



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1 1
Université des Frères Mentouri Constantine 1

كلية علوم الطبيعة و الحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biochimie et Biologie cellulaire et Moléculaire
قسم : الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master 2
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Alimentaires
Spécialité : Biochimie de la Nutrition

Intitulé :

Evaluation des activités biologiques des extraits éthanoliques de : *Ranunculus bullatus*

Présenté par : *FAS Lamis*

HADJI Nesrine

Jury d'évaluation :

Président du jury : *MOUAS T. Nardjes* (MCA – UFM Constantine 1).

Rapporteur : *LEMOUI Redouane* (MCB – ENS Constantine 3).

Examineur : *NADJI Wassila* (MCB – ENSB Constantine 3).

*L'année universitaire
2019/2020*

Remerciement

*Avant toute chose, nous remercions **ALLAH**,
Le tout puissant, pour nous avoir orienté vers le droit chemin,
pour nous avoir aidé tout au long de nos années d'étude, ainsi
pour nous avoir donné la force, la volonté et la patience dans
l'accomplissement de ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre
encadreur **Mr R. LEMOUI** pour avoir accepté de diriger ce
travail, pour son soutien, sa clairvoyance, ses nombreux conseils
et pour nous avoir donné l'opportunité de nous former en
phytochimie.*

*Nos vifs remerciements vont également à **Dr T.N MOUAS**,
présidente du jury, pour son soutien moral, son aide et sa
confiance.*

*Nous tenons à manifester notre profonde reconnaissance à **Mme
W. NADJI** pour avoir accepté d'examiner notre mémoire, à **Dr C.
Benssuici**, MCB, notre directeur de stage au laboratoire 02 de
Biochimie au Centre National de Recherche en Biotechnologie de
nous avoir accueillis dans son équipe. À tous nos enseignants de
la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et du
département de Biochimie et Biologie Moléculaire, de
l'Université des Frères Mentouri Constantine1.*

*En fin, un grand Merci à tous ceux qui ont contribué d'une
façon ou d'une autre, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce
modeste travail.*

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail :

*À mon très cher frère Redouane,
pour tout ce qu'il a fait pour moi.*

*À mes chers parents, ma mère Aïsha et mon père Ali
Pour leur confiance, patience, amour inconditionnel. Leur soutien et
leurs encouragements.*

*À ma grand-mère, à mes sœurs Dounia Zed, Nour El Houda et
Kamer Ezzamane, mes chères tantes Sarah et Naassa.*

*À toute ma famille et à mes amis tout particulièrement Reyan. À
mes meilleures Kaouther, Rayenne et Zina qui n'ont pas cessés de me
conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que dieu
les garde, les protège et leurs offre le bonheur.*

*À mon cher binôme et ma meilleure amie Lamis pour son soutien
moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.*

Une forte dédicace pour MOI-MEME

*Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen,
du secondaire ou de l'enseignement supérieur.*

Un amour spécial pour mon neveu Med Dhiyae Eddine

Hadji Nesrine ♥

Dédicace

*Avec l'aide d'ALLAH ♥; le tout puissant; ce travail est achevé;
Je le dédie...*

A ma très chère mère

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point te remercier
comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et
ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour
affronter les différents obstacles.*

A mon très cher père

*Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que
ce travail traduise ma gratitude et mon affection.*

*A mes très chers frères Oussama et Hicham et ma chère sœur
Hanine,*

Puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage et surtout réussite.

*A toute ma famille que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux
tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible, merci d'être
toujours là pour moi.*

*Et à mon très cher binôme pour leur encouragement et leur soutien
moral*

A moi-même

Fas Lamis ♥

TABLE DES MATIERES

Titre.....	
Remerciement.....	
Dédicace.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations	
INTRODUCTION GENERALE	<u>1</u>

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Généralités et données bibliographiques

I. Etude de la plante.....	<u>3</u>
I.1. Famille de Ranunculacea.....	<u>3</u>
I.1.1. Présentation de la famille.....	<u>3</u>
I.1.2. Position systématique de la famille Ranunculacea.....	<u>3</u>
I.1.3. Caractères botaniques de la famille Ranunculacea.....	<u>5</u>
I.1.4. L'intérêt pharmacologique.....	<u>6</u>
I.2. Genre <i>Ranunculus</i>	<u>7</u>
I.2.1. Présentation du genre.....	<u>7</u>
I.3. L'espèce <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>8</u>
I.3.1. Classification taxonomique.....	<u>8</u>
I.3.2. Description morphologique.....	<u>8</u>
I.3.3. Localisation et répartition géographique.....	<u>9</u>

Chapitre II : Rappels théoriques sur les métabolites secondaires

I. Introduction	<u>10</u>
II. Définition et fonctions des métabolites secondaires.....	<u>10</u>
III. Biosynthèse des substances naturelles.....	<u>10</u>
IV. Classification des métabolites secondaires.....	<u>11</u>
IV.1. Composés phénoliques.....	<u>12</u>
IV.1.1. Définition et Localisation.....	<u>12</u>
IV.1.2. Rôle et intérêt.....	<u>12</u>
IV.1.3. Principales classes.....	<u>13</u>
1) Les flavonoïdes.....	<u>13</u>
2) Les coumarines.....	<u>16</u>
IV.2. Les alcaloïdes.....	<u>19</u>

a. Les alcaloïdes vrais.....	<u>19</u>
b. Les pseudo-alcaloïdes.....	<u>20</u>
c. Les proto-alcaloïdes.....	<u>20</u>
IV.3. Les terpènes.....	<u>22</u>

Chapitre III : Rappels théoriques sur les activités biologiques

I. Introduction.....	<u>24</u>
II. Activité anti-oxydante.....	<u>24</u>
II.1. Stress oxydant.....	<u>24</u>
II.2. Les radicaux libres	<u>25</u>
II.3. Antioxydants.....	<u>26</u>
II.3.1. Principe des antioxydants.....	<u>26</u>
II.3.2. Les différents types et sources d'antioxydants	<u>27</u>
II.3.3. Caractéristiques d'antioxydants.....	<u>29</u>
II.3.4. Antioxydants et système de défense.....	<u>29</u>
II.3.5. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes <i>in vitro</i>	<u>30</u>
a. Le DPPH.....	<u>30</u>
b. Test ABTS.....	<u>31</u>
c. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)...	<u>32</u>
d. Test du Pouvoir réducteur.....	<u>33</u>
III. Activité enzymatique	<u>34</u>
IV. Analyses statistiques	<u>35</u>

