



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

Référence /

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté et soutenu par :
AZOUZ Chaima

Le : mardi 26 juin 2018

Effet des solvants sur l'activité antioxydante de *Ranunculus sardous*

Jury :

Mme. BEBBA Nadjat	MCB	Université Mohamed Kheider Biskra	Président
M. DEGHIMA Airouche	MAA	Université Mohamed Kheider Biskra	Rapporteur
M. BENBELAID Fathi	MAB	Université Mohamed Kheider Biskra	Examineur

Remerciements

Je loue et remercie tout d'abord Allah.

Je tiens à remercier mon encadreur Monsieur Deghima Amirouche pour avoir acceptée d'encadrer mon travail, pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son soutien tout au long de mon travail.

Ma gratitude s'adresse aux membres de jury qui nous font honneur en acceptant d'évaluer notre travail.

Mes remerciements à tous les membres de laboratoire de la faculté.

Mes profonds remerciements à mes chers parents pour ses patiences et ses soutiens moraux incessants surtout pendant les moments difficile lors de l'élaboration de mon travail.

Enfin, un salut particulier à tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Dédicace

A Mes chers parents ...

A Mes frères et ma sœur ...

A Toute la famille ...

Et A tous mes amis ...

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Table des matières	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	
Introduction général.....	I

Partie I Synthèse Bibliographique

Chapitre 01 : Présentation de la plante

1. La plante <i>Ranunculus sardous</i>	1
1.1 La famille Ranunculacées	1
1.2 Le genre <i>Ranunculus</i>	1
2.3. L'espèce <i>Ranunculus sardous</i>	1
2.4. Classification	3
2.5. Usage traditionnelle et activité biochimique	3
2.6. Composition chimique de genre <i>Ranunculus</i>	3

Chapitre 02 :Les métabolites secondaires

1. Les métabolites secondaires	2
2. Les polyphénols.....	2
2.1 Classification des polyphénols	2
2.1.1 Les non flavonoïdes	3
2.1.2. Les flavonoïdes	3
2.1.3 Les tannins	3
2.2. Activités biologiques des polyphénols	4

2.3 Activités antioxydante des flavonoïdes	4
3. Triterpenes.....	6
 <u>Chapitre 03 : Notions de stress oxydatif et d'antioxydant</u>	
1. Stress Oxydatif	6
1.2. Notions de stress oxydatif.....	6
1.3 Les maladies lies aux stress oxydant	7
2. Les antioxydants.....	7
2.1. Systèmes de défense antioxydants.....	7
2.1.1 Système enzymatique.....	8
2.1.2 Les antioxydants non enzymatiques	8
2.1.3 Les antioxydants d'origine végétale	8

Partie II Partie Expérimentale

Chapitre 04 : Matériels et Méthodes

1. Matériels.....	10
1.1 Matériel biologique.....	11
1.1.2. Ranunculus sardous	11
2. Méthodes	11
2.1. Extraction et Fractionnement des extraits	11
2.1.1 Mode opératoire	11
2.1.2. Rendement de l'extraction	13
2.2. Dosage des métabolites secondaires.....	13
2.2.1. Dosage des Polyphénols totaux	13
2.2.2. Dosage des Flavonoïdes totaux.....	14
2.2.3. Dosage des Triterpènes	14
2.2.4. Dosage des tannins condensés	15
2.3. Evaluation de l'activité antioxydante	15
2.3.1. Test de pouvoir réducteur FRAP	15
2.3.2. Test de l'acide 2,2'-azinobis-3 éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS).....	16
2.3.3. Le test de Capacité antioxydante totale	17

2.4. Analyse statistique	18
 <u>Chapitre 05 : Résultats et Discussions</u>	
1. Rendement des extraits.....	20
1.1. Le rendement d'extraction	20
1.1.1. Extraction Hydro-Ethanolique :	20
1.1.2. Extraction Hydro-Acétonique :	20
1.2. Le rendement des fractions	21
1.3 Dosage des métabolites secondaires	22
1.3.1. Dosage des polyphénols	22
1.3.2. Dosage des Flavonoïdes totaux	24
1.3.3. Dosage des tannins condensés	26
1.3.4 Dosage des triterpènes	28
2.Evaluation de l'activité antioxydante.....	29
2.1. Test de pouvoir réducteur	29
2.2. Inhibition de radical cation ABTS+.....	33
2.3. Test de Capacité antioxydante totale	33
Conclusion	38
Références bibliographique	40

Liste des Tableaux

Tableau 1 classification de Ranunculus sardous Selon (Kebieche ,2009).....	3
---	---

Liste des Figures

Figure 1 Les parties aeriennes de Ranuncules sardous.....	2
Figure 2 : Les parties souterraines de Ranunculus sardous	2
Figure 3 : Structure du noyau phénol (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)	2
Figure 4 : Structures des flavonoïdes : enchaînement C6-C3-C6 (Isorez, 2007)	3
Figure 5 : Déséquilibre entre antioxydants et pro-oxydants (Andersen, J. K. (2004))	6
Figure 6 : Protocole d'extraction Hydro-éthanolique.	11
Figure 7 : Protocole d'extraction Hydro-acétonique.....	12
Figure 8 : Rendement des extraits brut hydro-acétonique et hydro-éthanolique.....	20
Figure 9 : Rendement de différentes fractions des deux extractions	21
Figure 10 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.	22
Figure 11 Dosage des polyphénols totaux pour les fractions des deux extractions.....	23
Figure 12 : Droite d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes	25
Figure 13 : Dosage des flavonoïdes totaux pour les fractions des deux extractions.....	25
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la catéchine	27
Figure 15 : dosages des tanins condensés des fractions des deux extractions	27
Figure 16 : Droite d'étalonnage de l'acide ursolique pour le dosage des Triterpènes.....	28
Figure 17 Teneur des extraits en Triterpènes en µg EAU/mg Extrait sec	29
Figure 18 : Pouvoir réducteur de différentes fractions des deux extractions et ces standards	30
Figure 19 : Gamme d'étalonnage d'acide ascorbique.....	31
Figure 20 : Pouvoir réducteur des différentes fractions.....	31
Figure 21 : Inhibition de radical libre ABTS+ en fonction de la concentration	33
Figure 22 : Inhibition de radical libre ABTS+ en fonction des concentrations des standards	34
Figure 23 : IC 50 de différentes fractions et les standards effectués par le test ABTs+.....	34
Figure 24 :Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test de la capacité antioxydante total.....	35
Figure 25 : La capacité antioxydant de différentes fractions et de ces standards.	36

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

ABTs+ : Acide 2-2-azinobis-3 éthylenzothiazoline-6- sulphonique.

AC : Absorbance du Contrôle.

AEtn : acetate d'éthyle de l'extrait acetonique.

AEtr : acetate d'éthyle de l'extrait ethanolique.

AT : Absorbance du test- Absorbance du blanc de test.

Atn : fraction aqueuse de l'extrait acetonique.

Atr : fraction aqueuse de l'extrait ethanolique.

BHA : Butyl hydroxyanisole.

CAT : Catalase.

EOR ; Espèces Réactives oxygénées .

Etn : fraction d'éther de petrol de le'extrait acetonique

Etr : fraction d'éther de petrol de le'extrait ethanolique.

Fe₂₊ : Fer ferreux.

Fe₃₊ : Fer ferrique.

FRAP: Ferric Reducing antioxidant power assay.

GPx : Glutathion peroxydase.

I% : Pourcentage d'inhibition.

IC₅₀ : Concentration d'inhibition 50%.

Méch : est la masse sèche de l'échantillon végétal en g.

Mext : est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

NO : Oxyde d'azote

NO₂ : Dioxyde d'azote.

R(%) : Rendement en %

RL : Radicaux libre .

SOD : Superoxyde dismutase

TAC : Capacité Antioxydant totale (molibdate)

TEAC : Capacité Antioxydant Equivalent au Trolox.

TQ : Thymoquinone.

UV : *Ultra-violet*

µg EAG/mg d'extrait : µg Equivalent Acide Gallique / mg d'extrait sec .

µg EC/mg d'extrait: µg Equivalent de Catéchine / mg d'extrait sec.

µg EQ/mg d'extrait : µg Equivalent Quercitine /mg d'extrait sec.

µg ER/mg d'extrait : µg Equivalent de Rutine / mg d'extrait sec .

µg EAA/mg d'extrait : µg Equivalent d'acide ascorbique/mg d'extrait sec.

µg EAU/mg d'extrait : µg Equivalent Acide Ursolique /mg d'extrait sec.

µg E vit C/mg d'extrait : µg Equivalent de vitamine C /mg d'extrait sec.

XO : Xanthine oxydoréductase.

Synthèse

bibliographique

Introduction générale

Introduction général

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets néfaste dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces réactives oxygénées (ERO) (Haleng et *al.*, 2007). Dans certaines situations, la production des ERO augmente fortement, entraînant un stress oxydatif. En raison de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme, les ERO ont été impliqués dans un très grand nombre de pathologies aiguës tel que le cancer, le diabète, Alzheimer (Fantaine, 2007)

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (Bahorun, 1997).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, antiinflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires (Bahorun, 1997).

Nos études comprennent deux parties principales ; la première est une synthèse bibliographique comportant une description de la plante *Ranunculus sardous*, et les antioxydants

La deuxième partie de ce travail est une étude expérimentale où sont présentés : Les extractions des antioxydants à partir des parties souterraines de la plante en utilisant 2 solvants, Le dosage de quelques substances antioxydantes dont les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins et les triterpènes .La détermination de l'activité antioxydante des différents fractions, en utilisant trois méthodes (pouvoir réducteur et activité anti-radicalaire et la capacité anioxydante totale).Déterminé l'effet des solvants sur le rendement et le teneur en métabolites secondaires, ainsi que pour l'activité antioxydante.

Chapitre01 :

Présentation de la

plante

1. La plante *Ranunculus sardous*

1.1 La famille Ranunculacées

Les Ranunculacées ont une distribution mondiale, bien que de nombreux genres et espèces soient centrés dans les zones tempérées de l'Asie de l'Est. La famille des Ranunculaceae est composée d'environ 1500 à 2000 espèces regroupées en une soixantaine de genres (Spichiger, 2002).

Elles sont pour la plupart des plantes herbacées, plus rarement grimpantes et ligneuses. Presque toutes sont des herbes terrestres, vivaces ou annuelles, les feuilles sont généralement alternes, simples, entières ou découpées, ou même composées, habituellement dentées, ou crénelées, à nervation pennée palmée, sans stipules et les fleurs sont spiralées ou spiralo-cycliques (Baladehia et al., 2013).

1.2 Le genre *Ranunculus*

Le genre *Ranunculus* (renoncules) représente le plus grand genre au sein des Ranunculaceae, près de 600 espèces appartiennent au genre *Ranunculus*. Il est réparti dans l'hémisphère nord. On le trouve aussi dans les régions tempérées du sud dans les tropiques où elles sont habituellement confinées à des altitudes plus élevées, et réparties sur tous les continents. Les membres de ce genre présentent des sépales simples, lobés, fendues ou divisées 3,5, non voyantes, les pétales sont habituellement 5 jaunes, principalement abovés, étamines et carpelles, de nombreux agrégats d'akènes dans des têtes globuleuses à oblongues, des akènes arrondis ou un peu aplatis (Radford et al., 1968) .Cosmopolite, dans les zones de montagne, l'endémisme contribue à la diversité considérable de l'espèce, mais dans les altitudes inférieures les espèces répandues sont également assez communes (Elvira et al., 2005).

Le genre *Ranunculus* de la famille des Ranunculacées est représenté dans la flore d'Algérie par 50 espèces (Hachelaf1 et al., 2013).

2.3. L'espèce *Ranunculus sardous*

Ranunculus sardous a un tige ramifiée, couchée, portant plusieurs fleur (Jean , 1806) Les fleurs ont cinq pétales jaunes(**Figure 01**), cinq sépales dressés et beaucoup d'étamines a folioles pétiolées, (Kebièche et al., 2011) divisées en trois lobes, l'intermédiaire plus longe (Jean, 1806) et périanthes étalés pédoncules stress fleurs jaunes feuilles ternées (Chevallier A, 1860) et très ouverts (Jean, 1806) la production

de stolons continue jusqu'à la fin de l'été. Une à deux stolons par plante sont communes mais il y a des plantes qui peuvent avoir jusqu'à cinq ainsi que des branches secondaires. (Kebièche et *al.*, 2011) Une à deux stolons par plante sont communes mais il y a des plantes qui peuvent avoir jusqu'à cinq ainsi que des branches secondaires (Holm et *al.*, 1997)



Figure 1 Les parties aériennes de *Ranunculus sardous*



Figure 2 : Les parties souterraines de *Ranunculus sardous*

2.4. Classification

Tableau 1 classification de *Ranunculus sardous* Selon (Kebieche ,2009)

Règne Végétal	
Phylum	Dicotyledones
Famille	Ranunculaceae
Ordre	Ranale
Genre	Ranunculus
Especce	<i>Ranunculus Sardous</i>

2.5. Usage traditionnelle et activité biochimique

L'utilisation la plus courante des espèces *Ranunculus* concerne le traitement des rhumatismes, comme rubéfiant et contre la fièvre intermittente. Pour cette utilisation, la plante est généralement préparée comme décoction. Elles sont également indiquées comme un remède antihémorragique. En Algérie les feuilles séchées de cette plante sont utilisées sous forme d'infusion comme traitement du diabète sucré, des hépatites et de la jaunisse (Kebieche et *al.*, 2011).

