Matériel et Méthodes

II.1. Matériel..……...12

II.2. Méthodes...……...14

II.3. Tests phytochimiques……...16

II.4. Dosage des saponines totaux ……...…..……17

II.5. Chromatographie sur couche mince (CCM).....18

II.6. Dosage des fractions chromatographiques des saponines.....20

Chapitre III: Résultats et discussion

III.1. Résultats et discussion.....21

III.2. Tests phytochimiques…….....21

III.3. Chromatographie sur couche mince (CCM).....24

III.4. Dosage des saponines dans les extraits AE, EP et NB de *C. flammula*.....34

III.5. Dosage des fractions chromatographiques.....35

Conclusion et perspectives…….36

Références Bibliographiques.....37

Annexe

Liste des abréviations

AE: Acétate d'éthyle.

AO: Acide oléanolique**.**

CCM: Chromatographie sur couche mince.

C. flammula: *Clematis flammula.*

DI: Diosgénine.

EP: Ether de pétrole**.**

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

K+: Potassium**.**

MS: Mass Spectrometry.

NB: n-butanol**.**

Rf: Rapport frontal.

RMN: Resonance Magnétique Nuclear.

UV: Ultraviolet.

V/V: Volume/Volume.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Structure chimique de la solanine, une saponine rencontrée chez toutes les *Solanacée*	**4**
02	Structure générale des saponines stéroïdiques (Diosgénine)	**6**
03	Exemples des saponines à génines stéroidiques	**7**
04	Structure générale des saponines triterpéniques	**8**
05	Exemples de saponines à génines triterpéniques	**9**
06	Les différents sucres constitutifs des saponines	**10**
07	Photographies originales des feuilles (A) et fleurs (B) de *Clematis flammula*	**12**
08	Protocole d'extraction	**15**
09	Protocole de dosage des saponines totaux	**17**
10	Résultats du test de Libermann-Burchard des trois extraits. (A): Ether de pétrole. (B): Acétate d'éthyle et (C): n-butanol	**21**
11	Résultats du test de formation de mousse des trois extraits. (A):Acétate d'éthyle. (B):Ether de pétrole. (C): n-butanol	**22**
12	Résultats du test d'hémolyse (A): Tube témoin (C: control) contenant 0,2 ml de sang à 10% dans une solution saline normale diluée avec 0,2 ml de solution saline normale. (B): Acétate d'éthyle; (C): Ether de pétrole; (D): n-butanol	**23**
13	Plaque 1: Chromatographie sur couche mince de trois extraits de *Clematis flammula* dans le système1: chloroforme: méthanol: acide acétique: eau (100: 15: 0,5: 0,3). AE: acétate d'éthyle EP: éther de pétrole et NB: n-butanol, et les standards suivants: DI: diosgénine et AO: acide oléanolique	**25**
14	Plaque 1: Chromatographie sur couche mince de trois extraits de *Clematis flammula*, après révélation par lampe UV (312nm). dans le système1: chloroforme: méthanol: acide acétique: eau (100: 15: 0,5: 0,3). AE: acétate d'éthyle EP: éther de pétrole et NB: n-butanol, et les standards suivants: DI: diosgénine et AO: acide oléanolique.	**28**
15	Plaque 2: Chromatographie sur couche mince de trois extraits de *Clematis flammula* dans le système2: Acétate d'éthyle: acide acétique: acide formique: eau (100 :11 :11 : 26). EA: acétate d'éthyl, EP: éther de pétrole et NB: n-butanol, et les standards suivants: DI: diosgénine et AO: acide oléanolique.	**31**
16	Concentrations des trois extraits (EP: Ether de pétrole; AE: Acétate d'éthyle et NB: n-butanol) en équivalents µg acide oléanolique /mg d'extrait (eq µg AO/mg extrait). Le test Anova montre une différence très significative ($p<0,001$) entre les extraits acétate d'éthyle et ether de pétrole comparés avec l'extrait du n-butanol.	**34**

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Rf et couleurs des composés de la plaque 1 après révélation par l'anisaldéhyde.	**26**
II	Rf et fluorescences des composés de la plaque 1 après révélation par lampe UV (312nm).	**29**
III	Rf et couleurs des composés de la plaque 2 après révélation par l'anisaldéhyde.	**32**
IV	Résultats de dosage des fractions chromatographiques de saponines pour deux extraits l'AE et l'EP de *C. flammula.*	**35**

Introduction:

La phytothérapie, traitement basée sur les plantes médicinales, connait actuellement un progrès. En effet, dans toutes les cultures, la tradition attribue aux plantes toutes sortes de vertus, et en particulier, des vertus thérapeutiques (OMS, 2010).

Plusieurs raisons motivent le recours aux traitements par les plantes médicinales.

Les médicaments synthétiques produisent plusieurs effets secondaires. Par contre l'action d'un extrait végétal brut n'est pas toujours identique à celui du produit isolé ou synthétisé, le médicament d'origine végétale est en général mieux toléré par l'organisme (Lakshmi Srinivas *et al.,* 2013).

Les métabolites secondaires, constituants majeurs de plantes médicinales, apparaissent comme une ressource thérapeutique prometteuse, qui fait l'objet de nombreuses recherches pour le développement de nouveaux médicaments. Parmi ces produits, les polyphénols, les tanins, les saponines, les quinones, les flavonoïdes, les terpènes, les stérols et les alcaloïdes, qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires (Chawla *et al*., 2012). Inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, cytoprotecteurs (Atmani *et al.,* 2009). Notamment comme gastro-protecteurs et dans le traitement des maladies gastro-intestinales (Amirshahrokhi et Khalili, 2015).

Notre choix s'est porté sur les métabolites secondaires, précisément les saponines de *Clematis flammula.* Une plante qui appartient à la famille des Renonculacées. Elle est dénombrée en Algérie parmi les plantes médicinales représentant un large arsenal thérapeutique, en raison de sa richesse en métabolites secondaires (Atmani *et al*., 2011).

Dans cette étude, notre but s'est dirigé vers la séparation par CCM des constituants de trois extraits des feuilles de cette plante, acétate d'éthyle, éther de pétrole, et n.butanole. Le dosage des saponines à été aussi réalisé.

I.1. Plantes médicinales

Les plantes médicinales ont été, pour longtemps, la seule source de substances actives utilisées pour traiter des maladies et des maux. Récemment les plantes médicinales présentent un intérêt particulier pour la recherche scientifique. Elles sont sélectionnées sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle par la population (Trouillas *et al.,* 2003).

Le médicament à base de plantes est un "complexe" de molécules, issu d'une ou plusieurs espèces végétales (Chabrier, 2010).

Selon la jurisprudence en France : « une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite dans la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal ». Les plantes médicinales sont caractérisées par des propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales. Elles sont considérées comme des médicaments exclusivement vendus par des pharmaciens. Cependant, certains sont toujours en vente libre notamment en Algérie. Les métabolites secondaires sont des composants majeurs des plantes médicinales (Trouillas *et al.,* 2003), y compris les saponines qui se trouvent largement répandues dans les plantes, comme *Clematis flammula* (Chawla *et al.,* 2012).

I.2. Métabolites secondaires

I.2.1. Définition

«Métabolite secondaire» ce terme est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes. Telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques (Hartmann, 2007)**.**

I.2.2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés parmi eux: les composés phénoliques, les saponines, les terpènes et les alcaloïdes. Chacun de ces groupes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003).

I.2.3. Rôle des métabolites secondaires

a. Fonctions pour la plante

Les métabolites secondaires peuvent être des moyens de signalisation et d'interaction entre les plantes et les animaux disséminateurs. Certains métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes d'attraction des animaux nécessaires à la dispersion des graines et des insectes pollinisateurs par l'intermédiaire de couleurs et d'odeurs (Krief, 2003).

b. Fonctions pour l'être humain

Les métabolites secondaires végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Ces composés sont en grande mesure illustrés en thérapeutique (Bahorun, 1997).

I.3. Saponines

Les saponines (Figure 3) sont des métabolites secondaires (Hartmann, 2007), qui sont généralement connus comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal (Vincken *et al.,* 2007). Le nom «saponine» est dérivé du mot latin sapo, qui signifie «savon». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante. L'étude de (Mayank *et al.,* 2011), rapporte que les saponines existent dans les plantes sous forme biologiquement active et sont impliquées dans la phyto-protection antimicrobienne.

En effet, les saponines trouvent de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie cosmétique en raison de leur propriétés moussante. Les applications des saponines s'étendent à l'agriculture, pour l'assainissement des sols (Chan *et al.,* 2008) et en tant que pesticides naturels (Chen *et al.,* 2007).

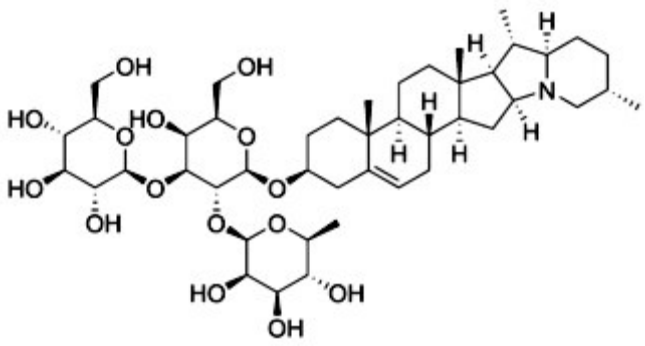


Figure 1: Structure chimique de la solanine, une saponine rencontrée chez toutes les *Solanacée* (Garai, 2014).

I.3.1. Propriétés biologiques des saponines

Les propriétés biologiques de ce métabolite secondaire ne sont pas limitées à la protection des plantes, car de nombreuses espèces végétales à forte teneur en saponines sont utilisées en médecine traditionnelle, comme notamment les racines de *Bupleurum falcatum L* et de *Panax ginseng* (Fu *et al.,* 2005), pour ne citer que quelques exemples. Les saponines retiennent l'attention aussi bien pour leur exploitation industrielle en lien avec leurs propriétés biologiques différentes, parmi eux: anti-inflammatoires (Wang *et al.,* 2008), antiulcéreuses (Nwafor et Bassey, 2007), antifongique (Carotenuto *et al.,* 1999), anti-diabétique (Luo *et al.,* 2008), anti-obésité (Zheng *et al.,* 2007) et anticancéreuses (Jabrane *et al.,* 2011).