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et Méthodes

I. Récolte du matériel végétal.....	<u>36</u>
II. Méthodes d'étude	<u>37</u>
II.2. Analyse phytochimique.....	<u>37</u>
→ Extraction de la plante	<u>37</u>
III. Etude quantitative	<u>37</u>
III.1. Dosage des polyphénols totaux TPC (Total Phenolic Content).....	<u>37</u>
III.2. Dosage des Flavonoïdes Totaux, TFC (Total Flavonoid Content).....	<u>38</u>
IV. Evaluation biologique <i>in vitro</i>	<u>40</u>
IV.1. Etude de l'activité antioxydante.....	<u>41</u>
IV.1.1. Etude de l'effet scavenger contre le radical DPPH.....	<u>41</u>
IV.1.2. Activité du piégeage de l'ABTS.....	<u>42</u>
IV.1.3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	<u>43</u>

IV.1.4. Activité de Phenanthroline.....	<u>44</u>
IV.2. Etude de l'activité enzymatique.....	<u>45</u>
IV.2.1. Activité anti-Alzheimer ou Anticholinestérase (AChE).....	<u>45</u>

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1. Analyse quantitative.....	<u>46</u>
II.1.1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux.....	<u>46</u>
II.2. Evaluation des activités biologiques	<u>48</u>
II.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante	<u>48</u>
1. Test DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	<u>48</u>
2. Test du piégeage du radical ABTS.....	<u>51</u>
3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	<u>53</u>
4. Activité de Phenanthroline.....	<u>55</u>
II.2.2. Évaluation de l'activité enzymatique	<u>57</u>
1. Activité anticholinestérase.....	<u>57</u>
Conclusion générale	<u>58</u>
Références	<u>60</u>

Annexes

Résumé

LISTE DES FIGURES PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Généralités et données bibliographiques

Figure I.1 :	Le cladogramme proposé par le système APG II.....	<u>4</u>
Figure I.2 :	Caractères botaniques des Ranunculaceae.....	<u>5</u>
Figure I.3 :	L'espèce <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>9</u>
Figure I.4 :	distribution géographique de <i>Ranunculus bullatus</i> dans le monde..	<u>9</u>

Chapitre II : Rappels théoriques sur les métabolites secondaires

Figure II.1:	Les voies des métabolismes -Interrelation entre les métabolites primaires et les métabolites secondaires-	<u>11</u>
Figure II.2 :	Principales classes des composés phénoliques.....	<u>13</u>
Figure II.3 :	Structure de base des flavonoïdes (De Rijke et al., 2006).....	<u>14</u>
Figure II.4 :	Lactonisation de l'acide ortho-hydroxy- cis cinnamique.	<u>16</u>
Figure II.5 :	7-hydroxycoumarine.....	<u>17</u>
Figure II.6 :	Impératorine.....	<u>17</u>
Figure II.7 :	Seseline.....	<u>18</u>
Figure II.8 :	4-méthylcoumarine.....	<u>18</u>
Figure II.9 :	Bishydroxycoumarine.....	<u>18</u>
Figure II.10 :	Structure de quelques alcaloïdes vrais.....	<u>19</u>
Figure II.11 :	Structures de quelques pseudo-alcaloïdes.....	<u>20</u>
Figure II.12 :	Exemple des proto-alcaloïdes	<u>20</u>
Figure II.13 :	Certains exemples des types chimiques représentés parmi les composés terpéniques (ORMENO in AIT-SAID, 2011).....	<u>23</u>

Chapitre III : Rappels théoriques sur les activités biologiques

Figure III.1 :	le stress oxydatif.....	<u>25</u>
Figure III.2 :	Espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	<u>26</u>
Figure III.3 :	Principe des antioxydants.....	<u>26</u>
Figure III.4 :	structures chimiques des antioxydants naturels.....	<u>28</u>
Figure III.5 :	Les structures chimiques des antioxydants synthétiques.....	<u>28</u>
Figure III.6 :	Action de la vitamine C sur les radicaux libres.....	<u>29</u>
Figure III.7 :	Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (ERO) et des antioxydants régulateurs de leur production.....	<u>30</u>
Figure III.8 :	L'effet d'un antioxydant (AH) sur le radical DPPH•.....	<u>31</u>
Figure III.9 :	Formation du radical cation ABTS+• à partir de l'ABTS.....	<u>32</u>
Figure III.10 :	Réduction du complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc.....	<u>33</u>
Figure III.11 :	Réaction redox pour le complexe ferrique dans le test FRAP...	<u>33</u>
Figure III.12 :	Mécanismes chimiques de la méthode d'Ellman.....	<u>34</u>

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et Méthodes

Figure I.1 :	L'espèce <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>36</u>
---------------------	---	-----------

Chapitre II : Résultats et Discussion

Figure II.1:	Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	<u>46</u>
Figure II.2 :	Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	<u>47</u>
Figure II.3 :	Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH• des antioxydants de références et de l'extrait éthanolique (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).....	<u>49</u>
Figure II.4 :	Valeurs des IC50 issus de l'extrait comparativement aux standards.....	<u>50</u>
Figure II.5 :	Effet scavengers contre le radical ABTS+ de l'extrait éthanolique de <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>51</u>
Figure II.6 :	valeurs des IC50 issu de l'extrait comparativement aux standards pour le test ABTS.....	<u>52</u>
Figure II.7 :	Courbe d'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>53</u>
Figure II.8 :	les concentrations de l'extrait et standards obtenus à l'absorbance 0.50.....	<u>54</u>
Figure II.9 :	Courbe comparative des absorbances de l'activité Phenanthroline.....	<u>55</u>
Figure II.10 :	présentation des valeurs des IC50 de l'extrait éthanolique de la plante <i>Ranunculus bullatus</i> en comparaison avec les standards.....	<u>56</u>
Figure II.11 :	Microplaque de dosage de l'Activités anticholinestérase....	<u>57</u>

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Généralités et données bibliographiques

Tableau I.1 : Description morphologique de la famille Ranunculaceae.....	<u>5</u>
Tableau I.2 : Principale utilisation ethno-pharmacologiques des plantes Ranunculacea	<u>6</u>
Tableau I.3 : Classification botanique de <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>8</u>

Chapitre II : Rappels théoriques sur les métabolites secondaires

Tableau II.1 : Principales classes des flavonoïdes	<u>15</u>
---	-----------

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et Méthodes

Tableau I. 1 : Série de dilution et concentration respectives d'extrait.....	<u>40</u>
---	-----------

Chapitre II : Résultats et Discussion

Tableau II.1 : teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux dans l'extrait éthanolique de la plante <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>47</u>
Tableau II.2 : Inhibition du radical DPPH par l'extrait éthanolique de <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>48</u>
Tableau II.3 : Activité antiradicalaire (ABTS) de l'extrait éthanolique de <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>51</u>
Tableau II.4 : Valeurs de l'absorbance de BHT, BHA et l'extrait éthanolique de <i>Ranunculus bullatus</i>	<u>53</u>
Tableau II.5 : Absorbances de l'extrait éthanolique de la plante <i>Ranunculus bullatus</i> par l'activité de Phenanthroline.....	<u>55</u>
Tableau II.6 : Pourcentage d'inhibition de l'AChE.....	<u>57</u>