2.6. Composition chimique de genre *Ranunculus*

Les études phytochimiques sur diverses espèces du genre *Ranunculus* ont rapporté qu'ils contiennent de l'anémone, du carotène ,des flavone-glycosides et des ranuncosides .Les extraits salins de certaines espèces Ont été signalés posséder des activités antibactériennes, antifongiques et antipaludiques (khan et *al.*,2008) et produisent des composés appartenant à différents groupes de métabolites secondaires, y compris les saponines de triterpène , les alcaloïdes, les flavonoïdes , les acides gras et les acides organiques (Akkol et *al.*, 2012)

Elle est riche aussi en composés polyphénoliques et contient une teneur importante en flavonoïdes (Kebieche et *al.*, 2011), prancipalment R (+)-Dalbergi phénol,R(+)- 4methoxydalbergione, méthyle3,4,5,-trihydrobenzoate, acide 4-hydroxy-2- méthoxybenzoïque , acide p-hydroxycinnamique , b-sitosterol, Ranupenin (Aslam et *al.*, 2012)

Chapitre 02 : Les métabolites secondaires

1. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (Lutge et *al.*, 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007)

2. Les polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal étant trouvé dans tous les fruits et les légumes (Waksmundza et *al.*, 2011)

Plus de 8000 structures ont été identifiées, allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (Dai et Mumper, 2010). Ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Les polyphénols contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (Visioli et *al.*, 2000)

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : ether, ester, hétéroside (Bruneton, 1999)

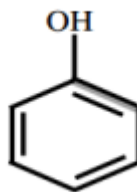


Figure 3 : Structure du noyau phénol (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

2.1 Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : **Les non flavonoïdes** dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes,

les lignanes, les lignines et les coumarines (Hoffman, 2003), et **les flavonoïdes**, dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols (Pinacemail et *al.*, 2007)

2.1.1 Les non flavonoïdes

2.1.1.1 Acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxy benzoïques et les acides hydroxy cinnamiques (Chanforan, 2010).

2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005). Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (Topas et *al.*, 2008).

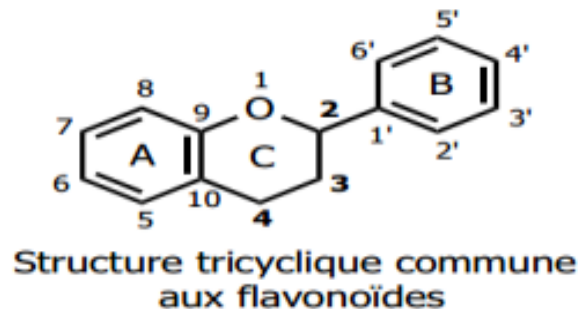


Figure 4 : Structures des flavonoïdes : enchaînement C6-C3-C6 (Isorez, 2007)

2.1.3 Les tannins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. On distingue : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Roux et Catier, 2007)

2.2. Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques, ils interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures Mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister les attaques des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Bahorun,1997). Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, antithrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (Babar et al, 2007), anti-allergènes, vasodilatateurs (Falleh et *al.*, 2008) et antioxydants (Gomez et *al.*, 2006).

2.3 Activités antioxydante des flavonoïdes

Ces dernières années , une importances particulière a été accordés aux flavonoïdes grâce à leurs propriétés antioxydants qui sont attribués à : leur capacité de piéger directement les radicaux libres , de chélater les ions métallique implique dans la production des EOR *via* les réactions Fenton et Haber-Weiss , d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases , d'activer les enzymes antioxydants et de réduire les radicaux α -tocopheryl (Coetelle 2001 ;Lin et Weng .,2006 ;Heim et *al.*, 2002).

3. Les terpènes

Les terpènes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une unité simple à cinq atomes de carbone nommée isoprène. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne, ainsi que dans les divers modes d'assemblage. La formation de structures cycliques, l'addition de fonction comprenant de l'oxygène et la conjugaison avec des sucres ou d'autres molécules peuvent rendre leurs structures complexes (Hopkins ,2003).

Chapitre 03 : Notions de stress oxydatif et antioxydant

1. Stress Oxydatif

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique (Durand et *al.*, 2013) ce qui le rend extrêmement réactif (Manallah., 2012). Lorsque cet électron célibataire est situé sur un atome d'oxygène, on parle alors « d'espèces réactives de l'oxygène » (ERO) ou « reactive oxygen species » (Durand et *al.*, 2013).

En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable, il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Boubekri, 2014), une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez, 1995).

Les radicaux libres proviennent à la fois de sources endogènes (mitochondries, réticulum endoplasmique, cellules phagocytaires.) et de sources exogènes (pollution, alcool, fumée de tabac, solvants industriels, pesticides, et rayonnement) (Phaniendra et *al.*, 2015)

1.2. Notions de stress oxydatif

En quantité modérée, les RLs sont des éléments indispensables à la vie, car ils remplissent de nombreuses fonctions physiologiques au cours de la croissance ou de la défense de l'organisme (Belaïch et Boujraf, 2016). Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (**Figure 05**) est équilibrée, si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une superproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (Favier, 2003)

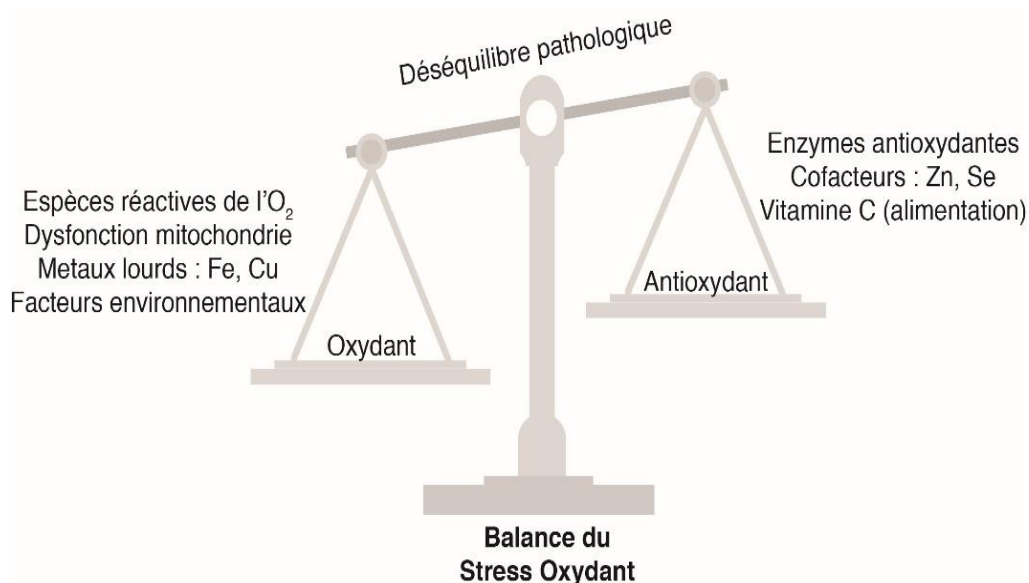


Figure 5 : Déséquilibre entre antioxydants et pro-oxydants (Andersen, J. K. (2004))

1.3 Les maladies lies aux stress oxydant

Le stress oxydatif causé par les radicaux libres augmente avec l'âge et peut donc submerger les systèmes de réparation naturels chez les personnes âgées et contribue grandement aux maladies associées au vieillissement (Favier, 2006).

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (Atawodi, 2005 ; Georgetti et *al.*, 2003).

2. Les antioxydants

Le terme d'antioxydant désigne « toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat (Durand et *al.*, 2013). Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles (Fontaine, 2007). Les antioxydants réduisent les espèces oxydantes en un composé moins oxydant et en pratique plus stable (Descamps et *al.*, 2006). Ils sont classés **Selon leur mode d'action** : les antioxydants sont classés en deux catégories : (Pastre., 2005)

- système de défense primaire, ou chain breaking.
- système de défense secondaire
- ❖ **Selon leur localisation cellulaire** : Les antioxydants peuvent être classés en :
 - molécules liposolubles
 - molécule hydrosolubles.
- ❖ **Selon leur origine** : Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories avec :
 - les enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme.
 - les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation.

2.1. Systèmes de défense antioxydants

Autour de cette ambiguïté entre danger et nécessité de l'oxygène et des radicaux libres, l'organisme a développé de puissants systèmes de défenses antioxydantes permettant de contrôler et de maîtriser le plus précisément possible ce métabolisme (Leverve., 2009).

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques (Cristol et *al.*, 2002)

2.1.1 Système enzymatique

Le système endogène est constitué d'enzymes ou d'agents réducteurs (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) dont l'action est de neutraliser les ERO par leur transformation en molécules stables et non réactives (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

- Superoxyde dismutase (SOD) qui transforme l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical libre potentiellement très dangereux, en peroxyde d'hydrogène, ou eau oxygénée (H_2O_2), beaucoup moins dangereux (Leverve, 2009).
- Catalase : a pour unique substrat le peroxyde d'hydrogène qu'elle réduit en eau (Cillard, 2006).
- Glutathion peroxydase : élimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques (Haleng et *al.*, 2007).

2.1.2 Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols. (Evans, 2002 ; Packer et *al.*, 1997).

2.1.3 Les antioxydants d'origine végétale

De nombreuses plantes ont été identifiées comme ayant des activités antioxydantes potentielles et leur consommation recommandée. L'accent est mis sur les antioxydants naturels, en particulier les polyphénols végétaux. Il est intéressant d'étudier les propriétés antioxydantes des infusions à base de plantes (Katalinic et *al.*, 2006).

De nombreuses études ont suggéré que les flavonoïdes présentent plusieurs propriétés biologiques, Cependant, la plupart d'intérêt a été consacré à leur activité antioxydante (Pietta, 2000).

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre 04 : Matériel et méthode

1. Matériels

1.1 Matériel biologique

1.1.2. *Ranunculus sardous*

La plante *Ranunculus sardous* a été récoltée en Avril 2017 dans la région de Ras el oued (Bourdj Bouarreridj); la partie récoltée est constituée des racines, la plante est séchée dans l'ombre pendant 30 jours.

2. Méthodes

2.1. Extraction et Fractionnement des extraits

2.1.1 Mode opératoire

2.1.1.2.1 Extraction hydro-éthanolique

L'extraction est effectuée selon le protocole (Lu Z.M et *al.*, 2011)

Les extraits des racines de *R. sardous* sont préparés par extraction dans 500ml de l'éthanol 70%. On répète cette opération pendant 3 jours. On obtient l'extrait brut qui est fractionné par la suite par l'utilisation des solvants (éther de pétrole et acétate d'éthyle). Toutes les fractions sont passées par la suite dans un évaporateur rotatif à température douce.

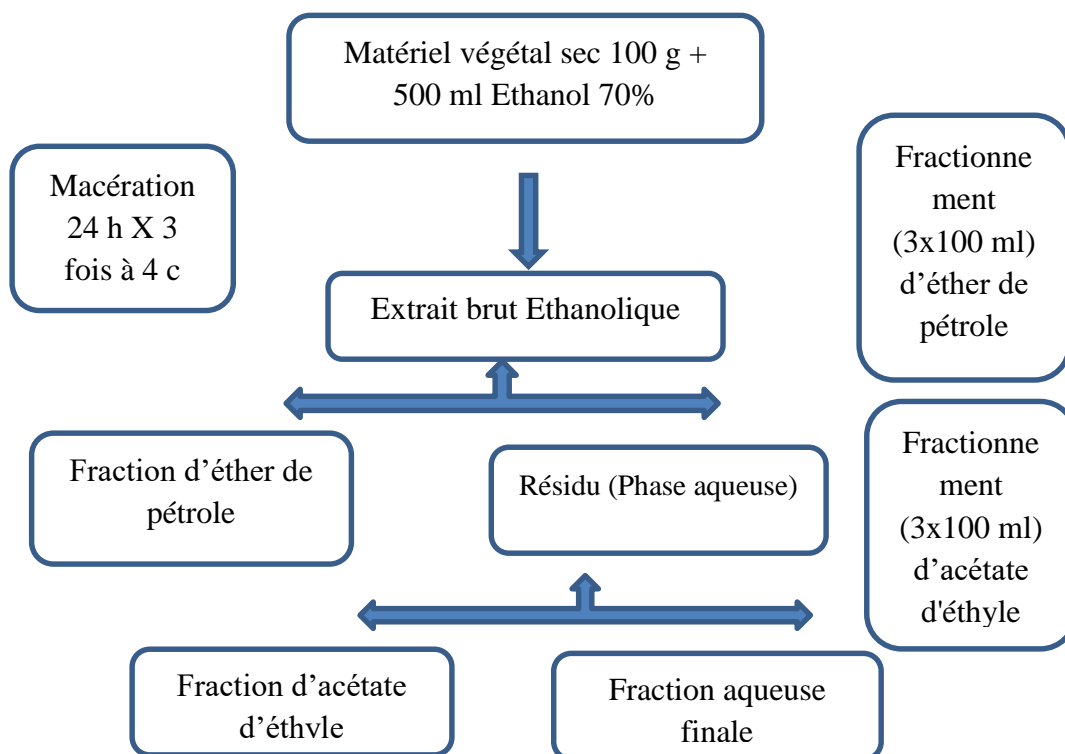


Figure 6: Protocole d'extraction Hydro-éthanolique.

2.1.1.2.2 Extraction hydro-acétonique

L'extraction est effectuée selon le protocole selon Hagerman A E et Butler L G (1991). Les extraits des racines de *R.sardous* sont préparés par extraction dans 500ml d'acétone 70% . On répète cette opération pendant 3 jours. On obtient l'extrait brut Hydro-acétonique qui est fractionnée par la suite par l'utilisation des solvants (éther de pétrole, acétate d'éthyle).