I.3.2. Autres activités

a. Activité hémolytique

Les saponines ont le pouvoir de rompre la membrane érythrocytaire (membrane solide mais souple jouant un role important dans la déformabilité du globule rouge, et retenant l'hémoglobine). La propriété hémolytique est généralement justifiée par l'interaction entre les saponines et les stérols de la membrane érythrocytaire. Ce qui conduit à l'éclatement de la membrane, provoquant ainsi une augmentation de la perméabilité suivi de la perte de l'hémoglobine (Tabassi *et al.,* 2006).

b. Effet sur la membrane plasmique

Les saponines facilitent la libération intracellulaire de l'ion potassium K+
ainsi que la lactase déshydrogénase (enzyme intaracellulaire participle à la glycolyse), ce qui montre leur rôle dans la déstabilisation de la membrane plasmique (Wassler *et al.,* 1990).

c. Activités anti-inflammatoire

Les saponines isolés de la partie aérienne de *Dianthus barbatos* présentent les activités analgésique et anti-inflamatoire (Cordell *et al.,* 1977). L'activité anti-inflammatoire a également été prouvé par d'autres travaux sur des saponines isolées de *Polygala japonica* (Wang *et al.,* 2008).

I.4. Structure des saponines.

Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine (qui est définie comme le groupement aglycone ou non glucidique de la saponine), les saponines à génine stéroïdique et les saponines à génine triterpénique (Mayank *et al.,* 2011).

I.4.1. Les saponines à génine stéroïdique

Ces saponines (Figure 2) sont presque exclusivement présentes chez les Angiospermes monocotyledone Le squelette à 27 atomes de carbone comporte habituellement six cycles. Comme exemple les saponines isolées de la famille des Alliaceae (Raju, 2004).

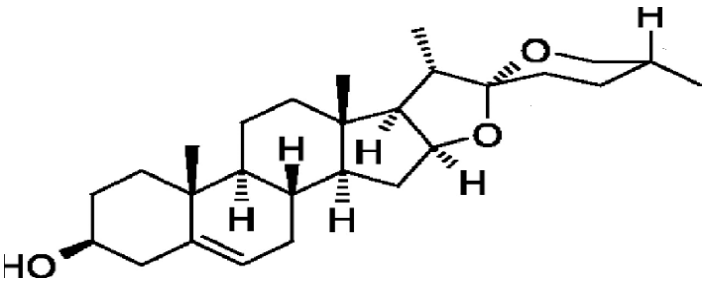


Figure 2: Structure générale des saponines stéroïdiques (Diosgénines) (Raju, 2004).

La (Figure 3) illustre des exemples de saponines à génines stéroidiques.

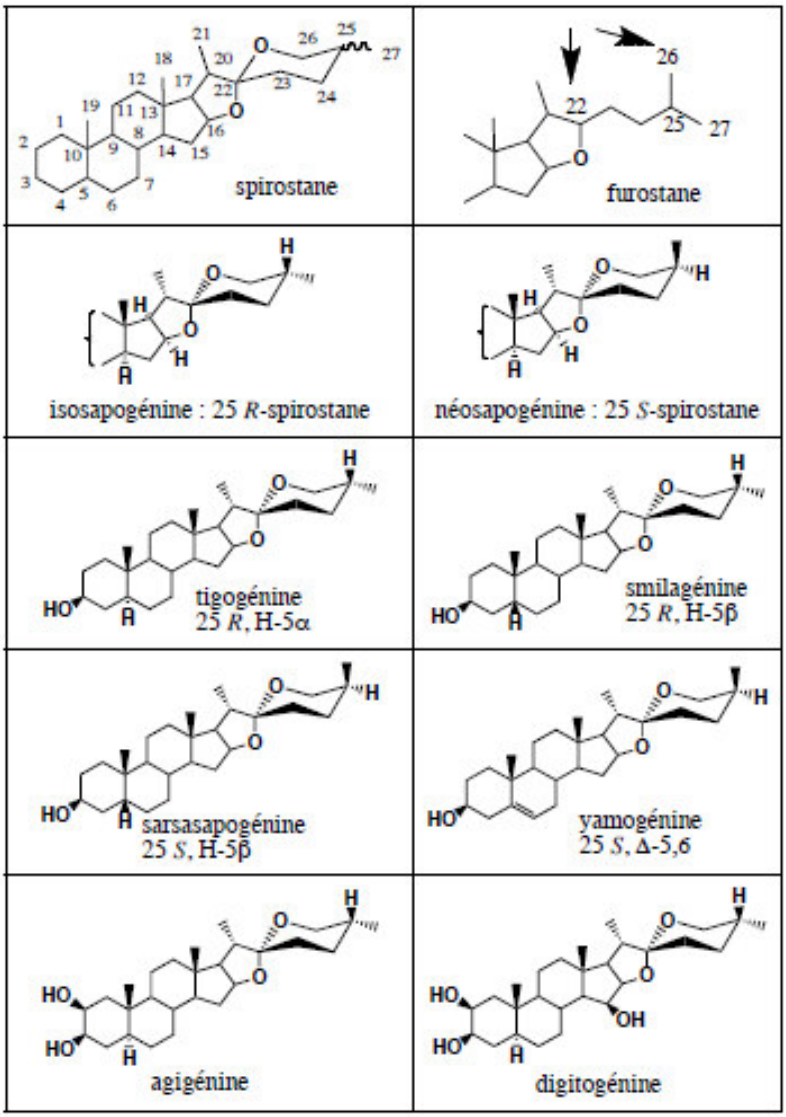


Figure 3: Exemples des saponines à génines stéroidiques (Gaoussou, 2012).

I.4.2. Les saponines à génines triterpéniques

Ces saponines (Figure 4) apparaissent en grande majorité dans les Dicotylédones, par exemple la famille des Polygalaceae (Garai, 2014). Les sapogénines triterpéniques, comme la majorité des triterpénoïdes, sont issues de la cyclisation du (3S)-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène. L'oléanane, l'ursane et le lupane sont les squelettes les plus communs. Plus que 50% des saponines connues peuvent être attribuées à l'oléanane, plus précisément à l'acide oléanolique et à l'hédéragénine (Garai, 2014).

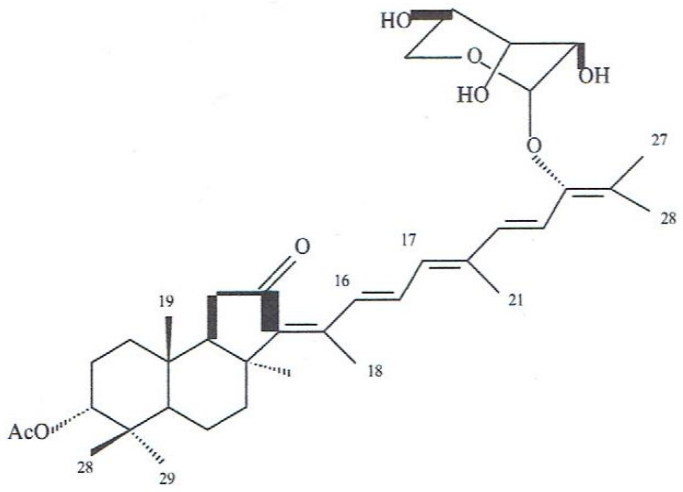


Figure 4: Structure générale des saponines triterpéniques (Garai, 2014).

La (Figure 5) représente quelques exemples de saponines triterpéniques.

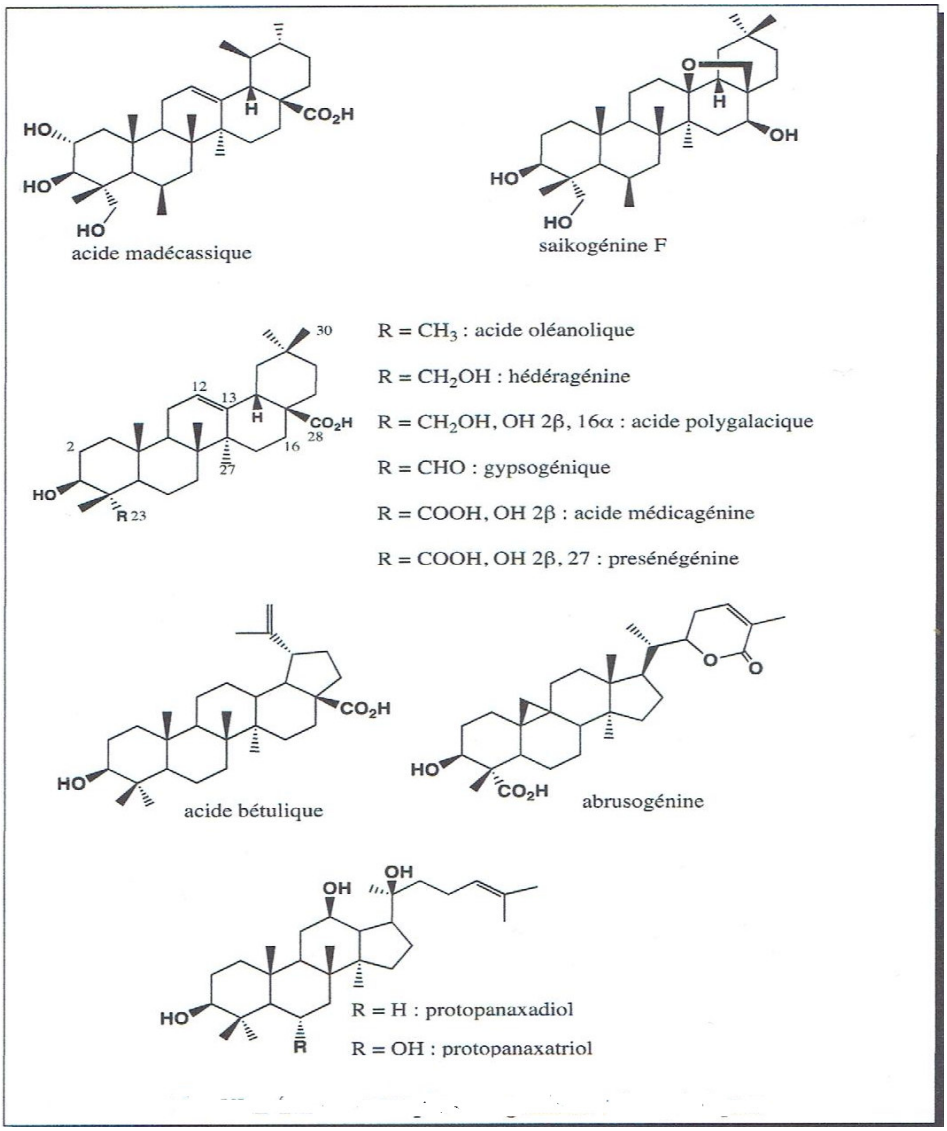


Figure 5: Exemples des saponines à génines triterpéniques (Gaoussou, 2012).