ABREVIATIONS ET SYMBOLS

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
%	Pourcentage
APG	Angiosperms Phylogeny Group
cm	Centimètre
g/mol	Gramme par mole
GABA	acide γ -aminobutyrique
ATP	adénosine triphosphate
ROS	Reactif oxygen species
RNS	Reactif nitrogen species
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ERN	Espèces réactives de l'azote
SOD	Superoxyde dismutase
GPX	Glutathion peroxydase
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
PG	Gallate de propyle
TBHQ	Tert-butylhydroxyquinone
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
Nm	nanomètre
CUPRAC	capacité antioxydante par réduction du cuivre
PI	Pourcentage d'inhibition
IC₅₀	concentration inhibitrice médiane
AChE	Acétylcholinestérase
MA	Maladie d'Alzheimer
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMB	Concentration minimale bactéricide
FRAP	Capacités réductrices ferriques d'antioxydants
°C	Degré Celsius
μl	Microlitre
SNP	silvernanoparticle
TFC	Total Flavonoid Content
TPC	Total Phenolic Content
AChE	Anticholinestérase

Il est vrai que, dès l'aube de l'humanité, l'homme a utilisé les plantes d'abord pour se nourrir, puis pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales. De génération en génération, nos ancêtres ont transmis leur savoir et leurs expériences simples en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (**Benkhigui. Oet al., 2011**). En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales (**Quyoun et al., 2003**).

L'utilisation des plantes médicinales sous différentes formes, brutes ou préparées s'est considérablement élargie, 80% de la population globale dépend notamment de la médecine traditionnelle et de la phytothérapie pour les soins sanitaires, estime l'organisation mondiale de la santé (**OMS**). Ce qui semble être une solution acceptable (**Vania G et al., 2000**). Dans les pays industrialisés, il a été rapporté aussi que 60% des médicaments sont à base de plantes ; ces derniers sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques et agissent comme sources d'agents thérapeutiques modèles pour de nouveaux composés synthétiques ou comme matière de base pour la production semi synthétique de molécules de haute complexité (**Bourobou B.H., 2004**).

Dans l'étude des plantes médicinales ; la valorisation ne s'arrête pas uniquement au niveau des connaissances ethno pharmacologiques et biologiques des plantes, mais aussi à l'étude phytochimique qui est obligatoire pour cerner l'ensemble des informations nécessaires à cette valorisation.

Dans le cadre de nos travaux, relatifs aux plantes médicinales, nous nous sommes intéressés à la valorisation d'une plante utilisée en phytothérapie et dans la médecine traditionnelle contre les règles douloureuses, les maux d'estomac et pour activer l'accouchement. C'est la *Ranunculus bullatus* appartenant à la famille des Ranunculaceae.

L'objectif de ce présent travail est fixé dans les points suivants : la détermination de la composition chimique des métabolites secondaires et la mise en évidence d'une éventuelle variabilité de la quantification de ces substances, ainsi que **l'évaluation de l'activité**

biologique d'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus*.

Notre choix pour ce genre est justifié par le fait que celle-ci est riche en composés phénoliques notamment les flavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses.

Ce travail s'articule autour de 3 parties :

La première partie consiste à une synthèse bibliographique qui a pour objet de donner des informations sur la plante étudiée, les métabolites secondaires ainsi que sur les activités biologiques.

Le deuxième volet de notre travail concerne la partie expérimentale qui renferme les techniques d'analyse utilisées. Il sera présenté par la méthode d'extraction de la plante ainsi que les protocoles utilisés au cours des tests biologiques.

La 3^{ème} partie rassemble tous les résultats obtenus et leur discussion, avec l'étude d'une éventuelle corrélation entre eux. Et une conclusion générale avec quelques perspectives de recherches avenir.

**PARTIE
THEORIQUE**

Chapitre I

Généralités et Données Bibliographiques

I. Etude de la plante

I. 1. Famille de Ranunculaceae

I. 1. 1. Présentation de la famille

Les renonculacées constituent une grande famille de plantes avec 2 377 espèces acceptées appartenant à 65 genres (**The Plant List, 2013**). Les membres de la famille sont répartis dans le monde entier, bien que la plupart soient confinés aux régions tempérées et froides des hémisphères nord et sud. Cette famille a une grande importance économique en termes de valeur horticole et pharmaceutique (**Ro et al., 1997**). Elle présente également un intérêt pour la recherche phylogénétique car il a souvent été considéré comme l'une des familles eudicotylédones les plus basales (**Soltis et al., 2005 ; Simpson, 2006 ; Heywood et al., 2007**) et a donc été étudiés par de nombreux systématiciens utilisant divers caractères taxonomiques.

I. 1. 2. Position systématique de la famille Ranunculaceae

Tamura (1993) a identifié cinq sous-familles, principalement basées sur les chromosomes et les fleurs. Caractéristiques (Hydrastidoideae, Thalictroideae, Isopyroideae, Ranunculoideae et Helleboroideae). Takhtajan exclut Hydrastis et Glaucidium de la famille Ranunculaceae (**Takhtajan et al., 1997**). Peng était d'accord avec la taxonomie proposée par Tamura et a divisé les Ranunculaceae en six sous-familles (**Peng et al., 2006a**) : Helleboroideae, Ranunculoideae, Cimicifugoideae, Isopyroideae, Thalictroideae et Coptidoideae. Basé sur l'analyse complète de la phylogénie, de la chimiotaxie, de l'ethnopharmacologie et des bio-activités, il semble plausible de traiter Cimicifugoideae en tant que sous-famille distincte.

Le cladogramme (**Figure I.1**) proposé par le système APG II, basé sur la phylogénie moléculaire (**Angiosperm Phylogeny and Group et al., 2003**), comprend cinq sous-familles, les Glaucidiaceae et Hydrastidoideae basales, les Coptoideae et les Thalictroideae évolutivement jeunes. Ranunculoideae. Wang et al. Présenter une classification mise à jour basée sur quatre locus moléculaires et 65 caractères morphologiques (**Wang et al., 2009**), comprenant des

données cytologiques et quatre marqueurs chimiotaxonomiques. Cette classification est conforme au cladogramme APG II et reconnaît 10 tribus dans la sous-famille Ranunculoideae.

La sous-famille Thalictroideae comprend les genres comme *Isopyrum*, *Dichocarpum* et *Aquilegia*, qui appartiennent à la sous-famille proposée précédemment Isopyroideae (**Peng et al., 2006b**). La pharmaco phylogénie est discutée sur la base de ce système.