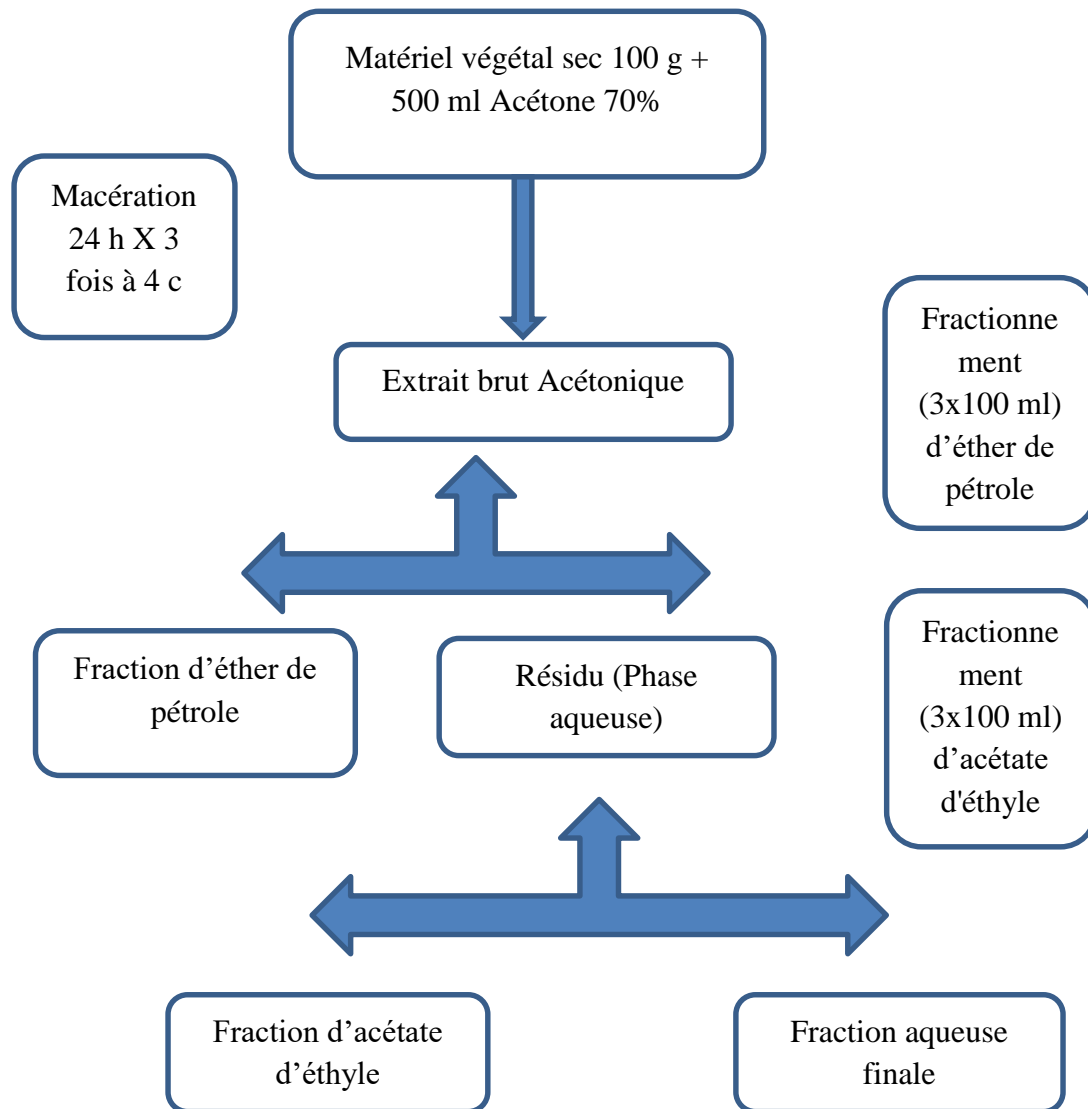


Figure 7: Protocole d'extraction Hydro-acétonique.

2.1.2. Rendement de l'extraction

2.1.2.1 Rendement de l'extrait brut

Les rendements des extractions sont calculés suivants la formule ci-dessous :

$$Rdt \% = M \text{ extrait} / M \text{ échantillon} * 100$$

Avec : M extrait =masse de l'extrait en gramme.

M échantillon = masse de l'échantillon en gramme (Boubekri, 2014).

2.1.2.2 Rendement des fractions

$$Rdt \% = M \text{ échantillon} / M \text{ d'extrait brut} * 100$$

Avec : M extrait =masse de l'extrait brut en gramme.

M échantillon = masse de l'échantillon (fraction) en gramme (Boubekri, 2014).

2.2. Dosage des métabolites secondaires

2.2.1. Dosage des Polyphénols totaux

2.2.1.1. Principe

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965).

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon le méthode de Folin Ciocalteu (Singleton et *al.*, 1999) , ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin Ciocalteu en un complexe ayant la couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés.

2.2.1.2. Mode opératoire

Dans des Eppendorf mélanger : 100 µl de solution d'extrait, 500µl du réactif de Folin Ciocalteu à 10 % (v/v), puis le mélange est incubé pendant 4 min, on ajout ensuite 400µl de Na₂CO₃ à 7.5% (p/v), puis le mélange est soumis à une autre incubation pendant 2h à l'obscurité. La lecture se fait dans la longueur d'onde 765 nm.

Le blanc de test contient : 100 µl de méthanol, 500 µl de folin et 400 µl de Na₂CO₃. Pour chaque extrait, le test est réalisé en triplicata.

2.1.1.3 Expression des résultats

Les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide gallique dans le méthanol. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent en acide gallique par 1 milligramme de poids sec (μg EAG/mg d'extrait).

2.2.2. Dosage des Flavonoïdes totaux

2.2.2.1. Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par (Djeridane *et al.*, 2006) avec le trichlorure d'aluminium. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe dans le visible à 430 nm.

2.2.2.2. Mode opératoire

Dans un Eppendorf : on mélange 300 μl de solution d'extrait avec 300 μl AlCl_3 , puis on incube pendant 15 min, la lecture se fait à la longueur d'onde 430 nm.

Le blanc : 1ml d'extrait et 1ml de méthanol.

Blanc de test : extrait dilué.

2.2.2.3 Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en μg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

2.2.3. Dosage des Triterpènes

2.2.3.1. Principe

Le principe de base de cette méthode est la réaction des triterpènes oxydés avec la vanilline, où l'acide sulfurique est utilisé comme oxydant. Les sapogénines stéroïdiennes avec ou sans double liaison en C-5, les sapogénines triterpénoïdes et les acides stéroliques et biliaries qui ont un groupe OH en position C-3 réagissent avec la vanilline en milieu acide pour donner des chromogènes avec des maxima d'absorbance à 548 nm, selon la nature des saponines

2.2.3.2. Mode opératoire

20 μl d'extrait sont mélangés avec 30 μl vanilline, on ajout 100 μl acide perchlorique, puis on incube le mélange à l'obscurité pendant 45 min dans un bain marie dont la température

est 60 °C, après le mélange est refroidit dans un bain glacé pour et on ajoute 450 µl acide acétique, la lecture des **Abs** est réalisée à 548 nm .

Blanc : l'extrait est remplacé par le méthanol.

2.2.3.3. Expression des résultats

Les résultats sont obtenus en µg EAU/mg d'extrait sec par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de l'acide ursolique.

2.2.4. Dosage des tannins condensés

2.2.4.1. Principe

Les tannins condensés forment un complexe de couleur rose avec la vanilline en milieu acide.

2.2.4.2. Mode opératoire

Dans un tube on mélange 250 µl extrait, avec 625 µl vanilline. Et 625 µl d'acide sulfurique, une incubation de 15 min à température ambiante à l'obscurité est effectuée puis la lecture à 500 nm. Blanc : la vanilline est remplacée par le méthanol.

2.2.4.3. Expression des résultats

Les résultats sont obtenus en µg EC/mg d'extrait sec par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de la catéchine.

2.3. Evaluation de l'activité antioxydante

De nombreuses méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits. La plupart des méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé 3 tests chimiques : le test Ferric Reducing Antioxydant Power assay (FRAP) qui mesure le pouvoir de réduction des ions de fer, le test à l'acide 2,2'-azinobis-3 éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS), et le test de Capacité antioxydante totale.

2.3.1. Test de pouvoir réducteur FRAP

2.3.1.1. Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la

formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006)

2.3.1.2. Mode opératoire

Selon le protocole d'Oyaizu (1986). Dans des Eppendorf mélanger : 225 µl d'extrait avec 225 µl de tampon phosphate on ajoute 225 µl de $K_3Fe(CN)_6$ puis on l'agit et l'incube pendant 20 min dans un bain-marie à 50°C, on ajoute 225 µl de TCA immédiatement, puis il va passer par une centrifugation de 10 min à 700 TPM, puis on enlève 375 µl du surnageant et on le dilue avec 375 µl d' H_2O distillé, après on additionne 75 µl de m'app et la lecture de Abs se fait à 700 nm. Blanc : l'extrait est remplacé par du méthanol.

2.3.1.3. Expression des résultats

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différentes fractions des extraits étudiés.

L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées. Pour chaque concentration, une absorbance est mesurée et les résultats sont représentés sous forme de graphique.

Les résultats sont obtenus par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique, et avec la quercétine et l'acide gallique comme standards

2.3.2. Test de l'acide 2,2'-azinobis-3 éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS)

2.3.2.1. Principe

L'ABTS est un radical cation caractérisé par sa couleur bleu vert foncé qui va disparaître après la réduction par un antioxydant donneur des protons (hydrogène). Ce radical est facilement formé à partir de l'acide correspondant par oxydation en présence de persulfate de potassium. Plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène considéré comme un antioxydant fort. La perte de couleur peut être suivie par la mesure de l'absorbance au spectrophotomètre à 734nm. (LI *et al.*, 2015).

2.3.2.2. Mode opératoire

2.3.2.2.1. Préparation de réactif

Suivant le protocole décrit par Aazza et *al.*, (2011), le radical ABTS•+ est produit par réaction entre une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) et une solution de persulfate de potassium (K₂S₂O₈, 2.45mM), utilisé comme oxydant. Ce mélange est laissé pendant au moins 16h à l'obscurité puis dilue avec l'eau distillé jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0.700 à la longueur d'onde de 734 nm.

2.3.2.2.2. Réaction

Dans un tube on mélange : 50 µl d'extrait avec 950 µl d'ABTS, on les incube pendant 7 min, et la lecture se faite à 700 nm, contre un blanc contient le réactif et le méthanol.

2.3.2.3. Expression des résultats

Pourcentage inhibition d'ABTS = (Absorbance de contrôle – Absorbance de l'échantillon/Absorbance de contrôle) ×100

2.3.3. Le test de Capacité antioxydante totale

2.3.3.1. Principe

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo (V) de couleur verte (Prieto et *al.* 1999).

2.3.3.2 Mode Opératoire

Un aliquote de 0,1 ml d'extrait est combinée à 1 ml de solution composée d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 mn. Après un repos de 6 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait. Comme pour les polyphénols totaux, l'activité antioxydante totale est exprimée en milligramme d'extrait. Blanc : l'extrait est remplacé par le méthanol.

2.3.3.3 Expression des résultats

Les résultats sont obtenus en µg EvitC/ mg d'extrait sec par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Absorbances en fonction de la concentration)

2.4. Analyse statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé. Et les résultats ont été exprimés sous la forme de moyenne \pm écart type. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le test de STUDENT, les différences ont été considérées significatives à ($P < 0.05$) en utilisant le logiciel de (Microsoft Excel 2013).

Chapitre 05 : Résultats et discussions

1. Rendement des extraits

1.1. Le rendement d'extraction

1.1.1. Extraction Hydro-Ethanolique :

Le rendement a été effectué par extraction des parties souterraines du *R sardous* le rendement de l'extrait hydro-éthanolique est 17.4%, le résultat est présenté dans **la figure 8**.

1.1.2. Extraction Hydro-Acétonique :

Le rendement a été effectué par extraction des parties souterraines du *R sardous* le rendement de l'extrait hydro-acétonique est 16.36 %, il est présenté dans **la figure 8**.

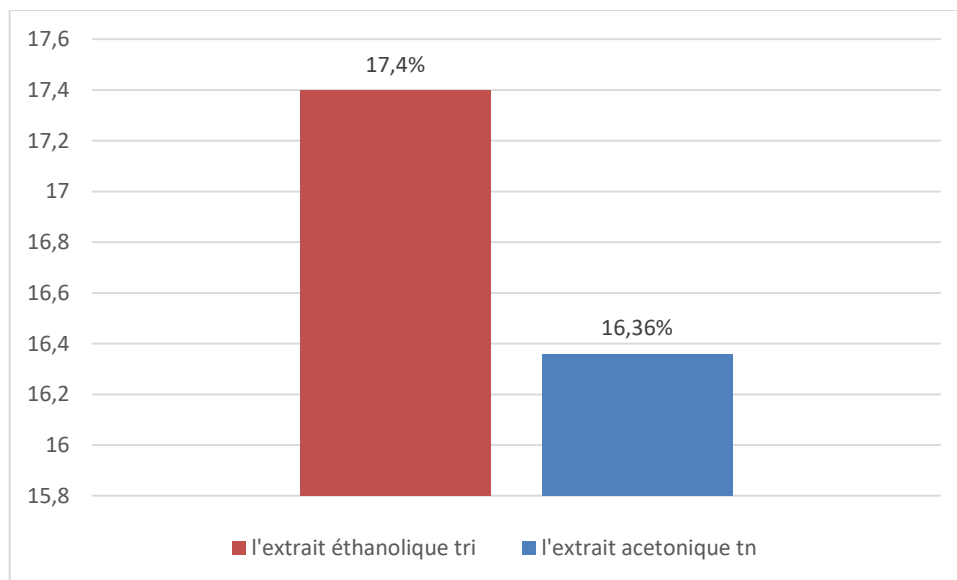


Figure 8: Rendement des extraits brut hydro-acétonique et hydro-éthanolique.

L'extrait hydro-acétonique a donné un meilleur rendement par rapport à l'extraction avec l'éthanol .