I.4.3. Sucres

Les sucres constituent la partie hydrophile des saponines. Une ou plusieurs chaines osidiques peuvent substituer les génines triterpéniques ou stéroïdiques pour former les saponines. Celles-ci peuvent être constituées d'une à douze unites osidiques en chaine linéaire ou ramifiée. (Perrone *et al.,* 2011).

La (Figure 6) représente quelques exemples des sucres les plus courants au niveau des saponines.

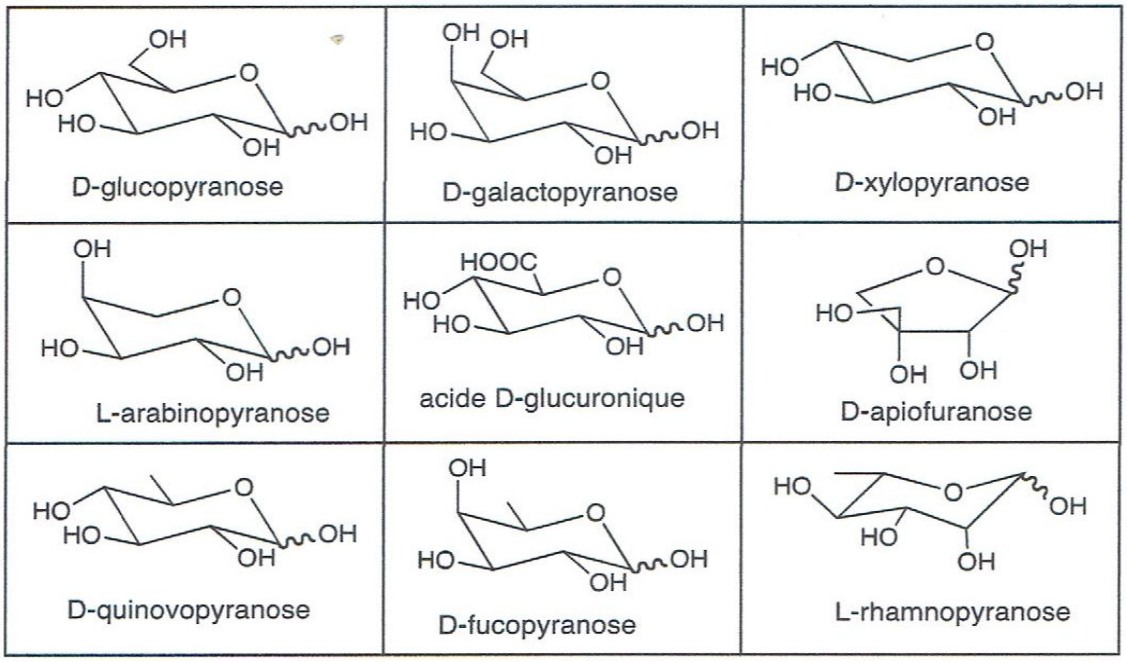


Figure 6: Les différents sucres constitutifs des saponines (Perrone *et al.,* 2011).

I.5. Chromatographie

C'est une méthode qui sépare les constituants d'un mélange par entrainement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide) (Audigie *et al.,* 1982) emprisonnée dans une colonne ou fixé sur un support (Rouessac *et al.,* 2000).

I.5.1. Chromatographie sur couche mince

- **Définition**

C'est la technique la plus répandue et retenue dans la pharmacopée, caractérisée par sa rapidité, sa sensibilité et sa facilité de mettre en œuvre (Herrabielle et Paris, 1980).

En CCM, les composés sont partagés entre deux phases : l'une stationnaire dite adsorbant qui est généralement du gel de silice ou d'alumine (Dobarganes *et al.,* 2002), et l'autre mobile représentée par un mélange de solvants qui entraine les composés par migration. La migration dépend de la polarité des extraits et des solvants utilisés.

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel végétal

Dans notre présent travail, on s'est intéressé à la présence des saponines dans trois extraits différents de *Clematis flammula*. Les feuilles de cette plante (Figure 7A) sont utilisées en infusion ou cataplasme sur le genou pour soigner l'arthrose et les maladies à caractère inflammatoire comme l'ulcère gastrique et la recto-colite. Ces deux derniers font l'objet d'un projet de recherche du laboratoire de Biochimie Appliquée. Les fleurs (Figure 7B) sont plutôt décoratifs.

(A) (B)

Figure 7 : Photographies originales des feuilles (A) et fleurs (B) de *Clematis flammula.*

II.1.2. Classification (Areej, 2007)

Règne : Plantae

Embrancgement : Spermatophyta

Classe : Dicotyledones

Ordre : Ranunculales

Famille : Ranunculaceae

Genre : Clematis

Espèce : *Clematis flammula*.

II.1.3. Les noms vernaculaires

Les noms vernaculaires de cette plante se résument par le suivant :

Francais : Clématite brûlante

Anglais : Fragrant Virgin's-bower

Espagnol : Jazmín de monte (Areej, 2007).

Arabe : ياسمين البر

Berbere : azenzou ,zenzou

II.1.4. Description

Clematis flammula est une plante herbacée grimpante (Boutin et *al.,* 2010). Elle est vigoureuse à feuilles bipennées, caduques (tige aérienne annuelle), ligneuses, légèrement poilues, épaisses de couleur verte, tige cylindrique, avec de faibles côtes ovales à lancéolées; les fleurs sont blanches odorantes. Cette plante est caractérisée par une floraison en période d'été (de juin à août) (Atmani et *al.,* 2011).

II.1.5. Habitat

Clematis flammula est une plante méditerranéenne qui croît en Espagne, en Italie et en Turquie, mais beaucoup plus dans la région Kabyle en Algérie (Atmani et *al.,* 2011).

II.2. Méthode

II.2.1. Récolte

La récolte de *Clematis flammula* a été effectuée dans la forêt d'Azru' n Bechar, commune d'Amizour au mois de mai 2016.

II.2.2. Broyage

Les feuilles de *Clematis flammula* ont été séchées dans un endroit sombre et aéré et ensuite broyées et tamisées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine (60 µm de diamètre).

II.2.3. Extraction

L'extraction des saponines a été entreprise suivant la méthode de Maamria et *al.,* (2014). C'est une extraction sélective qui implique plusieurs solvants. Le schéma de l'extraction est montré dans la (Figure 8) ci-dessous:

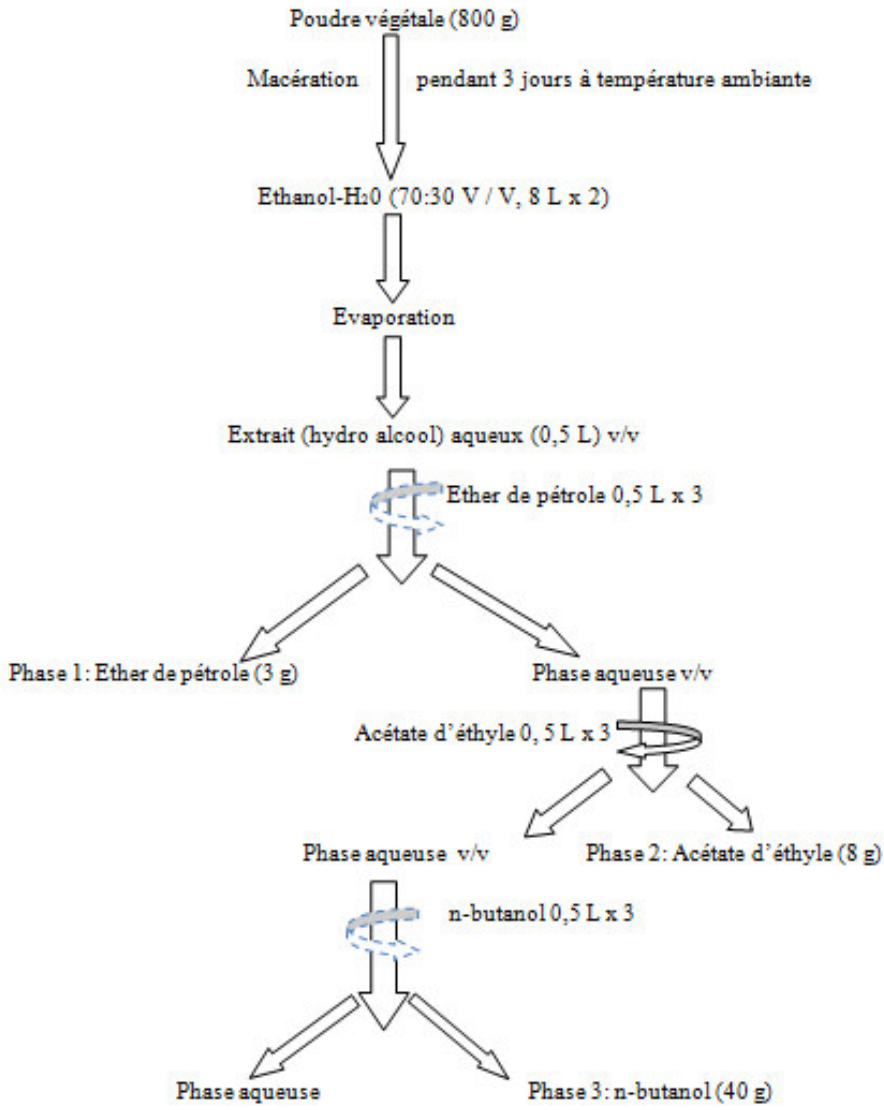


Figure 8: Protocole d'extraction (Maamria *et al.,* 2014).

Le protocole d'extraction nous a permis d'obtenir trois phases. Phase 1: éther de pétrole (3g), phase 2: acétate d'éthyle (8g), phase 3: n-butanol (40g).

II.3. Tests phytochimiques

Plusieurs tests phytochimiques ont été entrepris pour révéler la présence des saponines dans les trois extraits.