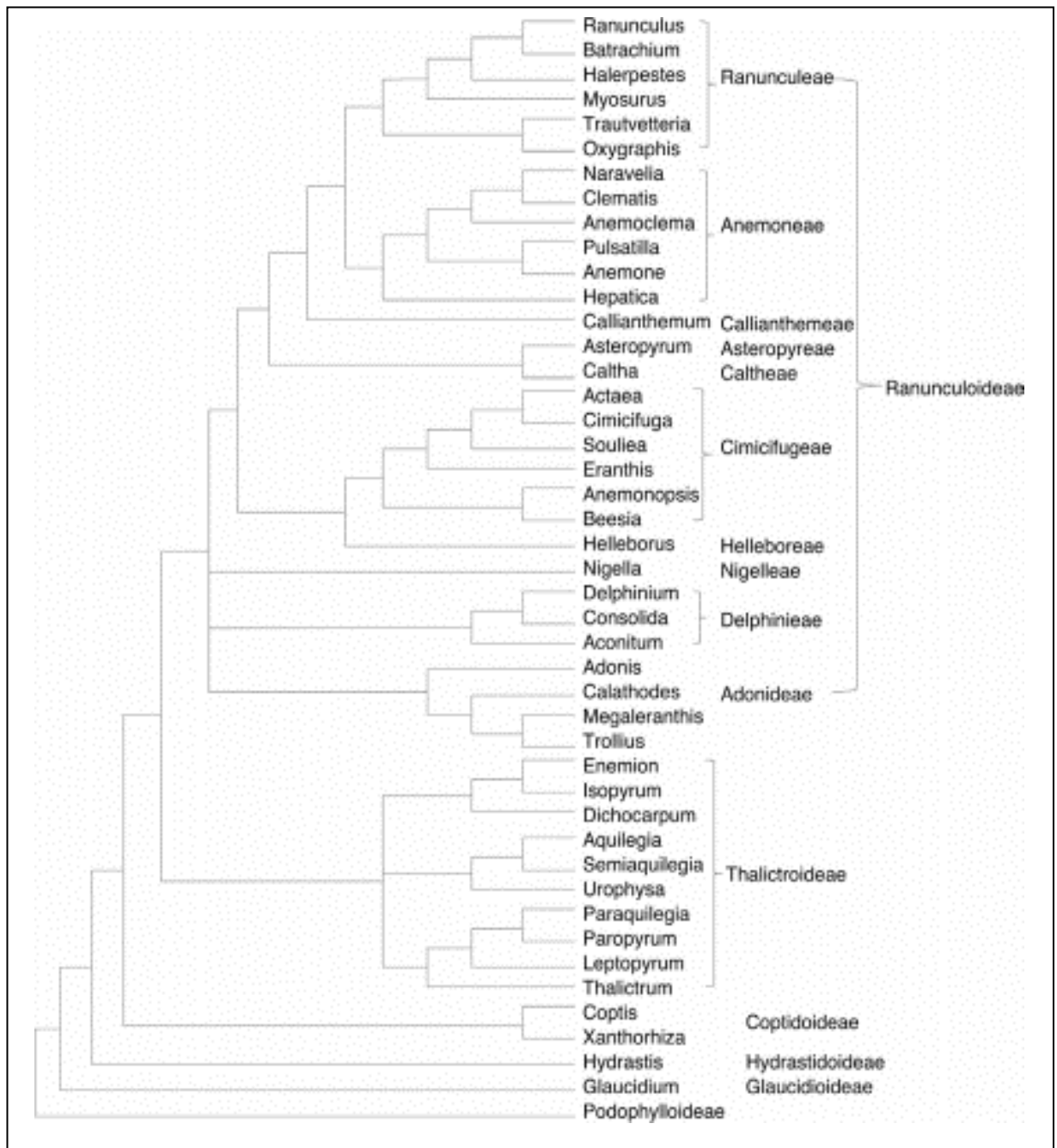


Figure I.1 : Le cladogramme proposé par le système APG II. (**Angiosperm Phylogeny and Group et al., 2003**). Modifié par (**Wang et al., 2009**).

I. 1. 3. Les caractères botaniques

La famille des Renonculacées ou Ranunculaceae est une famille ancienne de plantes dicotylédones appartenant à l'ordre des Ranunculales. Les caractères généraux des Ranunculaceae sont représentés dans le **tableau I.1** et la (**figure I.2**).

Tableau I.1 : Description morphologique de la famille Ranunculaceae (**Bhandari, N.N., Asnani, S. 1966**).

Morphologie générale	Plantes vivaces, annuelles ou la plupart sont des plantes herbacées, basses et terrestres (<i>Ranunculus</i>), aquatiques ou grimpantes, mais aussi quelques ligneuses.
Tiges	Lignifiées persistantes et sarmenteuses.
Feuilles	Sont en rosette ou alternes, opposées. Elles sont le plus souvent divisées ou palmatilobées. Les Renonculacées immergées ont des segments de feuilles filiformes.
Inflorescence	Le plus souvent terminales. Les fleurs sont uniques ou plus souvent groupées en racèmes. Chez certaines espèces la fleur se niche dans un involucre de bractées (<i>nigelle</i> , <i>anémone fausse-renoncule</i> , <i>pulsatille</i>).
Fleurs	Le plus souvent régulières. Elles sont bisexuées et adaptées à la pollinisation par les insectes. Elles ne sont pas toujours autofécondées. Les fleurs sont très décoratives avec un périanthe ou pétales et sépales se confondent souvent sous forme de tépales. Les segments de la fleur sont disposés en spirales : les tépales comme les étamines, de même que les carpelles s'ils sont nombreux.
Fruits	Des akènes, parfois soudés en capsules ou deviennent une baie. Chez certaines clématites et chez les <i>pulsatilles</i> , ils développent une longue soie plumeuse pour être dispersés par le vent. D'autres sont semés par les fourmis.