Dans l'étude kaya et *al.*, (2010) Il a comparé le rendement entre deux plantes du genre ranunculuse, l'espèce de *ranunculus sprunerianus* et *Ranunculus marginatus* , le rendement est calculé pour tous les organes des plantes . Le rendement de l'extrait méthanolique de l'espèce *Ranunculus marginatus* du même genre de notre espèce est de 11.80% et pour le résultat de *Ranunculus sprunerianus* est de 14.60%, alors que notre résultat de 17.4% pour l'extrait hydro-

acétonique et 16.36% pour l'extrait hydro-éthanolique est supérieur par rapport aux résultats des deux espèces précédentes.

En terme général, l'extraction dépend de la région et la période de la récolte (Keskes et *al.*, 2014), du type de solvant utilisé, de la méthode d'extraction et du temps de macération sont aussi des facteurs déterminants du rendement. La solubilité de la matière végétale dépend du type de solvant utilisé (polarité) et de leur degré de polymérisation solvants (Teugwa et *al.*, 2013).

D'une manière générale, Le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, la richesse de chaque espèce en métabolites.

1.2. Le rendement des fractions

Le rendement des fractions a été déterminé après le fractionnement de l'extrait hydro-éthanolique et l'extrait hydro-acétonique par des solvants à différentes polarités (éther de petrol, acétate d'éthyl.), présenté dans **la figure 9**

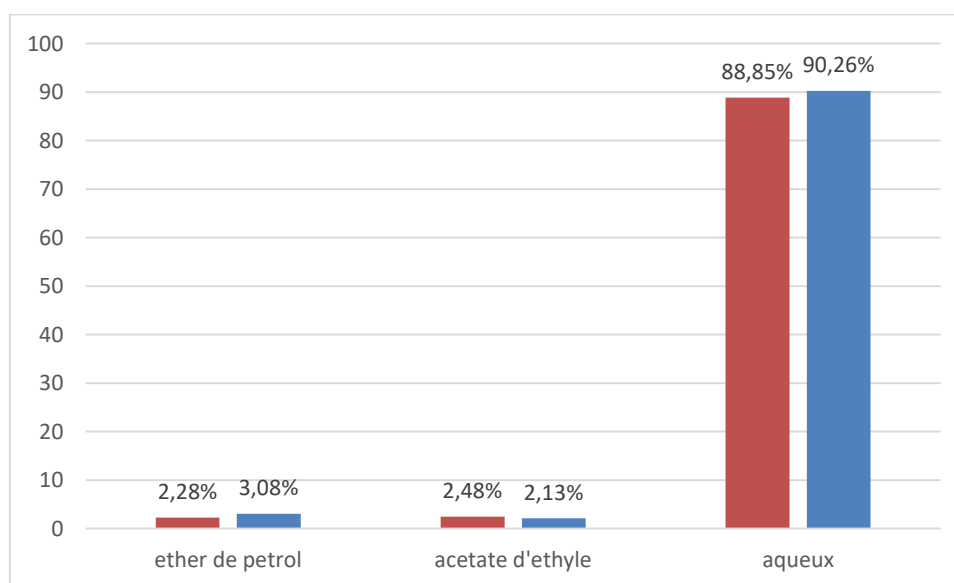


Figure 9: Rendement de différentes fractions des deux extractions

La fraction aqueuse représente la fraction la plus importante de l'extrait hydro-éthanolique avec un rendement égal 88%, ainsi que pour l'extrait hydro-acétonique qui présente 90.26%, suivie par la fraction d'éther de pétrol de l'extrait hydro-acétonique avec 3.08%, et 2.28% pour l'extrait hydro-éthanolique, puis la fraction de l'acétate d'éthyl de l'extrait hydro-éthanolique avec 2.48% ainsi 2.13% pour l'extrait hydro-acétonique.

Pour *Ranunculus marginatus* le rendement de la fraction aqueuse est 19.97%, dans notre résultat le rendement est plus fort avec 88% dans l'extraction hydro-éthanolique et 90% dans la deuxième, et le rendement de la fraction d'acétate d'éthyle 1.96% de ce résultat est proche de notre étude qui est 2.48% dans la première extraction et 2.13% dans la deuxième,

Cette différence est expliquée par la différence de polarité des solvants utilisée durant l'extraction (acétone, éthanol)

1.3 Dosage des métabolites secondaires

1.3.1. Dosage des polyphénols

L'estimation de la teneur en polyphénols se fait selon la méthode de Singleton et Rossi (1965) in Wong et *al.*, (2006) par l'utilisation de Réactif de Folin-Ciocalteu. La droite d'étalonnage a été tracée en utilisant l'acide gallique comme standard (10 à 200 µg/ml).

Les essais ont été réalisés en triple et la concentration des composées phéniques totales était déterminée à partir de la droite d'étalonnage de la **figure 10**

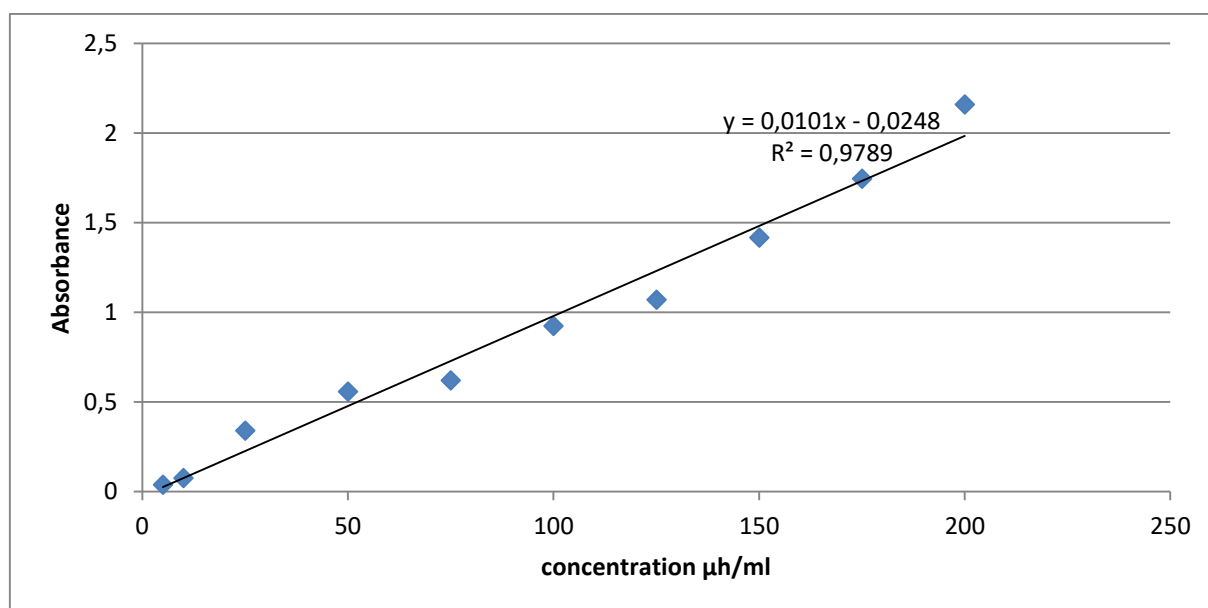


Figure 10 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

La quantité des polyphénols totaux dans les extraits est exprimée en microgramme équivalent d'acide Gallique par mg d'extrait. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 11**

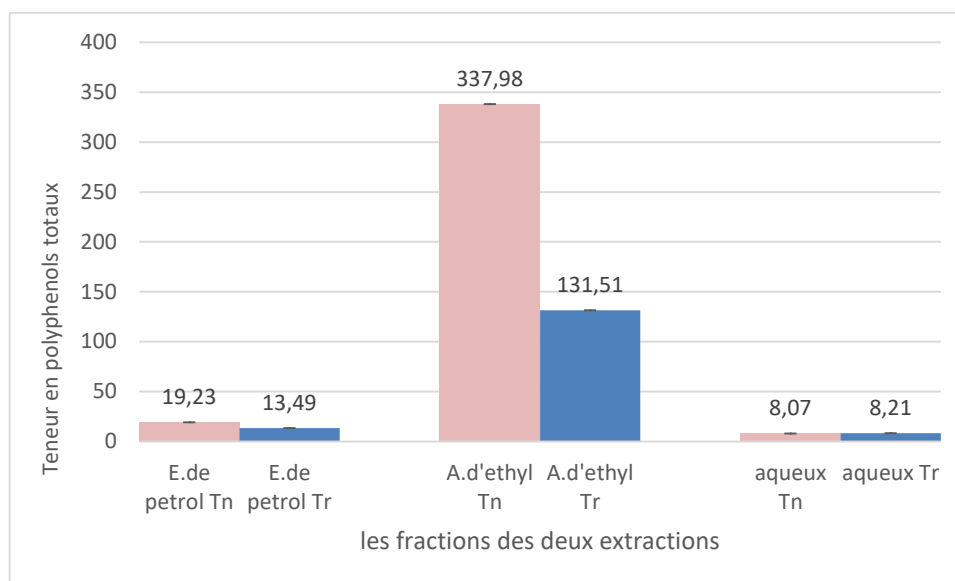


Figure 11 Dosage des polyphénols totaux pour les fractions des deux extractions

Les résultats de la **figure 11** montrent que la fraction la plus riche en polyphénols totaux est celle de l'acétate d'éthyl de l'extrait hydro-acétonique et contient une teneur forte par rapport aux autres extraits avec $337.98 \pm 0,020 \mu\text{g EAG/mg ES}$, alors que la fraction d'acétate d'éthyl de l'extrait hydro-éthanolique a une teneur de $131.51 \pm 0.031 \mu\text{g EAG/mg ES}$, puis la fraction d'éther de pétrole de l'extrait hydro-acétonique par $19.23 \pm 0.02 \mu\text{g EAG/mg}$, ainsi que la fraction d'éther de pétrole de la deuxième extraction avec $13.49 \pm 0.01 \mu\text{g EAG/mg}$, et enfin la fraction aqueuse de deuxième extraction avec $8.21 \pm 0.009 \mu\text{g EAG/mg}$, et $8.07 \pm 0.007 \mu\text{g EAG/mg}$ pour la première extraction.

D'après nos résultats on peut dire, pour une meilleure extraction des polyphénols totaux on utilise un solvant hydro-acétonique.

La différence entre la teneur en polyphénols des différentes fractions s'explique par la différence en solubilité de ces composés dans les solvants extracteurs choisis, sachant que les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires (Macheix et *al.* 2005).

Selon Bhatti et *al.*, (2015), le résultat d'espèce *Ranunculus arvensis* du même genre réalisé par extraction dans le méthanol de l'extrait aqueux est $1.43 \pm 0.01 \mu\text{g EAG/mg}$, et dans notre résultat est supérieur $8.21 \pm 0.009 \text{ mg EAG/g ES}$ et $8.07 \pm 0.007 \text{ mg EAG/g ES}$.

Selon Kebeiche et *al.*, (2011) les résultats d'espèce *Ranunculus repens* du même genre l'extrait d'acétate d'éthyl est 270 mg EAG/g et dans notre résultats est supérieur 337.98±0.020 µg EAG/mg ES et 131.51±0.031 µg EAG/mg ES .

Ces résultats ont été confirmés par les travaux de Bourgou et *al.*, (2016) qui ont étudiés l'effet des solvants sur le rendement des polyphénols totaux et flavonoïdes totaux, ils ont trouvé que l'extraction avec l'acétone 70% donne un teneur de 2.50% alors que l'éthanol 70% donne que 1.25%.

Ces résultats s'expliquent par la différence de polarité des solvants utilisée pendant l'extraction, les polyphénols sont des molécules solubles dans les solvants polaires, et dans ce cas l'acétone présente le meilleur solvant pour l'extraction.

D'après l'étude statistique ($P < 0.05$), ces résultats montrent qu'il y a une différence significatif entre les teneurs de fractions d'acétate d'éthyl des deux extractions, et l'acétate d'éthyl de l'extrait hydro-acétonique est significativement supérieur a celle de l'extrait hydro-éthanolique, aussi pour les teneurs de fraction d'éther de petrol pour les deux extraction, alors que dans les fractions aqueuses des deux extractions il y a une différences non significatif .

1.3.2. Dosage des Flavonoïdes totaux

L'estimation des teneurs en Flavonoïdes se fait selon la méthode de chélation de l'Aluminium (Djeridane et *al.* 2006).

La droite d'étalonnage a été tracée en utilisant la quercétine comme standard (5 à 50µg/ml). Des essais ont été réalisés en triplicata el la concentration des flavonoïdes totaux était déterminée à partir de la droite d'étalonnage de la **Figure12**

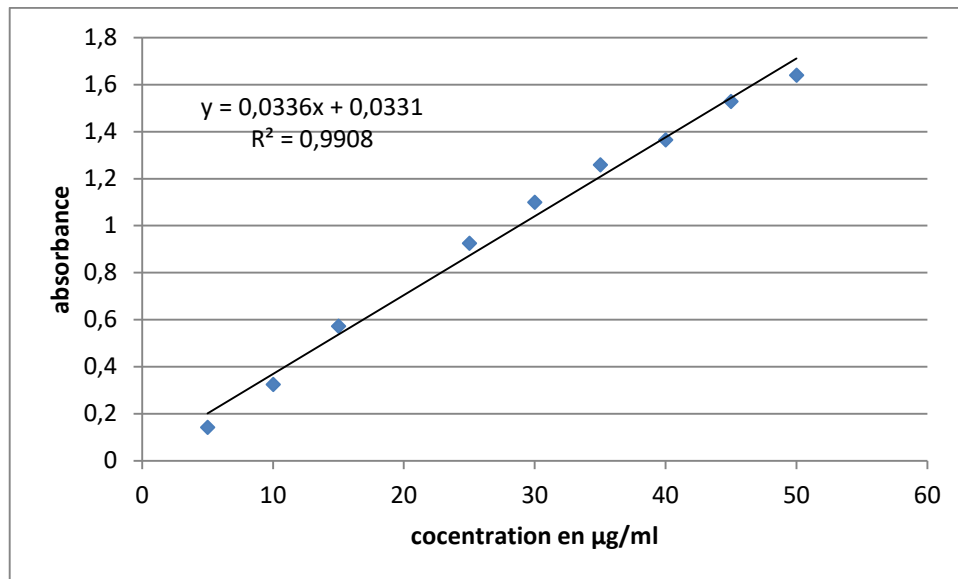


Figure 12 : Droite d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

La quantité des Flavonoïdes totaux dans l'extrait hydro-éthanolique et hydro-acétonique et ces différentes fractions est exprimée en microgramme équivalent quercétine par 1 mg d'extrait.