II.3.1. Test de Libermann-Burchard

Les trois extraits acétate d'éthyle, éther de pétrole et n-butanol ont été traités avec quelques gouttes d'acide anhydre bouillir et laisser refroidir. Ensuite, de l'acide sulfurique concentré a été ajouté sur les côtés des trois tubes à essai. L'apparition d'un anneau brun à la jonction des deux couches avec une couche supérieure qui devient verte, indique la présence de triterpénoides alors que la formation d'une couleur rouge foncée indique la présence de stéroïdes (Hostettman et Marston, 2005).

II.3.2. Test de formation de mousse

Une solution de 2 mg/ml des trois extraits acétate d'éthyle, éther de pétrole, et n-butanol sont mélangés avec de l'eau dans trois tubes à essai. Après agitation, la formation d'une mousse stable serait une indication de la présence de saponines dans les extraits.

II.3.3. Test d'hémolyse

0,2 ml de solution d'extraits (préparés dans 1% de solution saline normale) ont été ajoutés à 0,2 ml de sang à 10% dans une solution saline normale. Après agitation, une centrifugation a été effectuée. L'apparition d'un surnageant rouge comparé avec le tube témoin contenant 0,2 ml de sang mélangé avec une solution saline révèlerait l'hémolyse du sang par des saponines.

II.4. Dosage des saponines totaux :

La détermination quantitative des saponines dans les extraits de *Clematis flammula* a été réalisé suivant la méthode de Ncube *et al.* (2011) illustrée dans la (Figure 9) ci-dessous:

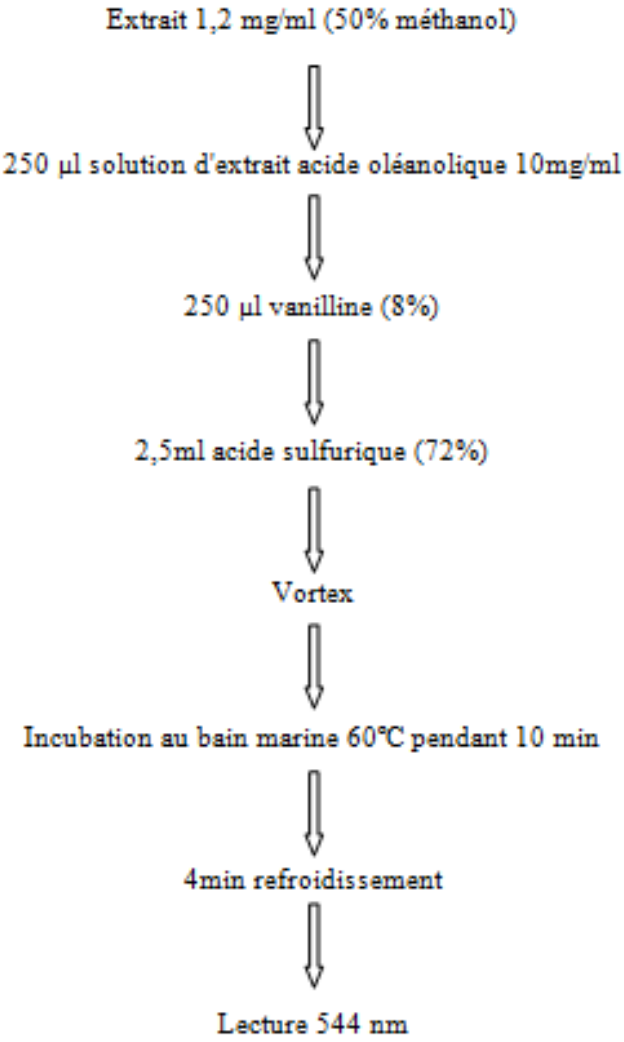


Figure 9: Protocole de dosage des saponines totaux (Ncube et *al.,* 2011).

Une courbe d'étalonnage utilisant l'acide oléanolique (10-100µg) a permis le calcul des concentrations en saponines des trois extraits en µg équivalents acide oléanolique/mg d'extrait (µg eq AO/mg extrait).

II.5. Chromatographie sur couche mince (CCM)

II.5.1. Principe

Un petit volume (5-15µl) de l'échantillon à analyser est déposé à environ 1 cm du bord inférieur de la plaque (Rouessac, 1995), qui est ensuite immergée dans une cuve chromatographique contenant un mélange de solvants. Celui-ci monte par capillarité le long de la plaque et entraine avec lui les composants de l'extrait à analyser à des vitesses différentes suivant leur solubilité ce qui permet leur séparation (Mounia, 2010). Cette technique a été réalisée dans le but de caractériser les composés phénoliques et les saponines des trois extraits de *Clematis flammula.*

II.5.2. Conditions chromatographiques

Pour la migration des composés, deux systèmes de solvants ont été préparés**.**

II.5.2.1. Systèmes de solvant

- système1: chloroforme: méthanol: acide acétique: eau (100: 15: 0,5: 0,3).
- système2: acétate d'éthyle: acide acétique: acide formique: eau (100 :11 :11 : 26).

II.5.2.2. Dépôt de l'échantillon

Les trois extraits éther de pétrole, acétate d'éthyle, et n-butanol ont été préparés à 10 mg/ml dans du méthanol. Les extraits ont été déposés (4µl) sur la plaque en plus des standards qui sont la diosgénine (saponine stéroïdien) et l'acide oléanolique (saponine triterpéniques), ces derniers préparés à 5 mg/ml dans du méthanol.

II.5.3. Développement des plaques

La plaque est placée verticalement dans une cuve contenant 100 ml de système solvant de façon à ce qu'elle trempe sur une hauteur de 0,5 à 1 cm environ. On laisse alors le solvant monter le long de la plaque par capillarité. Au cours de son ascension, le solvant va entrainer les différents constituants du mélange déposés en bas de la plaque, les constituants les moins retenus par l'adsorbant étant entrainés plus facilement (Gaoussou, 2012). La migration dépend de la polarité des extraits et des solvants utilisés (Rouessac *et al.,* 2000). A la fin de la migration, la plaque est séchée.

II.5.3.1. Révélation par lampe UV à 312 nm

Les plaques ont été observées sous lampe UV à 312 nm. Les saponines ont une fluorescence rouge à 312 nm (Hostettman et Marston, 2005).

II.5.3.2. Révélation par l'anisaldehyde

L'anisaldehyde réagit avec les saponines pour donner une couleur jaune pour les saponines stéroïdes (Diosgénine) et violet ou bleu violet signifie la présence des saponines triterpénoides (Acide oléanolique). L'anisaldéhyde est préparé comme suit:

- Solution A: 0,25ml anisaldehyde.
- Solution B: Preparation de 50ml alcool (90% methanol, 5% acide sulfirique, 5% acide acétique).

Mélange Solution A - Solution B (0,25ml/50ml).

II.5.3.3. Rapport frontale

Le rapport frontal ou rétention frontale (Rf) est caractéristique d'un produit dans un éluant donné et pour une phase stationnaire donnée (Mounia, 2010).

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

Où H représente la hauteur parcourue par le front du solvant entre la ligne de base et le front du solvant et h la hauteur parcourue par un composé entre la ligne de base et sa position au moment de la révélation. Deux corps présentant le même rapport frontal R_f sur la même plaque sont identiques ou similaires.

En comparant les rapports frontaux des « spots » de l'échantillon étudié aux rapports frontaux de ceux des molécules de référence (diosgenine et acide oleanolique), il est possible de déterminer la présence de saponines dans l'extrait.

II.6. Dosage des fractions chromatographiques des saponines

Les « spots » de saponine sur les plaques de CCM révélées précédemment par l'anisaldehyde et observées sous la lumière UV (312 nm) sont grattées, dissous dans du méthanol (400 µl), centrifugées pour se débarrasser de la silice (3000 rpm/min), puis dosées suivant la méthode de Ncube *et al.* (2011), décrite ci-dessus (Figure 9).

III.1. Résultats et discussion

L'objectif de ce travail est la détection, caractérisation par CCM et dosage, des saponines dans trois extraits différents de *C. flammula* : acétate d'éthyle (AE), éther de pétrole (EP), et n-butanol (NB). La détection des saponines à été d'abord entreprise par des tests phytochimiques.

III.2. Tests phytochimiques

L'objectif des trois tests phytochimiques, le test de Libermann-Burchard, le test de formation de mousse et le test d'hémolyse est la détection des saponines dans trois extraits différents de *C. flammula* : acétate d'éthyle, éther de pétrole, et n-butanol.

III.2.1. Test de Libermann-Burchard

La figure10: (A, B, C.) ci-dessous montre les résultats du test de Libermann-Burchard.

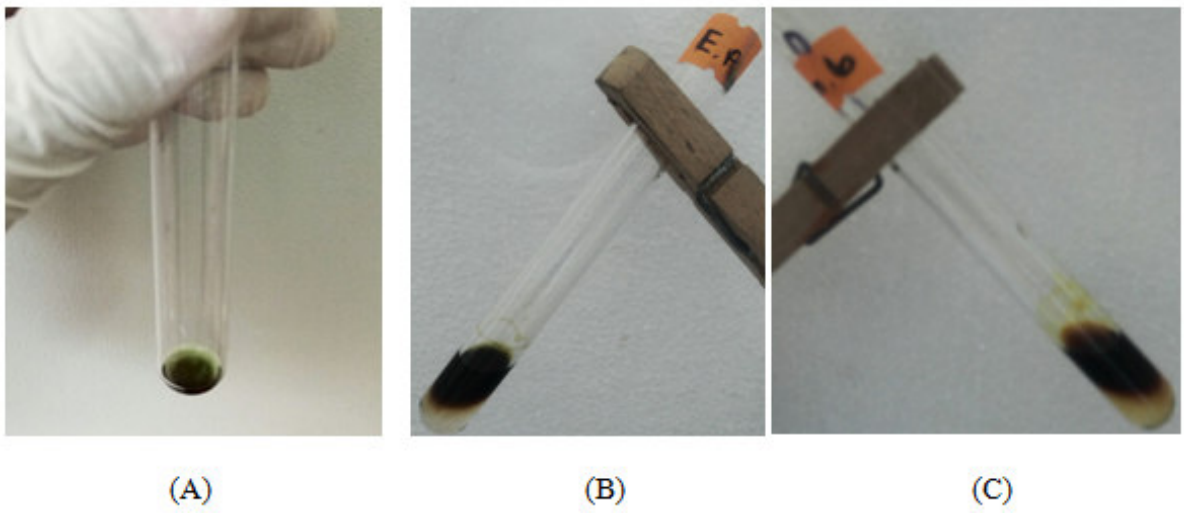


Figure 10: Résultats du test de Libermann-Burchard des trois extraits. (A): Ether de pétrole; (B): Acétate d'éthyle et (C): n-butanol.