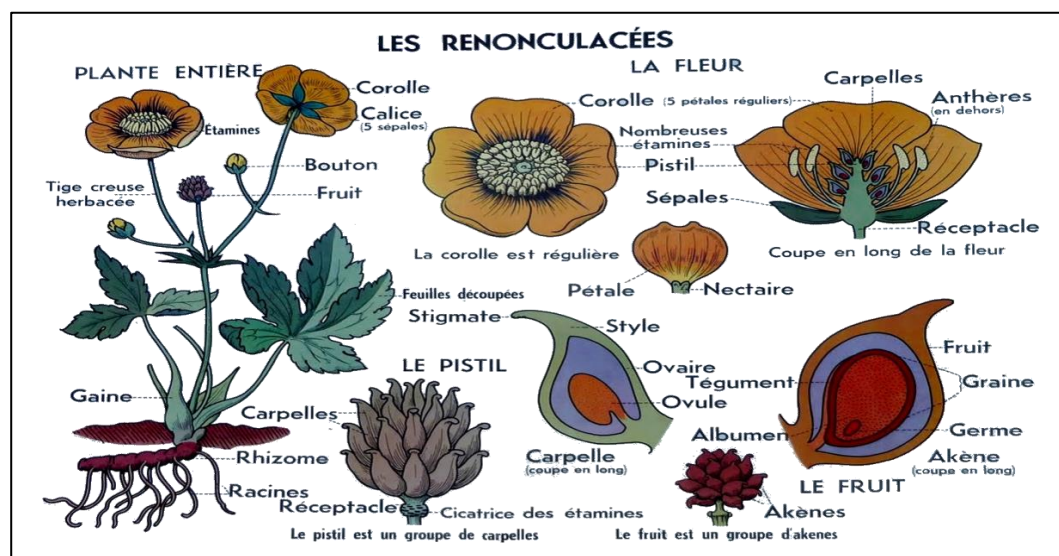


Figure I.2 : Caractères botaniques des Ranunculaceae

Source : bio-scene.org

I. 1. 4. L'intérêt pharmacologique

De nombreuses espèces de cette famille ont confirmé leur intérêt pharmacologique. Plusieurs d'entre eux sont utilisées en médecine traditionnelle dans le dégagement de chaleur et des intoxication (**tableau I.2**), le traitement de ulcères et plaies, comme anti-microbienne et anti- inflammatoire, mais les ingrédients actifs peuvent varier. Par exemple, la ranunculine et la protoanémone lactone, les triterpénoïdes saponines, et alcaloïdes benzylioquinoléine et protoberbérine ont une activité antibactérienne.

Tableau I.2 : Les principales utilisations ethno pharmacologiques des plantes de Ranunculaceae (Hao, D et al., 2015).

Taxon	Heat-clearing and detoxification	Ulcerdis ease and sore	Anti-microbe and anti-inflam-mation	Trauma-tic injury	Wind-dispersing and eliminating	Blood-activating and stasis-removing	Arthritis	Swell-reducing and detoxific ation	Dysenter-y	Pesticide	Antitussive and expectora nt
<i>Ranunculoideae</i>											
<i>Ranunculeae</i>											
<i>Ranunculus</i>		+	+				+	+		+	
<i>Batrachium</i>											
<i>Halerpestes</i>					+		+				
<i>Anemoneae</i>					+						
<i>Clematis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+		+
<i>Naravelia</i>											
<i>Pulsatilla</i>	+								+		
<i>Anemone</i>	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>Hepatica</i>				+							
<i>Callianthemaeae</i>	+		+								
<i>Asteropyreae</i>	+		+								
<i>Caltheae</i>					+		+				
<i>Cimicifugeae</i>											
<i>Actaea</i>	+		+								
<i>Souliea</i>	+	+									
<i>Eranthis</i>											
<i>Beesia</i>	+			+	+		+				

Le genre *Ranunculus* choisit dans notre travail est parmi les plantes de Ranunculaceae.

I. 2. Genre *Ranunculus*

I. 2. 1. Présentation du genre

Les plantes de *Ranunculus* (Ranunculaceae), environ 600 espèces, sont réparties dans le monde entier (Emadzade et al., 2011 ; Wang, 1995). *Ranunculus* est le plus grand genre de Ranunculaceae et peut être trouvé dans tous les continents, des régions tropicales aux régions arctiques et subantarctiques. Il est particulièrement riche en régions tempérées et méditerranéennes.

Dans les zones tropicales, les espèces sont limitées à zones de haute montagne (e.g, espèces africaines ; Tamura et al., 1993, 1995). *Ranunculus* présente différents niveaux de polyploidie, qui est parfois lié à l'apomixie (Hörandl et al., 2005).

Les espèces de *Ranunculus* sont utilisées en médecine traditionnelle comme remède contre les maladies de la peau (Gürhan et Ezer et al., 2004), antihémoroidal (Newall et al., 1996), cicatrisation des plaies (Zhu, 1990), antirhumatismal (Sezik et al., 2001) et pour le traitement de la tuberculose (Baytop, T., 1999), œdème, abcès et constipation (Gürhan et Ezer, 2004).

Selon une étude de la littérature, certaines plantes appartenant à ce genre ont démontré posséder des propriétés biologiques importantes comme antiviral (Li et al., 2005), antimicrobien (Barbour et al., 2004), anti-inflammatoire (Cao et Meng, 1992 ; Prieto et al., 2003) et activités anti protozoaires (Orhan et al., 2006).

I. 3. L'espèce *Ranunculus bullatus*

I. 3. 1. Classification taxonomique

La classification phylogénétique de *Ranunculus bullatus* est présentée dans le (Tableau I.3).

Tableau I.3 : Classification botanique du *Ranunculus bullatus* (BALDINI R. et al., 2002).

Règne	Archéplastides
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Ordre	Ranunculales
Famille	Ranunculaceae
Sous-famille	Renonculoïdées
Genre	Ranunculus
Espèce	<i>Ranunculus bullatus</i>

I. 3. 2. Description morphologique

L'espèce *Ranunculus bullatus* présente les caractéristiques suivantes :

- Souche vivace, à racines fasciculées-renflées
- Hampe de 10-20 cm, nues, hérissées. Ainsi que les pétioles
- Les feuilles toutes radicales, hérissées en dessous, ovales, crénelées, plus ou moins bosselées
- Fleurs jaunes, solitaires ou géminées, odorantes
- Sépales velus
- Pétales 5-12, à écaille presque nulle
- Réceptacle glabre
- Carpelles en tête ovoïde, renflés, étroitement bordés, à bec court et recourbé



Figure I.3 : L'espèce *Ranunculus bullatus*

Crédit photographique : Abdelmonaim Homrani Bakali, 2019

Lieu : Moulay Idriss Zehroun, 1245 m, 34°1'47"N 5°34'51W (Maroc atlantique Nord)

I. 3. 3. Localisation et répartition géographique

Ranunculus bullatus est réparti entre l'Europe, l'Afrique et Asie-tempérée. Il est très répondu dans le nord-africain (l'Algérie, Maroc et la Tunisie), l'ouest Asie (Turquie), Europe du sud-est (Grèce et l'Italie) et dans l'Europe du sud-ouest (France, Portugal et l'Espagne). (Figure I.4)