Les Résultats obtenus sont présentés dans la **figure13**

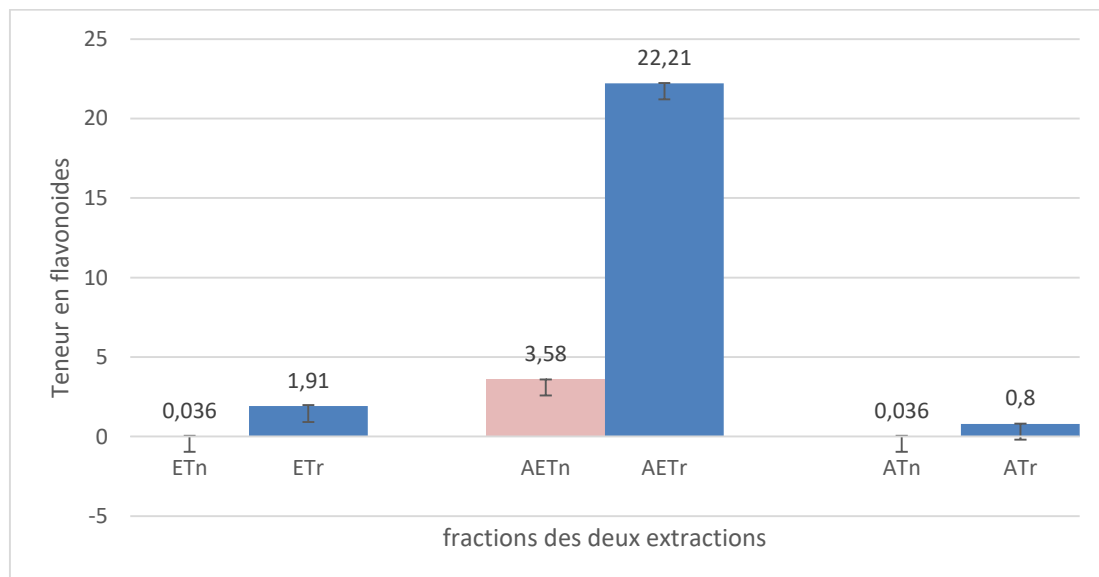


Figure 13 : Dosage des flavonoïdes totaux pour les fractions des deux extractions

Les résultats de la figure 13 montrent que la fraction AETr est la plus riche en flavonoïdes totaux et contient un teneur $22.21 \pm 0.01 \mu\text{g EQ/mg ES}$, alors que l'AETn est de $3.58 \pm 0.03 \mu\text{g}$

EQ/mg ES. Suivie par la fraction Etr avec 1.91 ± 0.034 μg EQ/mg ES, alors que la fraction Etn contient un teneur de 0.036 ± 0.012 μg EQ/mg ES et puis la fraction Atr avec 0.80 ± 0.001 μg EQ/mg ES et 0.03 ± 0.006 μg EQ/mg ES pour le Atn.

D'après les résultats statistiques ($P < 0.05$), ces résultats montrent que il y a une différence significatif entre tous les fractions des deux extractions. et que les fractions d'extraits acétonique est plus significative que l'extrait éthanolique.

La fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait acétonique est significativement supérieur à celle de l'extrait hydro-éthanolique, ainsi pour la fraction d'éther de pétrole de l'extrait hydro-éthanolique est significativement supérieur a celle de l'extrait hydro-éthanolique, aussi pour la fraction aqueuse de l'extrait hydro-éthanolique qu'est plus significatif que celle de l'extrait hydro-acétonique

Selon Kebeiche et *al.*, (2011) le résultats d'espèce *Ranunculus repens* du même genre fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique est $160 \pm$ μg EQ/mg ES, alors que nous avons 22.21 ± 0.01 μg EQ/mg ES pour l'extrait éthanolique et 3.58 ± 0.03 μg EQ/mg ES pour l'extrait acétonique, et la fraction aqueuse de l'extrait méthanolique avec $25 \pm$ mg EQ/g ES alors que nous avons trouvés 0.80 ± 0.001 μg EQ/mg ES et 0.03 ± 0.006 μg EQ/mg ES pour les deux extractions respectivement.

1.3.3. Dosage des tannins condensés

La quantification des tanins a été effectuée par une méthode adaptée par Zhang et *al.*, (2008). Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant de la catéchine comme contrôle positif dont la concentration (10 à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les résultats sont exprimés en microgramme (μg) équivalent de la catéchine par milligramme d'extrait (μg EC/mg E).

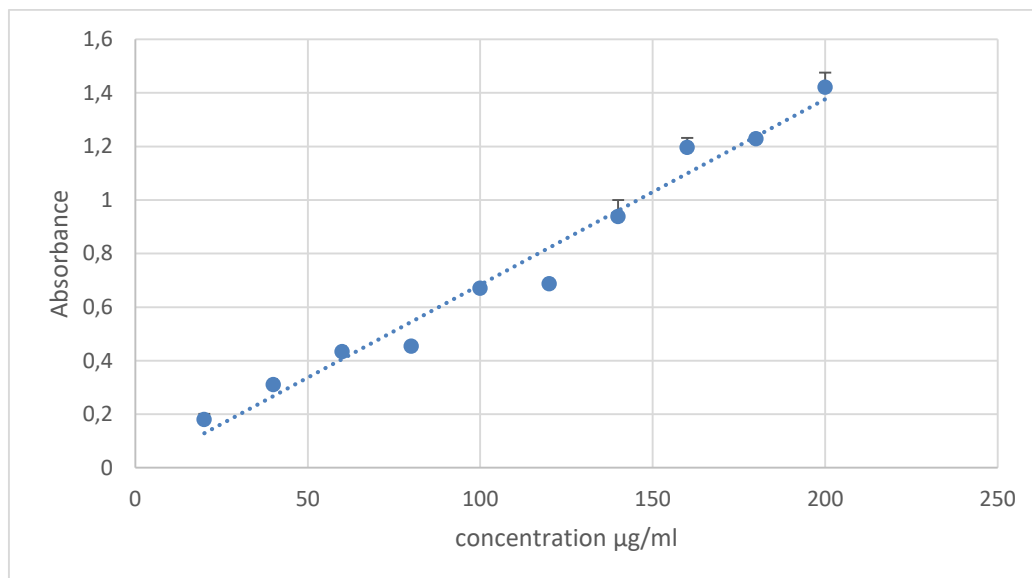


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la catéchine

La quantité des tannins condensés dans l'extrait hydro-ethanolique et hydro-acétonique et ces différentes fractions est exprimée en microgramme équivalent catéchine par 1 mg d'extrait sec.

Les Résultats obtenus sont présentés dans la **figure15**

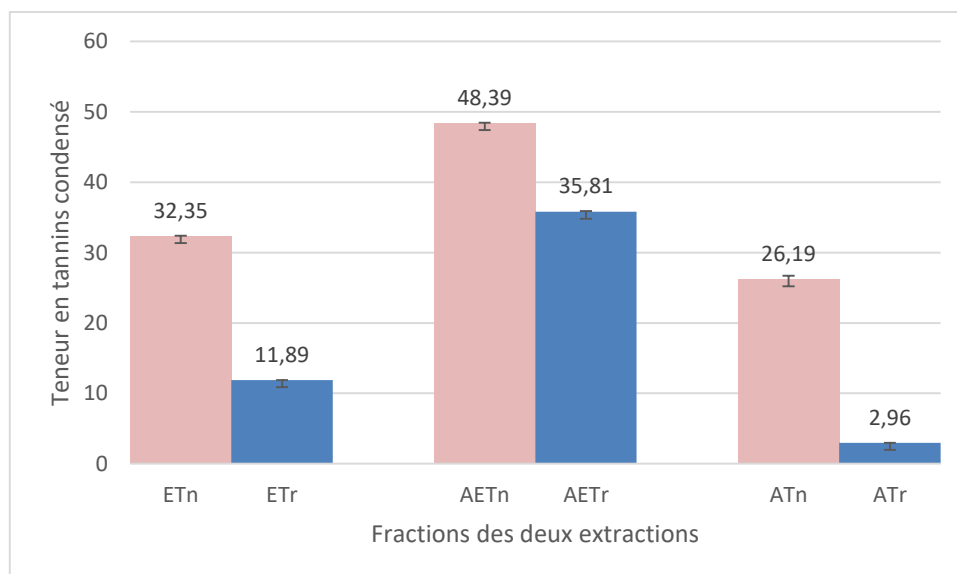


Figure 15 : dosages des tanins condensés des fractions des deux extractions

Les résultats de la **figure 15** montrent que la fraction la plus riche en tannins condensés est celle de AETn avec une teneur de 48.39 ± 0.04 µg EQ/mg ES, alors que AETr avec 35.81 ± 0.16 µg EQ/mg ES, suivie par la fraction ETn avec 32.35 ± 0.04 µg EQ/mg ES, alors que la fraction Etr contient un teneur de 11.89 ± 0.01 µg EQ/mg ES, la fraction ATn avec 26.19 ± 0.05 µg EQ/mg ES, et par le plus faible teneur est celle de la fraction Atr avec 2.96 ± 0.005 µg EQ/mg ES.

D'après les résultats de l'étude statistique ($P < 0.05$), ils montrent qu'il y a une différence significative entre tous les fractions des deux extractions. Et que les fractions de l'extrait acétonique est plus significative que l'extrait ethanolique.

La fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait hydro-acétonique est significativement supérieur à celle de l'extrait hydro-éthanolique, aussi pour la fraction d'éther de petrol de l'extrait hydro-acétonique elle est significativement supérieur à celle de l'autre extraction, même chose pour la fraction aqueuse d'extrait hydro-acétonique qu'est significativement supérieur que la deuxième extraction.

1.3.4 Dosage des triterpènes

La détermination de la teneur en triterpène des différents extraits est estimée par la méthode de (Fan et He, 2006).

La teneur en tri terpène a été estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec une substance de référence, l'acide ursolique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en μg équivalent acide ursolique par mg d'extrait ($\mu\text{g EAU/mg}$ d'extrait). La courbe d'étalonnage suit une équation de type :

$$y = 0,0015x - 0,0769. \text{ Sachant que le coefficient de corrélation est : } R^2 = 0,979$$

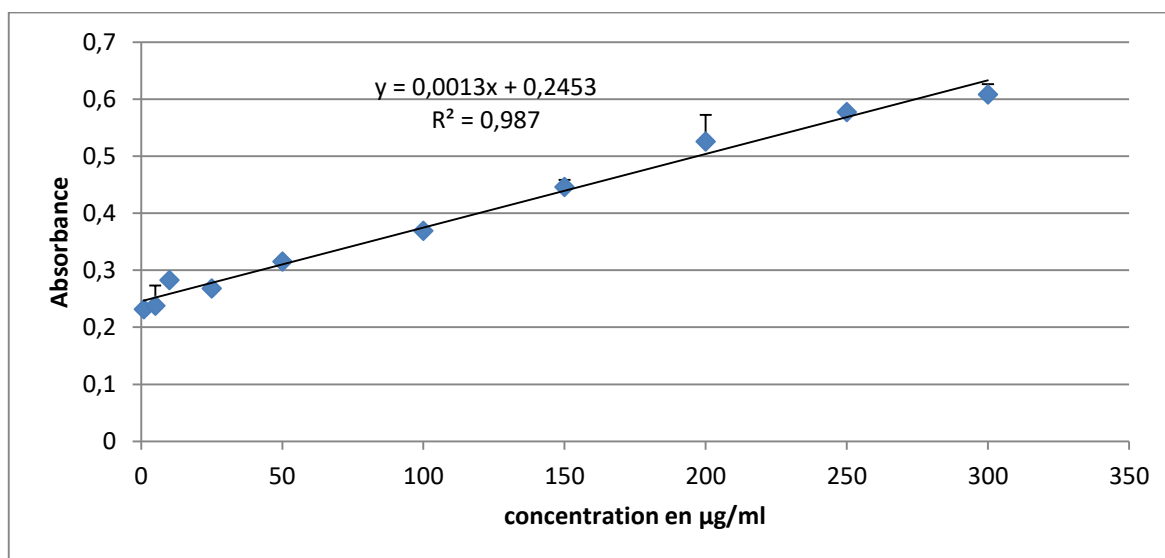


Figure 16 : Droite d'étalonnage de l'acide ursolique pour le dosage des Triterpènes

La quantité des Tri-terpènes a été rapportée en microgramme d'équivalent acide ursolique par milligramme de l'extrait ($\mu\text{g EAU/mg}$ d'extrait) Les résultats obtenus sont présentés dans la figure17.