Les résultats du test de Libermann-Burchard dans la figure10 montrent la présence d'un anneau brun qui est couvert par une couche supérieure de couleur verte dans les trois extraits de *C. flammula* éther de pétrole (10A), acétate d'éthyle (10B) et n-butanol (10C),ce qui indique la présence de saponines triterpenoiques dans les trois extraits (Hostettman et Marston, 2005). D'après ces mêmes auteurs (Hostettman et Marston, 2005) les saponines stéroidaux doivent donner une couleur rose à pourpre avec ce test.

III.2.2. Test de formation de mousse

Les résultats du test de formation de mousse de trois extraits de *C. flammula* AE, EP, NB sont montrés dans la figure 11: (A, B et C).

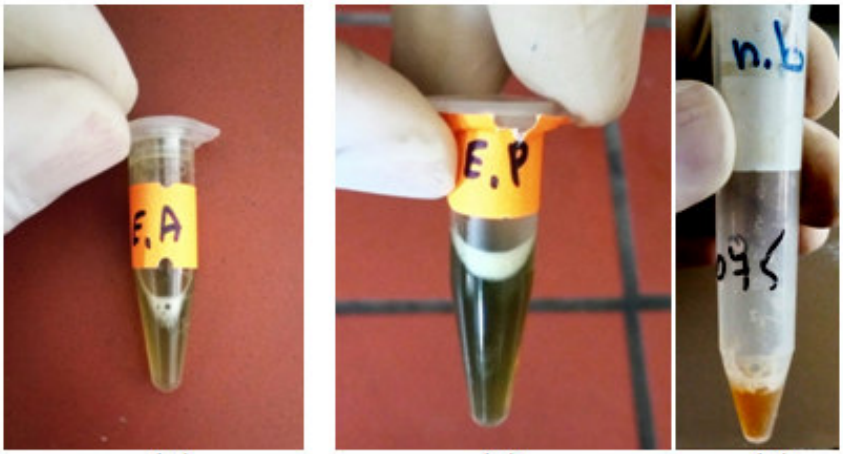


Figure 11: Résultats du test de formation de mousse des trois extraits. (A): Acétate d'éthyle ; (B): Ether de pétrole; (C): n-butanol.

La formation de mousse stable dans les trois extraits révèle la présence de saponines qui sont caractérisés par leurs propriétés, tensioactives en se dissolvant dans l'eau (Mayank *et al.,* 2011).

III.2.3. Résultats et discussion du test d'hémolyse

La figure 12: (A, B, C, D) ci-dessous montre les résultats du test d'hémolyse.

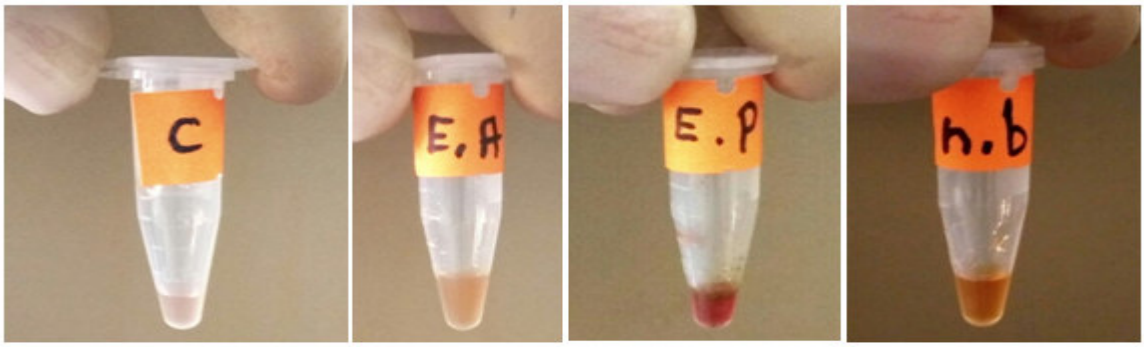


Figure 12: Résultats du test d'hémolyse (A): Tube témoin (C: control) contenant 0,2 ml de sang à 10% dans une solution saline normale diluée avec 0,2 ml de solution saline normale. (B): Acétate d'éthyle ; (C): Ether de pétrole; (D): n-butanol.

Les résultats du test d'hémolyse (Figure 12), pour l'acétate d'éthyle (B), l'éther de pétrole (C), et le n-butanol (D), permettent de noter la couleur rouge du surnageant comparé au témoin (A) surtout dans le cas du sang de souris mélangé avec l'extrait d'éther de pétrole où la couleur rouge foncée révèle une hémolyse très forte des hématies du sang. Ceci suggère une concentration plus élevée des saponines dans cet extrait. En effet, en contact avec les hématies, les saponines se combinent avec le cholestérol et les autres stérols de la membrane érythrocytaire ce qui entraine une modification de la perméabilité membranaire d'où formation de pores et libération d'hémoglobine dans le milieu externe (Tabassi *et al.,* 2006).

III.3. Résultats et discussion de la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique rapide non coûteuse, mais plutôt qualitative pour caractériser les métabolites secondaires des plantes. Elle est basée sur le partage des composés de trois extraits AE, EP, NB entre l'adsorbant solide fixe (gel de silice) et la phase mobile (système de solvant). Chacun des composés des trois extraits est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par le système de solvant. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des composés de trois extraits AE, EP, NB à analyser, ce qui permet leur séparation (Rouessac *et al.,* 2000).
Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre le système de solvant et le mélange de composés de trois extraits de *C. flammula*. Premièrement, la solubilité, on doit être en mesure de dissoudre les composés de trois extraits dans les systèmes de solvant pour que la migration se fasse. Deuxièmement, la polarité du système de solvant va déterminer à quelle vitesse les constituants des extraits migrent (Lapronik *et al.,* 2005).

Les trois extraits : EP, AE, et NB et les deux standards la diosgénine et l'acide oléanolique ont subi une chromatographie sur couche mince avec deux systèmes différents, dans le but de déterminer le meilleur système pour la séparation des saponines de ces extraits.

- Système1: chloroforme: méthanol: acide acétique: eau (100: 15: 0,5: 0,3).
- Système2: acétate d'éthyle: acide acétique: acide formique: eau (100 :11 :11 : 26).

La chromatographie sur couche mince aide à mieux caractériser les saponines des trois extraits de *Clematis flammula*, en comparant leurs différentes caractéristiques (migration (Rf) et couleur sous UV et par révélation avec l'anisaldéhyde avec les différents standards : l'acide oléanolique représente les saponines triterpeniques, alors que la diosgénine représente les saponines stéroïdiques.

III.3.1. Résultats et discussion de la plaque 1

III.3.1.1. Révélation avec l'anis aldéhyde

- Système1: chloroforme: méthanol: acide acétique: eau (100: 15: 0,5: 0,3).
- Temps de migration: 2h 15min.

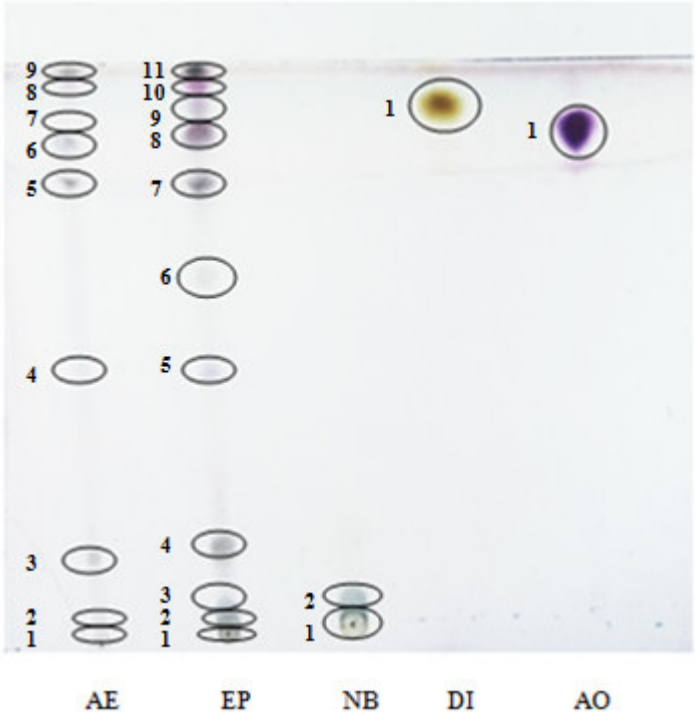


Figure 13: Plaque 1: Chromatographie sur couche mince de trois extraits de *Clematis flammula* dans le système1: chloroforme: méthanol: acide acétique: eau (100: 15: 0,5: 0,3). AE: acétate d'éthyle EP: éther de pétrole et NB: n-butanol, et les standards suivants: DI: diosgénine et AO: acide oléanolique.

Les Rf et couleurs des composés de la plaque 1 après révélation par l'anisaldéhyde sont représentés dans le tableau I.

Tableau I: Rf et couleurs des composés de la plaque 1 après révélation par l'anisaldéhyde.

Tâches	Rf AE	Rf EP	Rf NB	Rf DI	Rf AO
1	0,01	0,01	0,03	0,90	0,85
couleur	Violet	Bleu violet	Vert	Jaune	Bleu violet
2	0,05	0,05	0,07	-	-
couleur	Violet	violet	-	-	-
3	0,14	0,7	-	-	-
couleur	Violet	Violet	-	-	-
4	0,46	0,85	-	-	-
couleur	Violet	Bleu violet	-	-	-
5	0,78	0,46	-	-	-
couleur	Bleu violet	Violet	-	-	-
6	0,85	0,53	-	-	-
couleur	Bleu violet	Bleu violet	-	-	-
7	0,89	0,78	-	-	-
couleur	Bleu violet	Bleu violet	-	-	-
8	0,92	0,85		-	-
couleur	Violet	Bleu violet	-	-	-
9	1	0,89	-	-	-
couleur	Violet	Bleu violet	-	-	-
10	-	0,92	-	-	-
couleur	-	Violet	-	-	-
11	-	0,89	-	-	-
couleur	-	Bleu violet	-	-	-

Le système 1 est un système couramment utilisé pour séparer les saponines d'extraits de plante (Lapronik *et al.,* 2005).