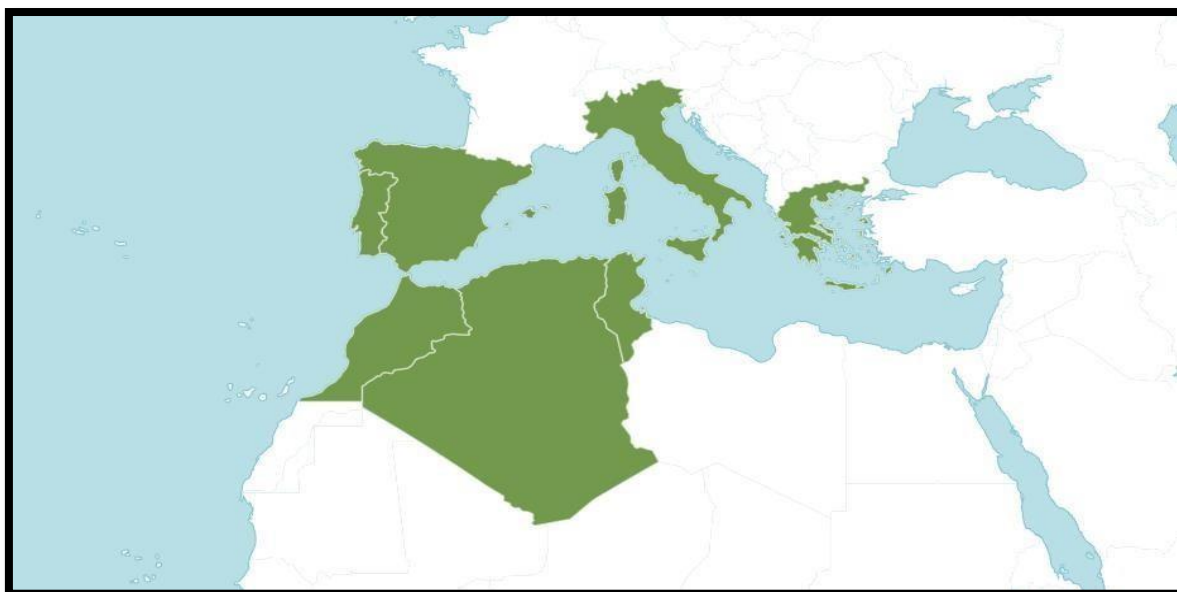


Figure I.4 : Distribution géographique de *Ranunculus bullatus* dans le monde.

Les zones en vert représentent les zones de distribution de *Ranunculus bullatus* dans le monde.

Chapitre II

**Rappels théoriques sur les
métabolites secondaires**

I. Introduction

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. A côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides et acides nucléiques), ils accumulent fréquemment un grand nombre de composés dits « métabolites secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire. (**Jeunet al., 2005 ; Macheix et al., 2005**).

II. Définition et fonctions des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires se définissent comme des molécules organiques complexes synthétisées produites par des organismes vivants (plantes, champignons, bactéries...). Ils sont très dispersés et très différents selon le type d'espèce et qui ne jouant pas de rôle direct pour les fonctions vitales de l'organisme, c'est-à-dire la nutrition, la croissance, et la reproduction (**Houëlet al., 2011**). Ils jouent nécessairement un rôle important dans la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production. Ils ont des rôles écologiques (allomone, phéromone...). Ces molécules sont présentes en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire lui permettant de marquer de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plantes et représentent une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (**Thomas et al., 2009**).

III. Biosynthèse des substances naturelles

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux métabolites secondaires sont maintenant bien connues (**Figure II.1**).

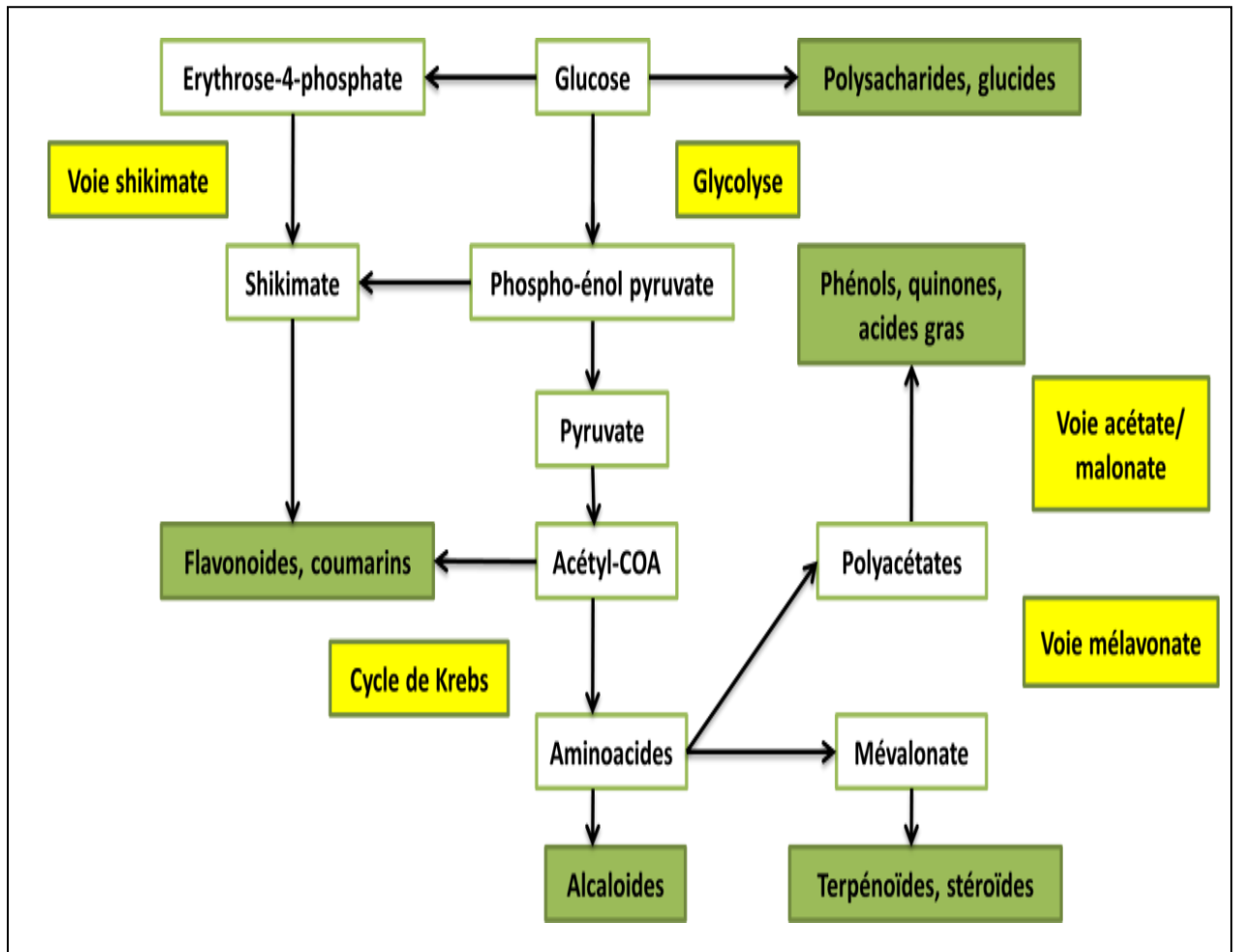


Figure II.1: Les voies des métabolismes
-Interrelation entre les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

IV. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dépassant actuellement 200000 qui sont identifiées et classés, selon leur appartenance chimique (Vermerris., 2006), en trois grands groupes (Abderrazak et al., 2007):

- ✓ Les composés phénoliques.
- ✓ Les composés azotés.
- ✓ Les terpénoïdes et les stéroïdes.

Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques (Bruneton, 1993 ; Guignard, 1996 ; Vermerris et al., 2006).

IV. 1. Composés phénoliques

IV. 1. 1. Définition et Localisation

Les polyphénols, également dénommés composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir, cependant l'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique ester, éther ou hétéroside (**Bruneton et al., 1999 ; Lugasi et al., 2003 ; Sarni-Manchado et al., 2006**).

Ce sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. Ils regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques et qui présentent toutes un point commun (**Beta et al., 2005**). En effet ces composés manifestent une grande diversité de structures : quinones (Anthracénosides), coumarines, acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilibénoïdes, lignanes et xanthones (**Hennebelle et al., 2004 ; Stalikas et al., 2007**).

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) (**Middleton et al., 2000**). Ils sont présents aussi dans diverses substances naturelles comme les fruits rouges, le raisin ...etc (**Martin et al., 2002**).

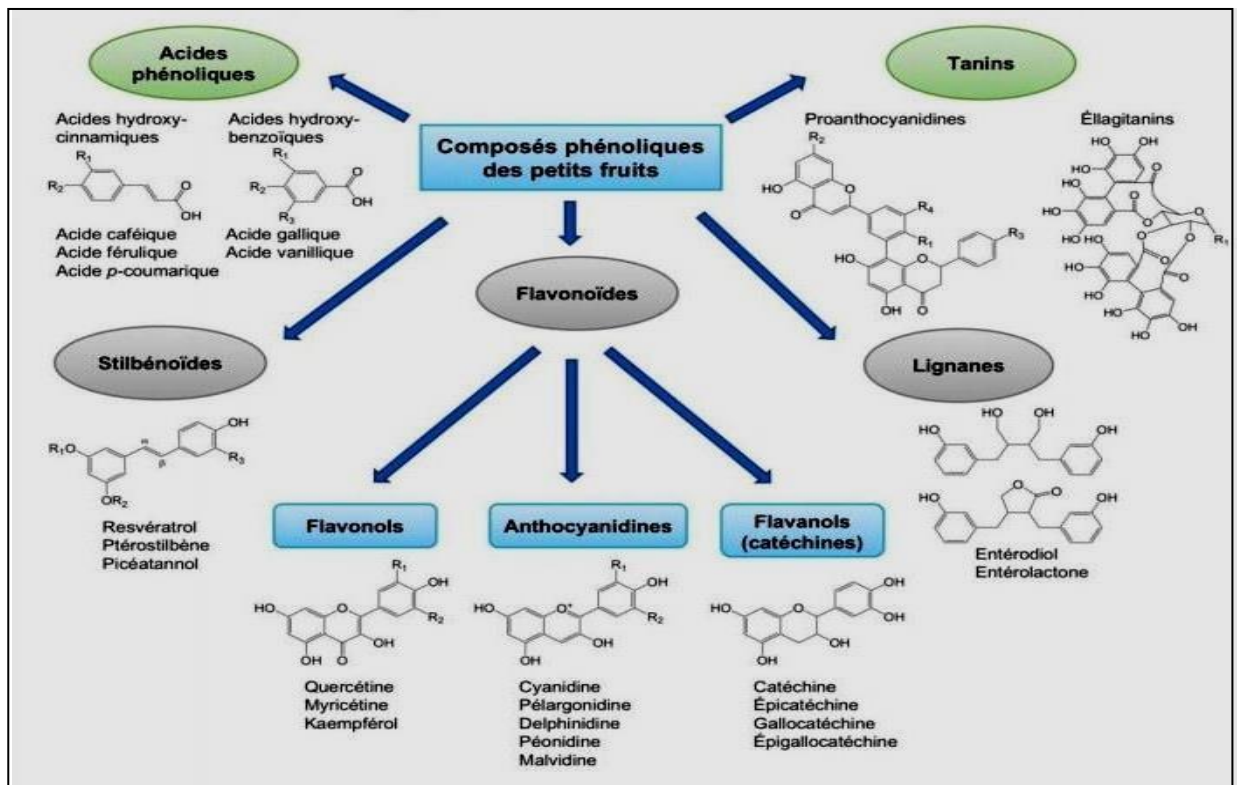
IV. 1. 2. Rôle et intérêt

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales ; ils ont la capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (**Boizot et al., 2006**).

Ces composés sont réputés aussi pour leur caractère anti-oxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de plusieurs maladies (**Epifano et al., 2007**). En outre, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés anti-oxydantes, antifongiques, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses (**Fiuza et al., 2004 ; Sumner et al., 2005**).

IV. 1. 3. Principales classes

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (**Bruneton. J et al., 1999**). On distingue les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les stilbènes et les quinones (**Macheix et al., 2005 ; Bragazza et al., 2007**). Les



différentes classes de ces composés phénoliques sont représentées dans la **figure II.2**.

Figure II.2 : Principales classes des composés phénoliques.

1- Les flavonoïdes

Le terme « flavonoïde du grec flavus, (jaune) en latin » est le nom générique qui désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (**Bruneton, J., 1999 ; Ghestem A et al., 2001**). À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides.

Tous les flavonoïdes (plus de 6000) possèdent le même élément structural de base (**Ghedira et al., 2005**), avec un squelette à 15 atomes de carbone constitués de deux cycles phényles, les cycles A et B, reliés par une chaîne à trois carbones (structure en C6-C3-C6). La chaîne en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisée pour former le cycle C (**Graham et al., 1998 ; Schijlen et al., 2004**). La **figure II.3** représente la structure de base des flavonoïdes (**De Rijke et al., 2006**).

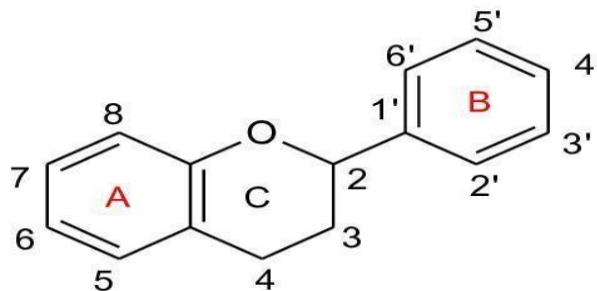


Figure II.3: Structure de base des flavonoïdes (**De Rijke et al., 2006**).