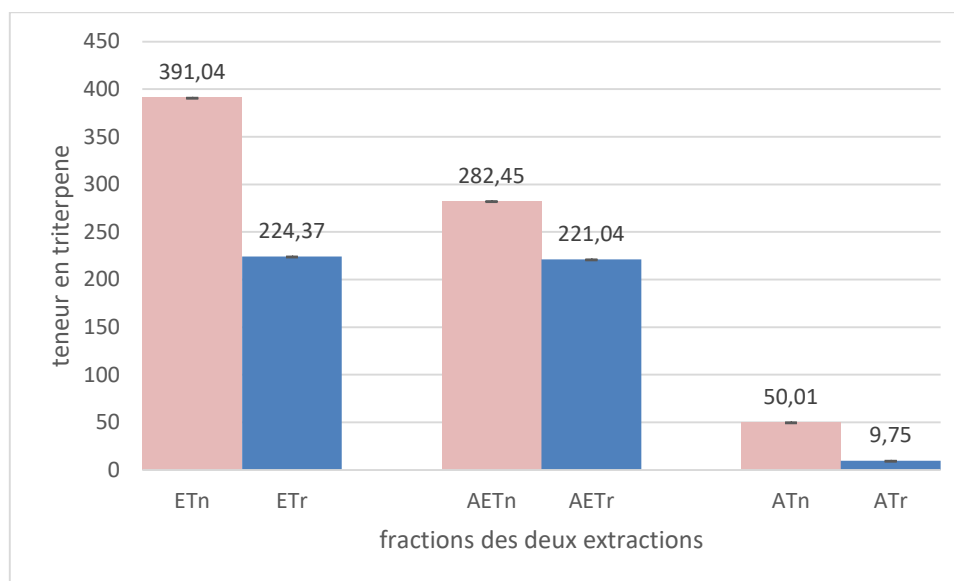


Figure 17 Teneur des extraits en Triterpènes en µg EAU/mg Extrait sec

Les résultats du **figure 17** montre que la fraction la plus riche en triterperes est celle de ETn avec un teneur de 391.04 ± 0.09 µg EAU/mg d'extrait sec, la même fraction pour la deuxième extraction ETr donne 224.37 ± 0.01 µg EAU/mg d'extrait sec, ensuite la fraction AETn avec un teneur de 282.45 ± 0.075 µg EAU/mg d'extrait sec, alors que la meme fraction de l'autre extrait donne 221.1 ± 0.009 µg EAU/mg d'extrait sec, enfin la fraction aqueuse des deux extraction qui donne respectivement 50.01 ± 0.75 µg EAU/mg d'extrait sec et 9.75 ± 0.02 µg EAU/mg d'extrait sec.

Les résultats précédents montrent que l'extraction avec l'acétone 70% donne un teneur plus que l'extraction avec l'éthanol 70%. Ces résultats ont été confirmés par les études de Makris et *al.*, (2007)

D'après l'étude statistique ($P < 0.05$), toutes les fractions de la première extraction sont significativement supérieures à celle de la deuxième extraction.

2. Evaluation de l'activité antioxydante

2.1. Test de pouvoir réducteur

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir réducteur de différentes fractions augmente en fonction de la concentration. Ces résultats sont représentés dans **la figure 18**

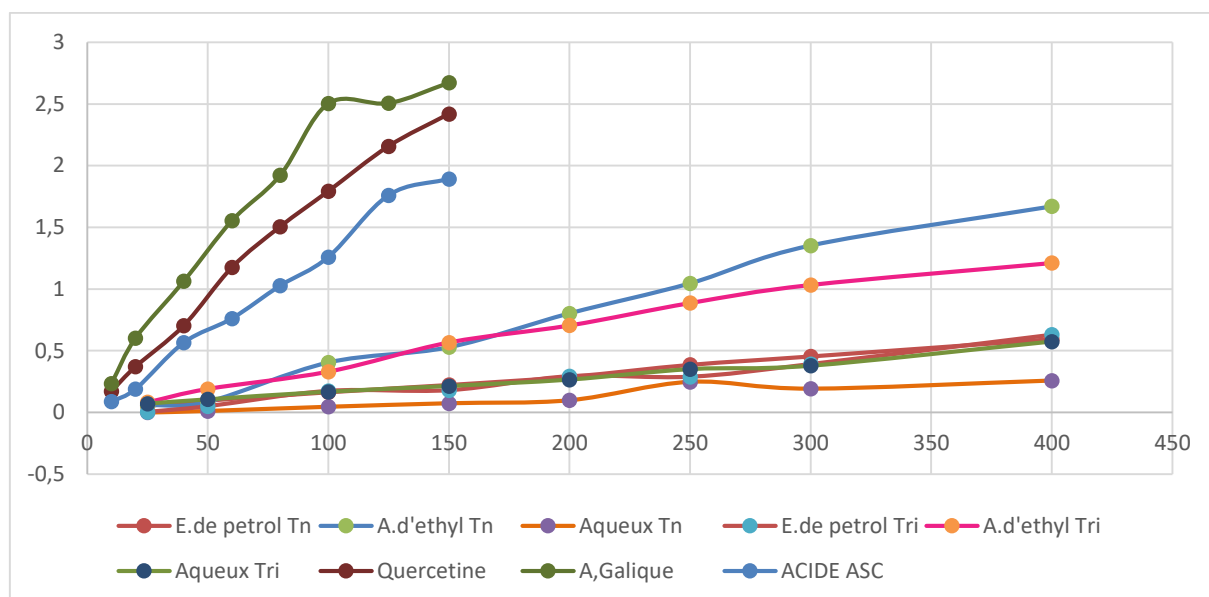


Figure 18 : Pouvoir réducteur de différentes fractions des deux extractions et ces standards

La figure montre que les fractions de l'acétate d'éthyle des deux extractions donnent un pouvoir réducteur important, l'acétate d'éthyle de l'extrait hydro-acétonique avec $593.33 \pm 0.1 \mu\text{g EvitC/mg ES}$, alors que la fraction d'acétate d'éthyl de l'extrait hydro-éthanolique avec $246.2 \pm 0.06 \mu\text{g EvitC/mg ES}$, enregistrée à la concentration $150 \mu\text{g/ml}$.

La fraction suivante est celle de l'éther de petrol de l'extrait hydro-acétonique avec $250 \pm 0.03 \mu\text{g EvitC}$, alors que pour l'autre extraction $246 \pm 0.06 \mu\text{g EvitC/mg ES}$, la fraction aqueuse montre un faible pouvoir réducteur avec $114.1 \pm 0.01 \mu\text{g EvitC /mg ES}$ pour l'extrait hydro-acétonique et $236.7 \pm 0.06 \mu\text{g EvitC/mg ES}$ pour l'extrait hydro-ethanolique .

D'après l'étude statistique ($P < 0.05$), ces résultats montrent que il y a une différence significatif entre les fractions des deux extractions. la fraction d'acétate d'éthyl de l'extrait acétonique est plus significative que l'acétate d'éthyl de l'éthanol, aussi pour les autres fractions.

Les résultats de la **figure 18** montrent que l'activité des fractions hydro-acétoniques est nettement supérieure à celle des extraits hydro-ethanolique.

Pour une meilleure comparaison on utilise la gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique **figure 19**

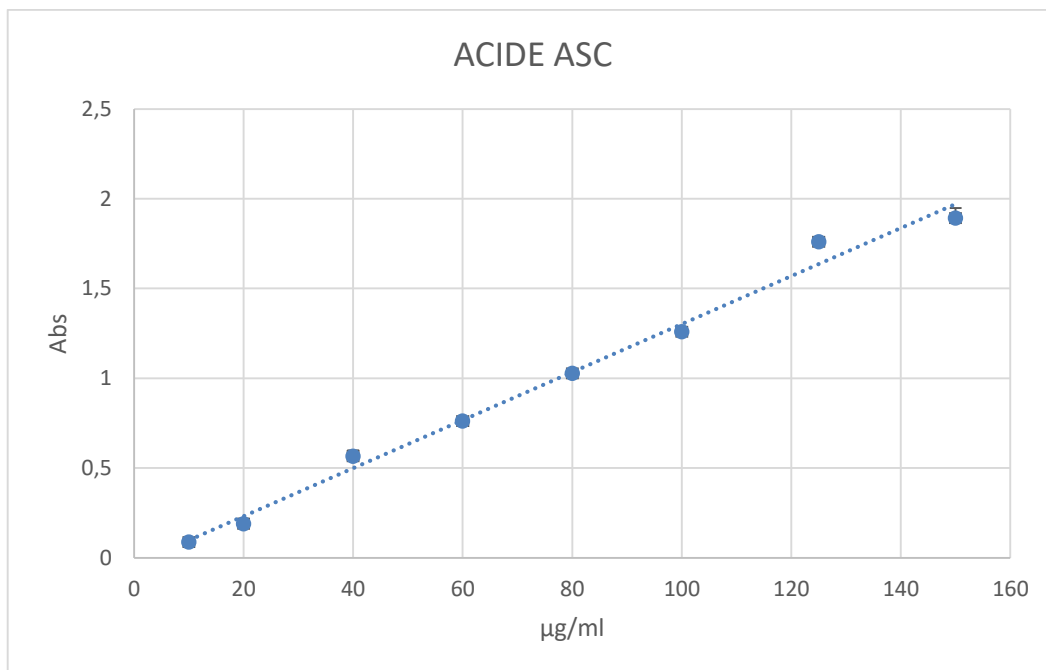


Figure 19 : Gamme d'étalonnage d'acide ascorbique

Le pouvoir réducteur de différentes fractions reste faible par rapport aux standards utilisés (acide gallique et la quercétine), qui ont donnés respectivement $1905.13 \pm 0.002 \mu\text{g EvitC/mg ES}$ et $2100 \pm 0.08 \mu\text{gEvitC/mg}$

Pour mieux comparer on entre nos fractions et les standards, on prend l'absorbance de chaque extrait et les standards à la concentration $100 \mu\text{g E Vit C /mg ES}$, les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes dans la **figure 20**.

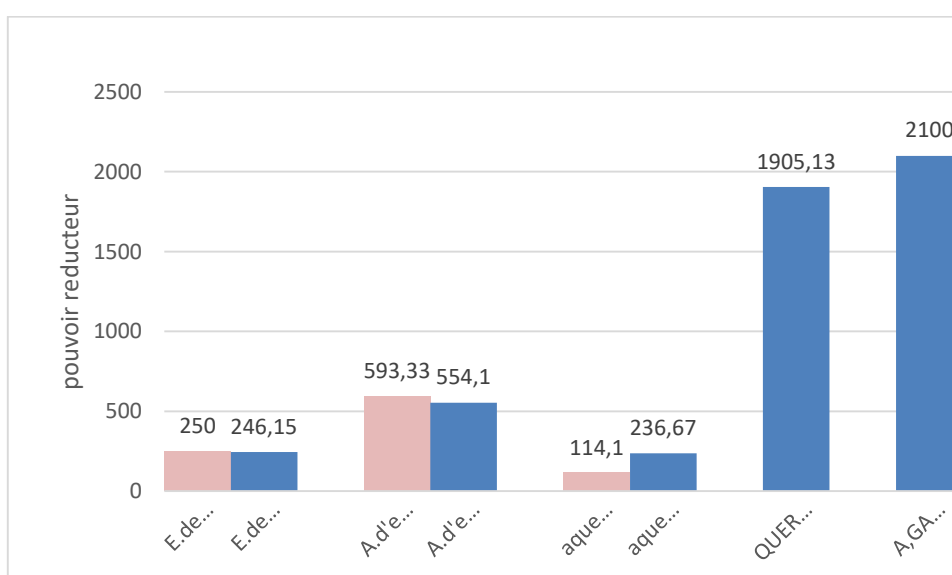


Figure 20 : Pouvoir réducteur des différentes fractions

Selon (Bourgou et *al.*, 2016), la nature du solvant utilisé affecte de façon significative l'activité antioxydante totale de l'extrait, avec la meilleure activité enregistrée au niveau de l'extrait à l'acétone 70% avec 27.51% et 17.31% pour l'éthanol 70%.

Trabelsi et *al.*, (2010) qui ont montré que l'acétone mixte avait une forte capacité antioxydante, l'acétone est plus polaire que l'éthanol, et avec l'ajout de l'eau sa polarité augmente.

Les mélanges acétone-eau sont les meilleurs solvants pour l'extraction des antioxydants polaires ; ils sont très utilisés pour l'extraction des matrices protéiques, car ils permettent la dissolution des complexes polyphénols-protéines (Al-Farasi et Lee, 2008).

2.2. Inhibition de radical cation ABTS+

L'estimation de cette activité anti-radicalaire est mesurée moyennement de Re et *al.*, (1999) , les résultats obtenu dans la figure montre que l'inhibition de radical cation ABTS+ augmente en fonction de concentration.

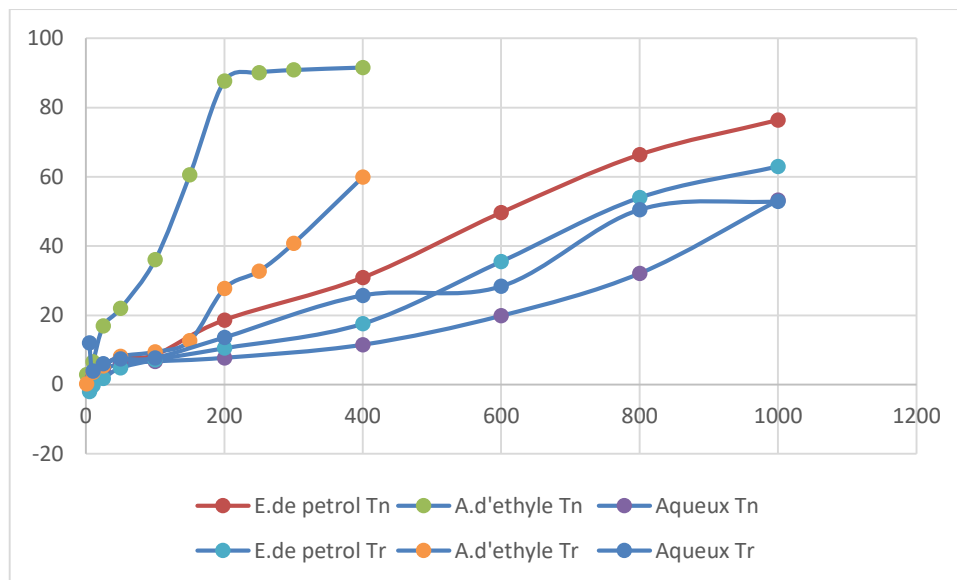


Figure 21 : Inhibition de radical libre ABTS+ en fonction de la concentration

Pour la comparaison on utilise 3 standards BHA, Quercitine, et BHT. Les résultats représente sous forme es courbe dans la figure 22.