En effet, nos résultats montrent que ce système (système 1) est adéquat pour la séparation des saponines des extraits de l'acétate d'éthyle et l'éther de pétrole pendant un temps de migration proche de 2h et 15 min. En fait, les deux extraits sont séparés en 9 tâches pour l'AE et 11 tâches pour l'EP (Tableau I). Par contre, la séparation a été mauvaise pour les composés du n-butanol où on a observé seulement deux tâches (Tableau I).

Ces résultats confirment que les composés des deux extraits AE et EP sont plus solubles dans le système 1 que ceux du n-butanol, et que la polarité du système 1 est adéquate pour la séparation des saponines de ces deux extraits, mais pas de ceux du n-butanol.

Les deux extraits AE et EP présentent presque le même profil chromatographique indiquant des composés en commun (Figure 13). (La première tache d'AE et d'EP. La deuxième tache d'AE et d'EP. La quatrième tache d'AE et la cinquième tache d'EP. La sixième tache d'AE et la huitième tache d'EP. La septième tache d'AE et la neuvième tache d'EP) (Tableau I).

De plus la sixième tache d'AE et la huitième tache d'EP présentent la même couleur et le même Rf qui est aussi voisin du Rf de standard pour les saponines triterpéniques, l'acide olianolique (Tableau I). Ce qui suggère que leur structure est similaire à ce composé de référence (Figure 5: Acide oléanolique). Des études plus poussées doivent être entreprises pour le confirmer.

Par contre, aucun composé des trois extraits ne correspond au Rf et la couleur de la diosgénine (Tableau I), (Figure 2: Diosgénine), ce qui veut dire que les saponines des trois extraits sont plutôt triterpéniques.

III.3.1.2. Révélation par l'UV (312 nm)

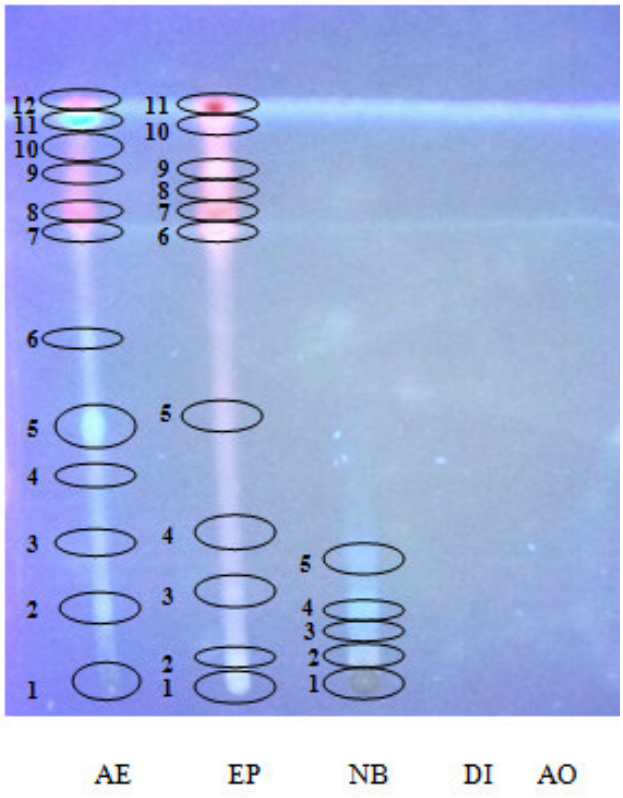


Figure 14: Plaque 1: Chromatographie sur couche mince de trois extraits de *Clematis flammula*, après révélation par lampe UV (312nm) dans le système1: chloroforme: méthanol: acide acétique: eau (100: 15: 0,5: 0,3). AE: acétate d'éthyle EP: éther de pétrole et NB: n-butanol, et les standards suivants: DI: diosgénine et AO: acide oléanolique.

Tableau II: Rf et fluorescences des composés de la plaque 1 après révélation par lampe UV (312nm).

Tâches	Rf AE	Rf EP	Rf NB	Rf DI	Rf AO
1	0,01	0,01	0,03	-	-
Fluorescence	Bleu	Blanche	Grise	-	-
2	0,14	0,05	0,07	-	-
Fluorescence	Blanche	Blanche	Bleu	-	-
3	0,21	0,17	0,07	-	-
Fluorescence	Bleu	Blanche	Bleu	-	-
4	0,46	0,22	0,19	-	-
Fluorescence	Bleu	Blanche	Bleu	-	-
5	0,5	0,52	0,45	-	-
Fluorescence	Blanche	Violette	Bleu	-	-
6	0,57	0,78	-	-	-
Fluorescence	Bleu	Orange	-	-	-
7	0,78	0,85	-	-	-
Fluorescence	Orange	Rouge	-	-	-
8	0,85	0,89		-	-
Fluorescence	Rouge	Rouge	-	-	-
9	0,90	0,90	-	-	-
Fluorescence	Rouge	Rouge	-	-	-
10	0,95	0,97	-	-	-
Fluorescence	Violette	Orange	-	-	-
11	0,97	1	-	-	-
Fluorescence	Verte	Rouge	-	-	-
12	1	-	-	-	-
Fluorescence	Rouge	-	-	-	-

Le profil chromatographique de la plaque 1 sous UV (Figure 14) montre que les deux extraits AE et EP sont séparés en 12 et 11 fractions respectivement avec des composés similaires (de même Rf et fluorescence) (Tableau II), mais avec une plus grande intensité dans l'extrait AE par rapport à l'extrait EP notamment pour la fraction 5 de l'extrait AE qui montre une fluorescence blanche, caractéristique des coumarines (Hostettman et Marston, 2005).

Aussi on a noté l'apparition d'une fraction 11 de fluorescence verte qui n'existe pas dans le profil chromatographique de l'extrait EP. Cette fluorescence a été exhibée par des saponines (les betaxanthines) de Quinoa (Escribano *et al.,* 2017).

Les fractions 8 et 7 pour l'AE et l'EP respectivement, de fluorescence rouge en général correspondent aux saponines (qui sont de même Rf que l'acide oléanolique) sauf pour la dernière fraction qui correspond en général à la chlorophylle.

Les deux standards acide oleanolique et diosgénine n'ont montré aucune fluorescence ce qui est en accord avec la littérature (Hostettman et Marston, 2005). Par contre, les composés de même Rf ont donné une fluorescence rouge ce qui démontre que leur structure n'est pas identique à celle de l'acide oleanolique.

L'extrait NB a révélé plus de quatre fractions (Tableau II) en contraste avec la révélation par l'anis aldéhyde qui n'a révélé que deux. La fluorescence est bleu ce qui correspond plutôt à des coumarines qu'à des saponines.

III.3.2. Résultats et discussion de la plaque 2

Les résultats de révélation par l'anis aldéhyde de la plaque 2 sont montrés dans la figure 15.

- Système2: acétate d'éthyle: acide acétique: acide formique: eau (100 :11 :11 : 26).
- Temps de migration: 2h 35 min.
- Révélation: Anisaldehyde

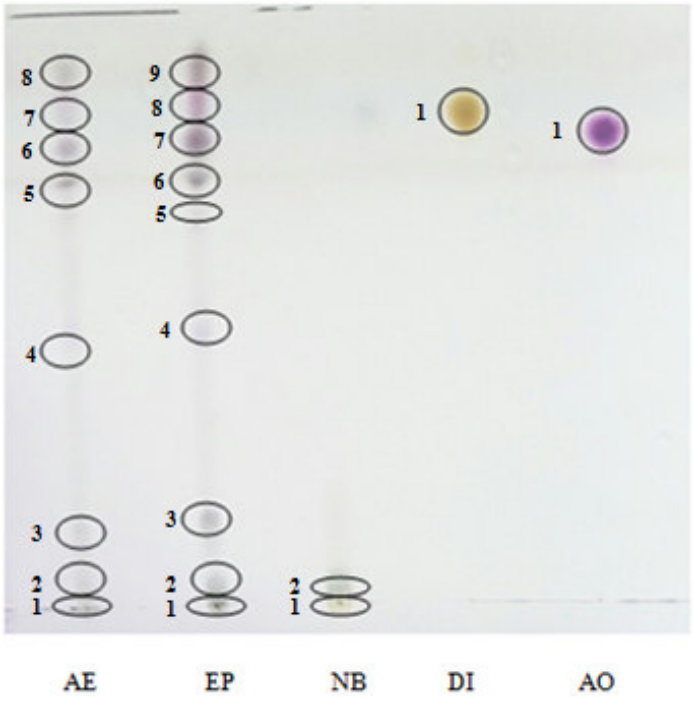


Figure15: Plaque 2: Chromatographie sur couche mince de trois extraits de *Clematis flammula* dans le système2: Acétate d'éthyle: acide acétique: acide formique: eau (100 :11 :11 : 26). EA: acétate d'éthyl, EP: éther de pétrole et NB: n-butanol, et les standards suivants: DI: diosgénine et AO: acide oléanolique.

Les Rf et couleurs des composés de la plaque 2 ont été calculés et sont représentés dans le (Tableau III).

Tableau III: Rf et couleurs des composés de la plaque 2 après révélation par l'anisaldéhyde.

Tâches	AE	EP	NB	DI	AO
1	0,01	0,01	0,01	0,90	0,85
couleur	Violet	Violet	Vert	Jaune	Bleu violet
2	0,03	0,03	0,02	-	-
couleur	Violet	Violet	Vert	-	-
3	0,13	0,14	-	-	-
couleur	Violet	Violet	-	-	-
4	0,46	0,47	-	-	-
couleur	Violet	Violet	-	-	-
5	0,78	0,71	-	-	-
couleur	Violet	Violet	-	-	-
6	0,85	0,87	-	-	-
couleur	Bleu violet	Bleu violet	-	-	-
7	0,89	0,85	-	-	-
couleur	Violet	Bleu violet	-	-	-
8	0,92	0,89	-	-	-
couleur	Violet	Violet	-	-	-
9	-	0,92	-	-	-
couleur	-	Violet	-	-	-

Les deux extraits AE et EP présentent presque le même profil chromatographique indiquant des composés en commun (Figure 15). (Tache 1: AE, EP. Tache2: AE et d'EP. Tache 6: AE et tache 7 d'EP. Tache 7 d'AE et tache 8 d'EP) (Tableau III). Le n-butanol n'a pas migré, ce qui veut peut-être dire que le système chromatographique (système 2) n'est pas adéquat pour la séparation des composés de cet extrait.