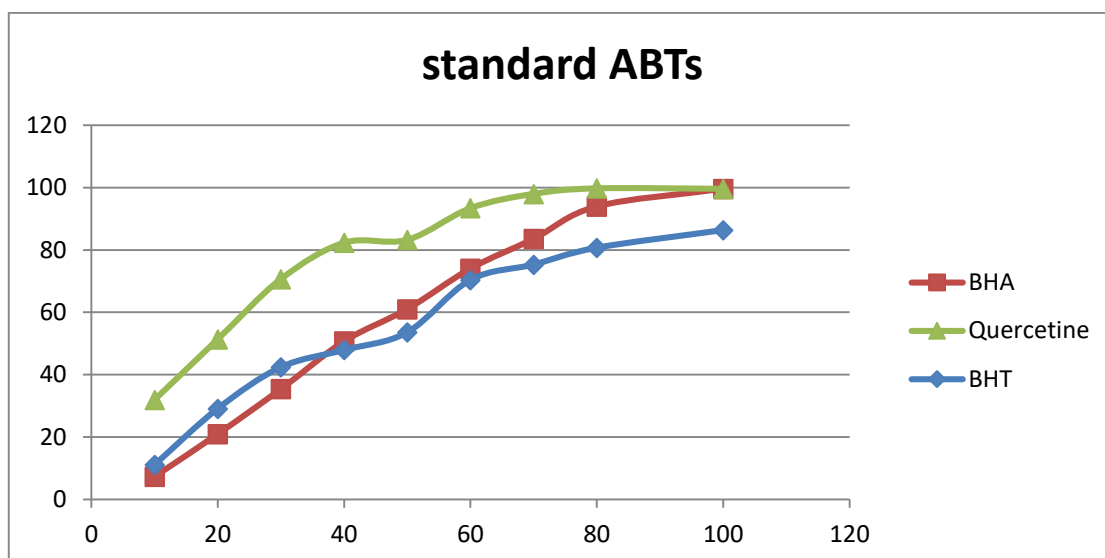


Figure 22 : Inhibition de radical libre ABTS+ en fonction des concentrations des standards

Pour une meilleure comparaison entre nos fractions d'extrait hydro-méthanolique ainsi que les standards utilisés, on a calculé les IC50 à partir des graphes précédents, Les IC50 obtenues sont présentées dans la figure 23.

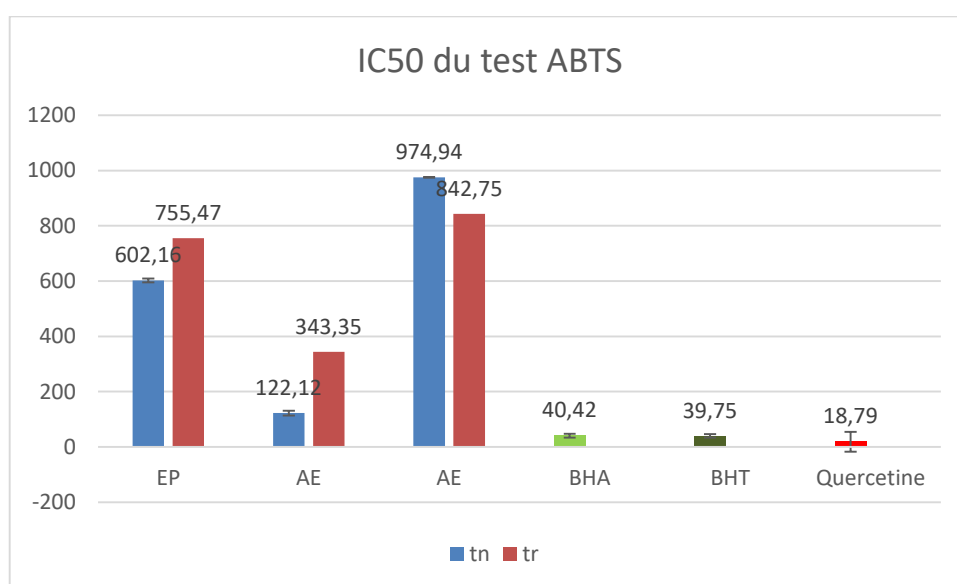


Figure 23 : IC 50 de différentes fractions et les standards effectués par le test ABTS+

Les résultats d'évaluation de l'activité antioxydant par le test d'inhibition de radical cation ABTS+ montre que la fraction de l'acétate d'éthyle de l'extrait hydro-acétonique est de $122.12 \pm 0,004 \mu\text{g Evit C/mgES}$, alors que la fraction d'acétate d'éthyle de l'extraits hydro-ethanolique est de $343.35 \pm 0.008 \mu\text{g Evit C/mg ES}$, puis la fraction d'ether de petrol d'extrait hydro-acétonique par $602.16 \pm 0.004 \mu\text{g EvitC/mg ES}$, alors que la fraction d'ether de petrol de

l'extrait hydro-ethanolique est de $755.75 \pm 0.01 \mu\text{gEvitC}/\text{mgES}$, en fin la fraction aqueuse de l'extrait hydro-ethanolique avec $842.75 \pm 0.007 \mu\text{gEvitC}/\text{mg ES}$, alors que celle de l'extrait hydro-acetonique est de $974.94 \pm 0.002 \mu\text{gEvitC}/\text{mg ES}$.

D'après l'étude statistique ($P < 0.05$), ces résultats montrent que il y a une différence significatif entre les fractions des deux extractions.

La fraction Etn est plus significative a celle de Etr, tandis pour AEtn est plus significative a celle de AEtr, aussi pour Atn qui est plus significative que Atr

Les résultats de la figure 22 montrent que l'activité des fractions acétoniques est nettement supérieure à celle des extraits hydro-ethanolique, car l'acetone est plus polaire que l'ethanol (acétoneavec un polarité de 5.4 et l'ethanol avec 5.2).

L'activité antioxydante des fractions reste faible par rapport aux standards utilisée.

2.3. Test de Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale (TAC) des fractions est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de Prioto et *al.* (1999). Les résultats sont obtenus en équivalent d'acide ascorbique, les concentrations ont été variées entre $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ jusqu'au $300 \mu\text{g}/\text{ml}$.

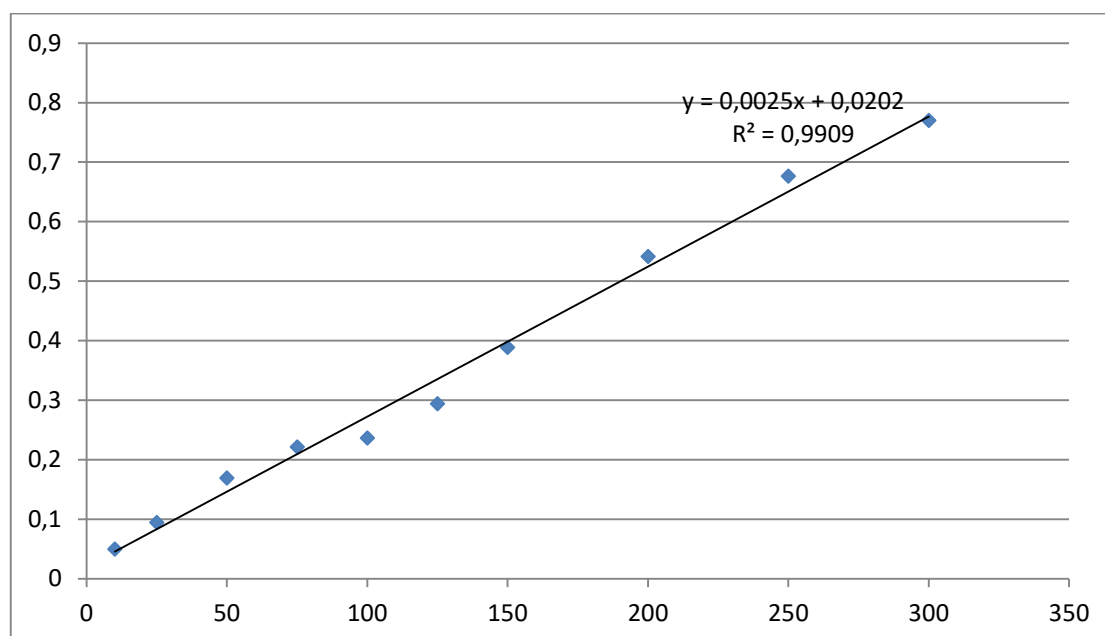


Figure 24 : Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test de la capacité antioxydante total.

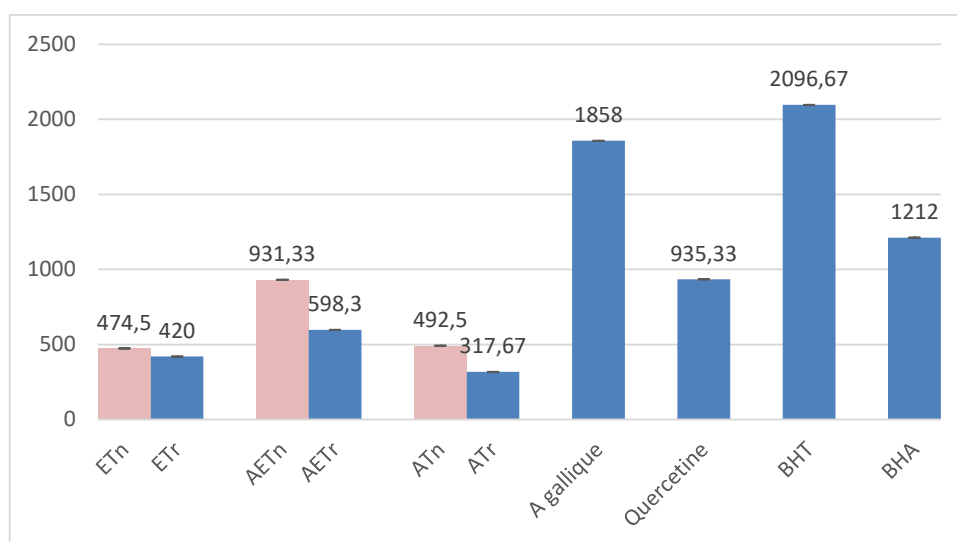


Figure 25: La capacité antioxydant de différentes fractions et de ces standards.

Les résultats de la figure précédente montre que les fractions de l'extrait hydro-acetonique présente une activité antioxydante supérieur à celle des fractions d'extrait hydro-ethanolique.

La fraction de AETn présente une activité antioxydante importante avec $931.33 \pm 0.01 \mu\text{g EAA/ES}$, alors que celle de AETr présente $598.3 \pm 0.003 \mu\text{g EAA/ES}$, la fraction ATn présente une capacité antioxydante égal à $474.5 \pm 0.15 \mu\text{g EAA/ES}$, tandis que 420 ± 0.01 pour la deuxième extraction, la fraction ATr avec $492.5 \pm 0.11 \mu\text{g EAA/ES}$ alors qu'elle présente $317.67 \pm 0.02 \mu\text{g EAA/ES}$ pour Atr.

Les études menées par Gulçin et *al.*, (2003) et Tepe et *al.*, (2005) indiquent que le solvant d'extraction a une influence sur l'activité antioxydante des extraits. car l'acetone est plus polaire que l'ethanol (acetone avec un polarité de 5.4 et l'ethanol avec 5.2).

Les mélanges acetone-eau sont les meilleurs solvants pour l'extraction des antioxydants polaires ; ils sont très utilisés pour l'extraction des matrices protéiques, car ils permettent la dissolution des complexes polyphénols-protéines (Al-Farasi et Lee, 2008).

La capacité antioxydante des fractions reste faible par rapport aux standards utilisés, a par la fraction d'acetate d'ethyl de l'extrait hydro-acetonique qu'est proche à celle de la quercetine mais reste faible par rapport aux autres standards.

Conclusion

Conclusion

Notre étude a été consacrée aux dosages de quelques antioxydants (polyphénols totaux, tannins condensés, flavonoïdes et les triterpènes) des parties souterraines de *Ranunculus sardous*, après leur extraction on les fractionne en utilisant plusieurs solvants.

Ainsi qu'à la détermination de l'activité antioxydante des extraits obtenus. Les teneurs en composés phénoliques totaux de *R.sardous* diffèrent selon le solvant d'extraction. Les extraits acétoniques (acétone 70%) montrent une activité élevée par rapport aux celles de l'extrait éthanolique(70%).

Les extraits acétoniques présentent un pouvoir réducteur supérieur à celui des extraits éthanolique .

L'extraction avec l'acétone 70% a donné un meilleur teneur par rapport a l'utilisation de l'éthanol 70%.

Pour ouvrir les perspectives à notre travail on suggère d'étudier l'effet de temps d'extraction ainsi la méthode d'extraction et la température sur le rendement d'extraction mais aussi sur l'activité antioxydante.

Références bibliographique

Références bibliographique

-A-

Al-Farasi M.A et Lee C.Y. 2008. Optimization o phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. Food Chemistry. 108 : 977-985.

Aslam Shahzad M., Bashir Choudhary A., M Uzair , Subhan Ijaz A.2012. The Genus *Ranunculus*: A Phytochemical and Ethnopharmacological Review, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Issn- 0975-1491 Vol 4.p.5

Atawodi S. E. 2005. Antioxidant potential of African plants.African J. of Biotec.4 (2): 128- 133..

-B-

Bahorun T., 1997. Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritus. pp. 83-94.

Baladehi Mohammadhadi Heidary., Meisam Habibi ., Dina Azizian.2013. Pollen morphology of Iranian species of Anemone L. & Pulsatilla Mill. (Ranunculaceae) and its implications, Acta Botanica Gallica: Botany Letters, Vol. 160. No. 1. pp. 19–26.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry . pp.191-203

Baoshan Sun., Jorge M. Ricardo-da-Silvaand Isabel Spranger. 1998. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. J. Agric. Food Chem. Pp.4267–4274.

Babar Ali M., Hahn E.J., Pak K.Y .2007.Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. Molécules. 12: 607-621.

Belaïch R ., Boujraf S. 2016. Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez l'eshémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des maladies Métaboliques* 10(1) :38-42

Bidié AP., N'guessan BB., Yapo AF., Yapo AF., N'guessan JD et Djaman AJ. 2011. Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature* 8(1): 1-11

Boubkri C. 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat en sciences, Université Mohamed Khider – Biskra, Alger, 158 p.

Bourgou S ., Serairi Beji R ., Medini F ., Ksouri R . 2016. Effet des solvants et de méthode d'extraction sur la teneur en composé phénoliques et les potentialités anioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of new sciences*, vol 28(12), pp :1650-1654.

BRUNETON, J. 1999. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. *Edition Technique et documentation*, p233

-C-

Chanforan, C. 2010. Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : Etudes en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université d'avignon et des pays de vaucluse.

Chevallier A . 1860. Chimie médicale de pharmacie, de toxicologie, paris, libraire de la faculté de médecine

Cillard J.P. 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *O C L-journal. org* 13(1) : 24-29

Cristol JP., Canaud B., Morena M., Martin-Mateo M. 2002. Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie* 23 (5) :201-208

-D-

Dai, J. & Mumper., R. J. 2010. Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propreties. *Molecules* **15**(10)13-22.

Descamps E., Gelé P., Bordet R., Vamecq J. 2006. Modulation pharmacologique du stress oxydatif .La Lettre du Pharmacologue 20(4) :107-118

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compound. *Food Chemistry* . pp. 654-660

Druynska B., Stepniewska A., et Wolosiak R., 2007. The influence of time and type of solvent on Efficiency of the extraction of polyphenols From green tea and antioxidant properties Obtained extracts. *ACTA Scientiarum Polonorum Technology Alimentation.* 6(1) : 27-36.

Durand D., Damon M., Gobert M. 2013. Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux *Cahiers de nutrition et de diététique* . pp. 218-224

-E-

Elvira HoRandl ., Ovidiu Paun ., Jan T. Johansson ., Carlos Lehnebach Tristan Armstrong ., Lixue Chen ., Peter Lockhart.2005. Phylogenetic relationships and evolutionary traits in *Ranunculus s.l.* (Ranunculaceae) inferred from ITS sequence analysis, *Molecular Phylogenetics and Evolution.* pp 305–327.

-F-

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C .2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* 331: 372-379

Favier A. 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique. Pp.108-111

Favier A .2006. Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr. Mémoire d'activité antioxydante et antimicrobienne d'extrait de *Rhamnus alaternus* L.p 65 :390-396.

Fontaine E. 2007. Radicaux libre et vieillissement. Cahiers de Nutrition et de Diurétique 42(2) :110-115.

Fraga C. G. 2009. Plant phenolics and human health : Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. *John Wiley & Sons Edition*, pp 5-13.

-G-

Galeotti .F., Barille .E., Curir .P., Dolci .M., and Lanzotti V. 2008. Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry letters*. 1: 44-48

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore J. 2003. Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. L'actualité chimique.pp.91-96

Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3(4), 162-169.

Gomez Caravaca A.M., Gomez Romero M ., Arraez Roman d ., Segura Carretero A., Fernandez Gutierrez A .2006. Advances in the analysis of phenolic compound in Products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1220-1234.

Gülçin I., Oktay M., Kireççi E. et Küfrevioğlu Ö.I. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*. 83(3): 371-382.

-H-

Hachelaf A., Zellagui A., Touil A and Rhouati S .2013.chemical composition and analysis antifungal properties of *ranunculus arvensis* L, Pharmacophore, An International Research Journal, 4 (3) : 89-91

Hagerman A E, Butler L G 1991 Tannins and Lignins. In: Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites (2nd edn), ed Rosenthal G A & Berenbaum M R. Academic Press Inc, New York, USA. pp. 355-388.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne JO., Charlier C., Chapelle JP. 2007. Le stress oxydant. Rev Med Liege 62 (10) : 628-638.

Holm L., Doll J., Holm E., Pancho J. H. 1997. World weeds – Natural Histories and description. *John Wiley and sons, Inc.* Toronto. Canada.pp.58-87.

Hoffmann, D. 2003. Medical Herbalism : The Science and Practice of Herbal Medicine. Edition Inner Traditions / Bear & Co., p 90.

Hoffmann., L. 2003. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I.

=J=-

Isornez G .2007. Contribution à la chimie des flavonoïdes : Accès à des analogues de pigments des vins rouges Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur De Strasbourg Ecole Doctorale De Chimie. p5

=J=-

Jean J., Anni F., Christian A .2005. Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.Presses polytechniques et universitaire romande de lausanne. Pp.1-13.

Jean M. (1806). Historique des plantes d'Europe et étrangères, les plus communes, les plus utilisées et les plus curieuses, éléments de botanique pratique TOME SECOND. a Lyon. 1.p 135.

J. P. Fan and C. H. He.(2006) "Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, no. 3, 950–956.

-K-

Kahkonen MP., Hopia AI., Vuorela HJ., Rauha J-P., Pihlaja K., Kujala TS., Heinonen M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47(10) :3954-3962.

Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94(4):550-557

Kebieche M., 2009. Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de Doctorat , Biochimie, université Mentouri, Constantine ,143p.

Kebièche M., Lakroun Z ., Mraïhi Z., Soulimani R .2011. Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens L*. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique, dans France, *Pharmacognosie*, 9 pp 274-282.

Keskes H., Mnafigui K., Hamden K., Damak M., ElFeki A., Allouche N 2014. « *In vitro* anti-diabetic, anti-obesity and antioxidant properties of *Juniperus phoenicea L*. Leaves from Tunisia », *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, (Suppl 2): p 649-655.

Koehlin-Ramonatxo C. 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme* 20 ,165-177.

-L-

Lee K.W., Kim Y., Lee H.J et Lee C.Y., 2003. Cocoa Has More PHENOLIC Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 51:7292-7295.

Leverve X. 2009. Stress oxydant et antioxydants ? Oxidative, stress and antioxidants?. *Cahiers de nutrition et de diététique* 44, 219-224.

Lynn E and Waldren S. 2000. Variation in life history characteristics between clones of *Ranunculus repens* grown in experimental garden conditions. Ireland. p 422

Lu ZM, Gong JS, He Z, Xu HY, Dou WF, Shi JS, et al. Optimization of extraction of total triterpenoids from submergedly cultured *Antrodia camphorata* using response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* 2011 ; 23:946–51

Lutge U., Kluge M., Bauer G. 2002. *Botanique 3ème Ed : Technique et documentation*. Lavoisier .Paris. 211p.

-M-

Macheix J-J., Fleuriet A., Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, presses polytechnique et universitaires romandes, Italie. p 2-3-12-13-14.

Makris D. P., Boskoub G. et Andrikopoulos N. K. 2007. Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts . *Journal of Food Composition and Analysis*. 20 :125-132.

Manallah A. 2012. Activités Antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Mémoire de magistère, Université Ferhat Abba-Stif-Alger, 85p

Martinez-Cayuella M. 1995. Oxygène free radicals and human diseases. *Biochimie* 77 ,147-161

Mbaebie B, Edeoga H, Afolayan A (2012) Phytochemical analysis and antioxidant activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pac J Trop Biomed* 2:118–24

-N-

Nacz M. et Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography .1054: 95-111.

-O-

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr. 44, 307–315.

-P-

Pastre J O C. 2005. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse ,116 p.

Phaniendra A., Jestadi DB., Periyasamy L. 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 30(1): 11-26.

Pietta PG. 2000. Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products 63(7) : 1035-1042.

Prieto. P., Pineda. M., Aguilar, M: Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 1999; 269:337–341.

-R-

Radford Harry E., Ahles C., Ritchie Bell.1968. Manual of the Vascular Flora of the Carolinas,library of congress catalog card N°68,p 28 26 62 64.

Rahman K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical Interventions in Aging 2(2): 219-223.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggebnte, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Sci. Inc.* 26, 1231–1237.

-S-

Siddhuraju P et Becker K. 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*. 101(1), 10-19.

Singleton VL, Ross JA .1956. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic* 16:144–58

Spichiger R.E.2002. Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tropicales. PPUR presses polytechniques.

-I-

Tapas A. R., Sakarkar D. M. ., Kakde, R. B. 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. Et Polissiou M. 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*. 90 :333–340.

Teugwa M., Sonfack D., Fokom R., Penlap B., Amvam Z .2013. *Journal of Medicinal Plants Research ; Full Length Research Paper*, Antifungal and antioxidant activity of crude extracts of three medicinal plants from Cameroon pharmacopeia.

Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgo S., Hajlaoui H.

, Abdelly C .2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Sci Tech* 43: 632-639.

Talbi H., Boumaza A., El-mostafa K., Talbi J., Hilali A. 2015. Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical

composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater. Environ. Sci* 6(4) :1111-1117

-W-

Waksmundzka-Hajnos., M. & Sherma, J. 2011. Waksmundzka-Hajnos, M. & Sherma, J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical ience. *Chromatographic Science Series*, 477-478.

-Z-

Zhang, H.B., Wen, J.K., Wang, Y.Y., Zheng, B. and Han, M. 2009. Flavonoids from *Inula britannica* L. inhibit injury-induced neointimal formation by suppressing oxidative-stress generation. *J. Ethnopharmacol.* 126, 176–183.

الهدف من دراستنا هو دراسة تأثير المذيب على مختلف المعايير المدروسة كالمردود العام و كذا النشاط مضاد الاكسدة لمستخلصات نبات *R.sardous* بواسطة ثلاث اختبارات (FRAP, ABTS, TAC) .

تدل النتائج على ان المستخلص الغني من حيث الميتابوليات الثانوية هو اسيتات الاثيل لمستخلص الاستون، بقيمة $337.98 \pm 0.02 \mu\text{g EAG/mg ES}$ للبوليفينولات $48.39 \pm 0.04 \mu\text{g EAG/mg ES}$ بالنسبة للتانويدات، $0.09 \pm 391.04 \mu\text{g}$ و بنسبة ضعيفة للفلافونات ب 3.58 بالمقارنة مع مستخلصات الايثانول .

بالنسبة لتقييم نشاط مضاد الاكسدة فان النتائج متوافقة حيث ان مستخلص اسيتات الاثيل يمثل الأقوى بالنسبة الى جميع الاختبارات 59.33 ± 0.1 للFRAP, 593 ± 0.004 لل ABTS و 931.33 ± 0.01 لل TAC,

هذه النتائج تؤكد ان استعمال الاستون 70% كمذيب يعطي مردود أحسن من استعمال الايثانول 70%.

الكلمات المفتاحية : *Ranunculus sardous* مضاد الاكسدة ,الاسيتون ,الايثانول ,بوليفينولات ,الفلافونات ,التانويدات ,*ABTS,FRAP,TAC*

Le but de notre de notre étude est de déterminer l'effet des solvants sur le rendement ainsi que sur l'activité antioxydante de *Ranunculus sardous* en utilisant trois tests (ABTS, FRAP, TAC)

La fraction la plus active est celle de l'acétate d'éthyle de l'extrait hydro-acétonique, elle est riche en métabolites secondaires, $337.98 \pm 0.02 \mu\text{g EAG/mg ES}$ pour les polyphénols , 48.39 ± 0.04 pour les tannins condensés, 391.04 ± 0.09 pour les triterpènes, alors qu'elle présente une faible teneur en flavonoïdes par 3.58 ± 0.03 par rapport au extrait hydro-éthanolique, pour les tests antioxydants la fraction la plus active est celle de l'acétate d'éthyle de l'extrait hydro-acétonique, 593 ± 0.004 pour le FRAP, le test ABTS a confirmé le résultats de FRAP avec 59.33 ± 0.1 , et enfin le TAC par 931.33 ± 0.01 .

Ces résultats nous permettons de conclure que l'extraction avec l'acétone 70% donne un meilleur rendement que l'éthanol 70%

Mots clés : *Ranunculus sardous*, activité antioxydante, hydro-acétonique, hydro-éthanolique, polyphenols, flavonoides, tannins cndensés, triterpenes, ABTS, FRAP, TAC

The aim of our study is to study the effect of solvents on the yield as well as on the antioxidant activity of *Ranunculus sardous* using three tests (ABTS, FRAP, TAC)

The most active fraction is that of ethyl acetate of hydroacetone extract, it is rich in secondary metabolites, $337.98 \pm 0.02 \mu\text{g EAG/mg ES}$ for polyphenols , 48.39 ± 0.04 for condensed tannins, 391.04 ± 0.09 for triterpenes, while it has a low flavonoid content by 3.58 ± 0.03 with respect to hydroethanolic extract, for antioxidant tests the most active fraction is that of ethyl acetate of hydroacetonic extract, 59.33 ± 0.1 for FRAP, the ABTS test confirmed the results of FRAP with an IC_{50} 50.47 ± 0.004 , and finally the TAC with 931.33 ± 0.01 .

These results allow us to conclude that extraction with acetone 70% gives better yield than ehanol 70%.

Key words : *Ranunculus sardous*, antioxydant activity, hydroacetonic, hydroethanolic, polyphenols, flavonoid, triterpenes, condensed tannins, ABTS, FRAP, TAC