De plus, la sixième tâche d'AE et la septième tâche d'EP présentent la même couleur et le même Rf, qui est aussi voisin du Rf du standard pour les saponines triterpéniques, l'acide olianolique (Tableau III). Par contre, aucun composé des trois extraits ne correspond au Rf et la couleur de la diosgénine (Tableau III), ce qui veut dire que les saponines des trois extraits sont plutôt triterpéniques.

Le gel de silice est polaire (Dobarganes *et al.,* 2002), et a par conséquence une plus grande affinité pour les composés polaires: un composé peu polaire est peu adsorbé. Un composé polaire est très adsorbé. Les molécules chargées ne migreront habituellement pas sur gel de silice, elles sont trop polaires. Donc le choix du système de solvant qui fait migrer les composés est donc très important. Notre intérêt pour la présence des saponines dans les trois extraits de *C. flammula* a fait qu'on a choisi deux systèmes appropriés pour ces métabolites secondaires.

Seulement, les résultats du système 2 (Figure 15) montrent que ce système est moins adéquat pour la séparation des trois extraits de *Clematis flammula* par rapport au système 1 (Figure 13), lorsqu'on compare entre les résultats chromatographiques des plaques CCM et le nombre des composés séparés (plaque 1: Figure 13. Tableau I. Plaque 2: Figure 15. Tableau III).

De même que pour le système 1, ce système n'a pas été approprié pour la séparation des composés de l'extrait NB ce qui veut dire que les constituants de cet extrait ne sont pas soluble dans les solvants utilisés.

La révélation sous UV du système 2 n'a donné aucun résultat.

III.4. Dosage des saponines dans les extraits AE, EP et NB de *C. flammula*

Le calcul des concentrations en µg équivalents (eq) acide oleanolique (AO) a été fait sur la base d'une courbe d'étalonnage (10-100µg).

Les résultats montrent une différence significative dans la teneur des trois extraits avec la concentration la plus élevée (631 µg eq AO/ mg d'extrait) pour l'éther de pétrole suivi par l'acétate d'éthyle (255,7 µg eq AO/ mg d'extrait) et le n-butanol (68,9µg eq AO/mg d'extrait).

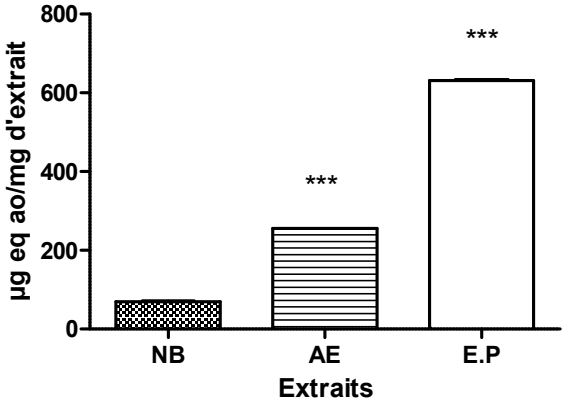


Figure 16: Concentrations des trois extraits (EP: Ether de pétrole; AE: Acétate d'éthyle et NB: n-butanol) en équivalents µg acide oléanolique /mg d'extrait (eq µg AO/mg extrait). Le test Anova montre une différence très significative ($p<0,001$) entre les extraits acétate d'éthyle et éther de pétrole comparés avec l'extrait du n-butanol.

Ces résultats montrent que *C. flammula* est riche en saponines triterpenoides. Aussi, d'autres plantes comme le quinoa ont montré une dose de saponines (250 µg/mg eq AO/mg extrait) (Escribano *et al.,* 2017) équivalente à l'extrait acétate d'éthyle, ce qui veut dire que l'extrait éther de pétrole de *C. flammula* est plus riche en saponines que le quinoa.

III.5. Résultats et discussion du dosage des fractions chromatographiques

Dans le but de quantifier les fractions chromatographiques (fraction 6, fraction 8) des deux extraits de *C. flammula* AE, EP respectivement, qui ont exhibées la même couleur (bleu violet) et Rf que l'acide oléanolique sous anis aldéhyde et dans le système 1 (Figure 13). Les spots correspondants ont été grattés, centrifugés pour se débarrasser de la silice et le surnageant quantifié pour la présence de saponines totaux. Les résultats de dosage des fractions chromatographiques de saponines sont représentés dans (Tableau IV).

Le calcul des concentrations en µg équivalents (eq) acide oleanolique (AO) a été fait sur la base d'une courbe d'étalonnage (10-100µg).

Tableau IV : Résultats de dosage des fractions chromatographiques de saponines pour deux extraits l'AE et l'EP de *C. flammula.*

Fractions	Concentrations (µg eq AO/ mg d'extrait)	Ecart-type
Acetate d'éthyle	0,120.	0,014
Ether de pétrole	0,234	0,014

Ces résultats montrent et confirment la présence des saponines dans les fractions chromatographiques (fraction 6, fraction 8) des deux extraits AE et EP, respectivement dont le Rf et couleurs correspondent à l'acide oléanolique (Figure 13). La concentration la plus élevée (0,234 µg eq AO/ mg d'extrait) a été trouvée pour la fraction 8 de l'éther de pétrole par rapport à la même fraction de celle de l'acétate d'éthyle (0,120µg eq AO/ mg d'extrait). Ce résultat est en accord la plus grande concentration de saponines dans l'EP par rapport à l'AE.

Conclusion et perspectives

Durant la dernière décénnie, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie à suscité un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés, lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

Clematis flammula est une plante médicinale utilisée dans le Nord de l'Algérie (kabylie) depuis longtemps pour le traitement des maladies à caractère inflammatoire.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la détection (tests phytochimiques) dosage et caractérisation par CCM des saponines de trois extraits de *C. flammula*: Acétate d'éthyle, éther de pétrole, et n-butanol.

Les résultats de trois tests phytochimiques: Test de Liberman-Buchard, l'activité hémolytique et les propriétés moussantes des saponines ont révélé la présence de saponines dans les trois extraits de cette plante. La caractérisation de ces saponines par CCM à permis de détecter des saponines triterpeniques plutôt que des saponines stéroïdaux. De plus, la composition en metabolites secondaires des deux extraits acétate d'éthyle et éther de pétrole est très similaire.

La quantification des saponines totaux a montré la richesse des trois extraits en saponines, avec le taux le plus élevé dans l'extrait éther de pétrole (631 µg eq AO / mg d'extrait) suivi par l'acétate d'éthyle (255,7 µg eq AO / mg d'extrait) et n-butanol (68,9 µg eq AO / mg d'extrait).

La richesse des extraits de feuilles de cette plante en saponines est probablement responsable des activités biologiques (anti-inflammatoires et anti ulcéreuses) des extraits de feuilles de cette plante. L'isolement et identification des saponines par HPLC-MS et RMN permettrait d'identifier des composés responsables de nouvelles molécules intéressantes et qui peuvent être exploitées dans l'industrie pharmaceutique.

REFFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amirshahrokhi K., et Khalili A.Z. (2015). The effect of thalidomide on ethanol-induced gastric mucosal damage in mice: involvement of inflammatory cytokines and nitric oxide. *Chemico-Biological Interactions,* 225: 63-69.

Anandjiwala S., Kalola J., et Rajani M. (2006). Quantification of Eugenol, Luteolin, Ursolic Acid, and Oleanolic Acid in Black (*Krishna Tulasi*) and Green (*Sri Tulasi*) Varieties of *Ocimumsanctum* Linn. Using High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of AOAC International,* 89 (6): 1467-1474.

Areej A. (2007). *Phytochemical and biological studies of some Clematis species growing in Saudi Arabia.* Thèse de doctorat Department of Pharmacognosy at the College of Pharmacy. King Saud University*,* P. *7-20.*

Atmani D., Begoña R-L, M., Ruiz-Sanz J.I., Lizcano L., Bakkali F., et Atmani D. (2011). Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4: 589-598.

Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N. et Atmani D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*,112: 303-309.

Audigie Cl., Dupont G., et Zonszam F. (1982). *Principe des méthodes d'analyse biochimique.* Paris: Tome 2. 60-66- 143 P.

Bahorun T. (1997). Substances naturelles actives. La flore Mauricienne : une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritias. P 83-94.

Boutin V., Fogelgesang J. F., Beaux J. F. et Ribola F. (2010). *Atlas de biologie végétale.* Dunod. Paris. p 128.

Carotenuto A., Fattorusso E., Lanzotti V., and Magno S. (1999). Spirostanol saponins of *Allium porrum* L. *Phytochemistry,* 51(8): 1077–1082.

Chabrier J. (2010). *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie*. Thèse doctorat en Pharmacie, Nancy 1 Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré, P. 7-22-25-32-33.

Chan K., Zhao M., Che C., and Mak E. (2008). Cytotoxic acylated triterpene saponins from the husks of *Xanthoceras sorbifolia*. *Journal of Natural Products*, 71(7): 1247–1250.

Chawla R., Kumar S. et Sarma A. (2012). The genus Clematis (*Ranunculaceae*): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 143: 116-150.

Chen H., Wang G., Wang N., Yang M., Wang Z., Wang X., and Yao X. (2007). New furostanol saponins from the bulbs of *Allium macrostemon* Bunge and their cytotoxic activity. *Pharmazie*, 62(7): 544–548.

Cordell G. A., Lyon R. L., Fong H. H., Benoit P. S., and Farnsworth N. R. (1977). Biological and phytochemical investigations of Dianthus barbatus cv. "China Doll" (*Caryophyllaceae*). *Lloydia*, 40(4): 361–363.

Dobarganes M. C., Velasco J., et Dieffenbacher A. (2002). Determination of polar compounds. Polymerized and oxidized. Tricylglycerols and diacyl glycerols in oils and fats. *Pure Applied Chemistry* 72(8): 1563-1575.

Escribano J., Cabanes J., Atiénzar M., Tremolada M., Pando L., Carmona F., and Herrero F. (2017). Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differentlycolored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. *Food Chemistry,* 234: 285-294.

Flora P. (2013). *Les triterpénoïdes chez la vigne : quantifications, voies de biosynthèse et intérêt pour la lutte contre des bioagresseurs.* Thèse de Doctorat. Université de Haute Alsace., Sciences de la vie, Université de Haute Alsace, Ecole doctorale Jean-Henry Lambert – ED 494, P.119-120-123.

Fu H., Koike K., Li W., Nikaido T., Lin W., and Guo D. (2005). Silenorubicosides A-D, triterpenoid saponins from *Silene rubicunda*. *Journal Natural Products*, 68(5):754–758.

Gaoussou T. (2012). Isolement et caractérisation des saponosides de plantes de la famille des Alliaceae, caryophyllaceae et Polygalaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales. Thèse de doctorat Département de Pharmacognosie-Chimie des substances naturelles. Université de Bourgogne Ecole Doctorale E2S, P. 20- 21- 22- 23-54-55-236-237.

Garai S. (2014). Triterpenoid Saponins. *Natural Products Chemistry & Research,* 148(2): 5-6-7-8-9-10.

Hartmann T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68, 2831–2846.

Herrabielle M., et Paris M. (1980). *Abrégé de matière médicinale pharmacognosie*, édition Masson. 14-16.

Hostettman K. et Marston A. (2005). *Chemistry and pharmacology of naturalproducts*. Cambridge. 127 P.

Jabrane A., Jannet H. B., Miyamoto T., Mirjolet J., Duchamp O., Harzallah-Skhiri F., and Lacaille-Dubois M. (2011). Spirostane and cholestane glycosides from the bulbs of *Allium nigrum* L. *Food Chem*., 125(2): 447-455.

Krief S. (2003). *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal*. Thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle, p. 32.

Lakshmi Srinivas T., Mohana Lakshmi S., Neelufar Shama S., Koteswara Reddy G. et Prasanna K.R. (2013). Medicinal plants as anti-ulcer agents. *Journal Pharmacognosy and Phytochemistry,* 2: 91-97.

Lapronik, B., Prosek, M., et Wondra, A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal Food Engineering.* 71: 214-222.

Luo G., Liu J., and Kong Y. (2008). New pentacyclic triterpenes from Gypsophila and their biological evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors. *Chemical Biodiversity*, 5(5): 751–757.

Maamria L., Haba H., Lavaud C., Harakat D. and Benkhaled M. (2014). An isoflavane and saponins from *Astragalus depressus* L. *Journal Serbian Chemical Society* 4: 137-142.

Mayank T., Matthias F., Hendrik F., and Alexander W. (2011). Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties *Botanics targets and therapy*. 112 (4): 21-22-24-25.

Mounia T. (2010). *Application des techniques d'analyse multiélémentaires pour l'évaluation des teneurs en métaux lourds dans les eaux, les sols et les sédiments de la région de Meknès.* Thèse de doctorat Département Physique de la Matière et du Rayonnement, Faculté des Sciences de Meknès, Université Moulay Ismaïl, P. 7-22-25-32-33.

Ncube B., Ngunge V., Finnie J., and Van Staden J. (2011). A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micro propagated Tulbaghia violacea Harv. *Plants*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112 (4): 775-780.

Nwafor P. A. and Bassey A. I. L. (2007). Evaluation of anti-diarrhoeal and anti-ulcerogenic potential of ethanol extract of *Carpolobia lutea* leaves in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3): 619–624.

OMS. (2010). L'infection à *Helico bacterpylori* chez 755 patients présentant des symptômes digestifs**:** Institut Pasteur du Maroc. Journal of Eastern Mediaterranean Health (16), 1998-2007.

Perrone G., Stea G., Epifani F., Varga J., Frisvad JC., *et al*. (2011). *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. Fungal Biology, 115: 1138–1150.

Raju J., Jagan M., Patlolla R., MalisettyV., Swamy V., and Chinthalapally R. (2004). Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits Azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces Apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. Cancer Epidemiology, *Biomarkers & Prevention,* 13 (8): 1393-1398.

Rouessac F., et Rouessac A. (1995). *Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. édition Masson: 19-85.

Rouessac F., et Rouessac A. (2000). *Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes.* édition Masson: 5-20.

Tabassi S. A. S., Hosseinzadeh H., Ramezani M., Moghimipour E., and Mohajeri S. A. (2006). Isolation, characterization and study of enhancing effects on nasal absorption of insulin in rat of the total saponin from *Acanthophyllum squarrosum*. *Current Drug Delivery*, 3(4): 399-404.

Trouillas P., Calliste C-A., Allais D-P., Simon A., Marfak A., Delage C., and Duroux J-L. (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry* 80: 399-407.

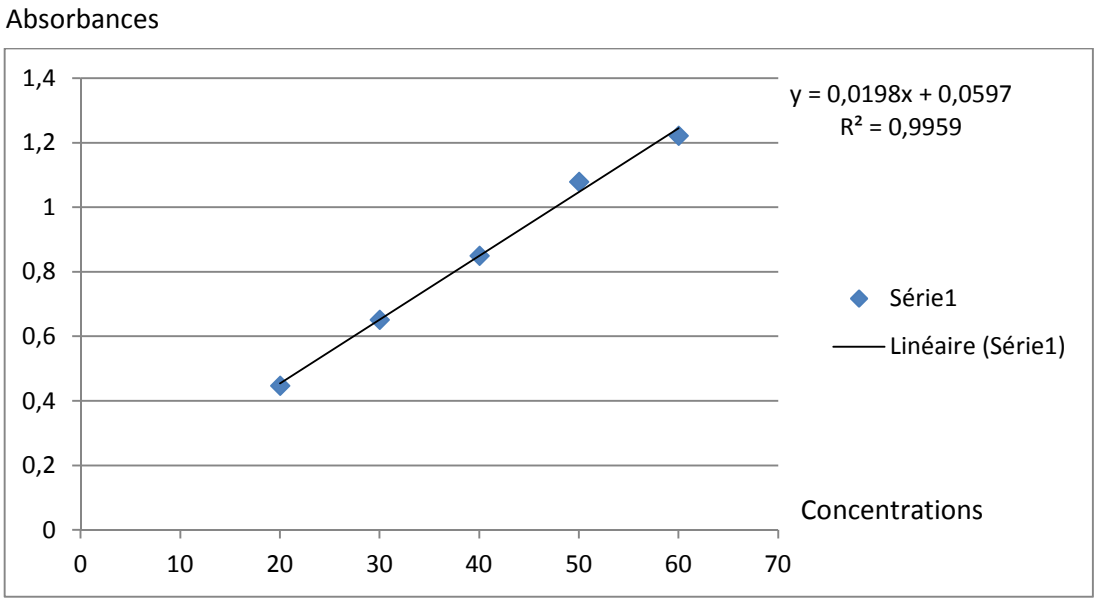
Vincken J.-P., Heng L., de Groot A., and Gruppen H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3): 275–297.

Wang H., Gao J., Kou J., Zhu D., and Yu B. (2008). Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. *Phytomedicine*, 15(5): 321–326.

Wassler M., Westman J., and Fries E. (1990). Permeabilization of hepatocytes by a saponin and the effects of dextran. *European Journal of Cell Biology*, 51(2): 252–258.

Zheng Q., Li W., Han L., and Koike K. (2007). Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from *Gypsophila oldhamiana*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 55(4): 646–650.

Annexe



Courbe d'étalonnage de dosage des saponines totaux.

Résumé

Clematis flammula est une plante médicinale utilisée pour le traitement de diverses pathologies inflammatoires. Les études précédentes ont permis de révéler des activités anti-inflammatoire et antioxydante ce qui nous a conduit à caractériser trois extraits de cette plante (éther de pétrole, acétate d'éthyle, et n-butanol) par CCM. Les tests phytochimiques ont révélé la présence de saponines dans les trois extraits. Le dosage des saponines dans les trois extraits a montré la richesse des feuilles de *Clematis flammula* en saponines avec le taux le plus élevé dans l'extrait éther de pétrole (631 µg équivalents acide oléanolique / mg d'extrait). La comparaison avec deux standards l'acide oléanolique et la diosgénine a révélé que les saponines détectés, sont des saponines très proches de l'acide oléanolique (saponines triterpeniques). De plus des fractions chromatographiques ont été isolées et dosées.

Mots clés: *Clematis flammula,* Saponines, CCM, acide oléanolique, diosgénine.

Abstract

Clematis flammula is a medicinal plant used for the treatment of diverse inflammatory pathologies. Previous studies have revealed anti-inflammatory and antioxidant activities, which led us to characterize three extracts of this plant (petroleum ether, ethyl acetate, and n-butanol) by CCM. Phytochemical tests revealed the presence of saponins in the three extracts. The quantification of saponins in the three extracts demonstrated the wealth of *Clematis flammula* leaves in saponins, with the highest level in the petroleum ether extract (631 µg oleanolic acid equivalent/mg extract). The comparison with two standards, oleanolic acid and diosgenin, revealed that the saponins detected are very close to oleanolic acid (triterpenic saponins). Moreover, chromatographic fractions were isolated and quantified.

Key words: *Clematis flammula*, Saponins, Chromatography, oleanolic acid, diosgenin.

ملخص

ياسمين البر هي نبتة طبية مستخدمة لعلاج الأمراض المختلفة. وقد كشفت الدراسات السابقة لها عن وجود أنشطة مضادة للالتهابات ومضادة للأكسدة ، مما دفعنا إلى توصيف ثلاث مستخلصات من هذا النبات (أسيتات الإيثيل، اثير البترول و ن-بيتانول) بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة. وقد كشفت الاختبارات الكيميائية النباتية وجود الصابونينات في المستخلصات الثلاثة. أظهرت جرعات الصابونين في المقتطفات الثلاثة ثراء أوراق *ياسمين البر* بالصابونينات مع أعلى معدل في مستخلص إثير البترول (631 ميكروغرام مكافئ لحمض الأليانوليك / مغ من المستخلص). أظهرت المقارنة مع مقياسين لحمض الأليانوليك و الديوسجينين ، أن نوعية الصابونينات المكتشفة هي قريبة جدا من حمض الأليانوليك (الصابونينات الثلاثية). بالإضافة إلى ذلك ، تم عزل عينات من الطبقة الرقيقة للكروماتوغرافيا و معايرتها.

كلمات البحث : *ياسمين البر*، الصابونينات، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، حمض الأليانوليك, الديوسجينين.