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme les groupements méthoxy, méthyl, hydroxy, benzyl et isoprényl (**Beecher et al., 2003 ; Kueny-Stotz et al., 2008**).

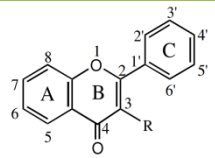
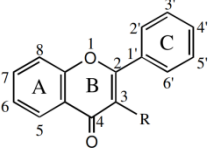
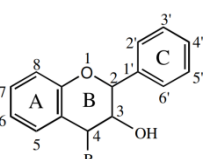
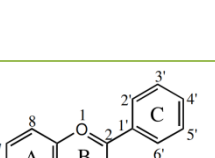
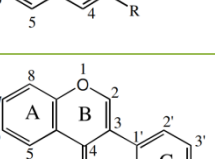
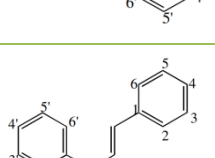
❖ Classification des flavonoïdes

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, lequel peut être ouvert et recyclisé en un motif furanique (dihydrofuranone). Le **tableau II.1** illustre les principales classes de flavonoïdes (**Balasundram N et al., 2006**).

De façon générale, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5' et/ou 6' (suivant la numérotation présentée pour les flavones,). Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés.

Les flavonoïdes peuvent être présents sous forme C-ouO-glycosylés dans les plantes. Les formes libres, sans sucres attachés sont appelés les génines ou aglycones (**Dacosta et al., 2003 ; Louis et al., 2004**).

Tableau II.1 : principales classes de flavonoïdes (Balasundram N et al., 2006).

Différentes classes		Principales substances	
Structure	Nom de famille	Hydroxylation	Nom
	R=H FLAVONE	5, 7, 4' 5,7, 3', 4'	Apeginine Luteoline
	R=OH FLAVONOL	5, 7, 4' 5,7, 3', 4'	Kaempferol Quercetine
	R=H FLAVANONE (Dihydroflavone)	5, 7, 4' 7, 3', 4'	Naringenine Butine
	R=OH FLAVANONOL (Dihydroflavonol)	7, 3', 4', 5, 7, 3', 4'	Fustine Taxifoline
	R=H CATECHINE (Flavanol-3)	5, 7, 3', 4', 5' 5, 7, 3', 4'	Gallocatechine Catechine
	R=OH LEUCOANTHO- CYANIDINE (Flavandiol- 3, 4)	5, 7, 3', 4', 5, 7, 3', 4', 5'	Leucocyanidine Leucodelphinidine
	R=H FLAVYLIUM (Anthocyane)	5, 7, 4', 5, 7, 3', 4'	Apigenidine Luteolidine
	R=OH ANTHOCYANIDINE	5, 7, 3', 4' 5,7, 3', 4', 5'	Cyanidine Delphinidine
	ISOFLAVONE	7, 4' 5, 7, 3', 4'	Daidzein Orobol
	CHALCONE	2', 4', 3, 4 2', 3', 4', 3, 4	Buteine Okanine
	DIHYDROCHALCONE	4, 2', 4', 6' 3,4, 2', 4', 6'	Phloretine Hydroxyphloretine
	AURONE	6,3', 4' 6, 7, 3', 4'	Sulphuretine Maritimetine

❖ Propriétés des flavonoïdes

Ce sont des solides cristallisés dont la teinte, varie du blanc ivoire au jaune vif. Ces hétérosides sont solubles dans l'eau (surtout à chaud), l'alcool et les solvants organiques. Ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires.

Les flavonoïdes sont aussi solubles dans les solutions alcalines (ammoniaque et potasse) donnant une coloration jaune qui disparaît par addition d'acide.

Ils possèdent un spectre d'absorption dans l'ultraviolet avec, généralement deux maximums caractéristiques variant avec chaque type flavonique (**Hopkins et al., 2003**). Ils Protègent les plantes contre les radiations UV.

Ils sont impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.

Ils fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.

Ils régulent l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits (**Yang et al., 2008**).

2- Les coumarines

Les coumarines sont des substances aromatiques naturelles très largement distribuées dans le règne végétal, dont la structure comporte un noyau benzo-2 pyrone (coumarine) résultant de la lactonisation de l'acide ortho-hydroxy- cis cinnamique (**Figure II.4**).

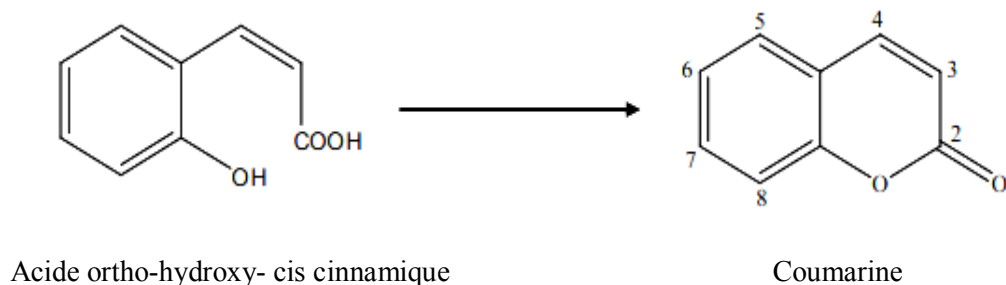


Figure II.4: Lactonisation de l'acide ortho-hydroxy- cis cinnamique.

Les coumarines sont naturellement présentes dans les plantes et les micro-organismes, elles existent sous forme libre ou encore liée à des sucres. Environ 1000 dérivés de la coumarine ont été isolés à partir de plus de 800 espèces de plantes et de micro-organismes (Smyth et al.,2009). La coumarine elle-même a été isolée de la fève tonka (*Coumarouna odorata*) par Vogel en 1820 (Erzengin et al., 2012). D'après Smyth (Smyth et al., 2009) les coumarines peuvent être grossièrement classées en cinq grands groupes :

- Coumarines simples ont des substituant sur le noyau benzénique, ils peuvent être des dérivés hydroxylés, alkylés ou alcoxylés. ex. 7-hydroxy-coumarine (Figure II.5).

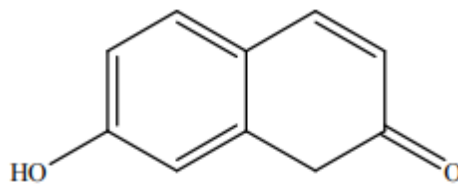


Figure II.5: 7-hydroxycoumarine

- Le deuxième groupe est celui des furocoumarines, qui contiennent un noyau furanne pentagonal attaché à la structure de la coumarine avec l'oxygène de furanne en position 7. ex. Impératorine (Figure II.6).

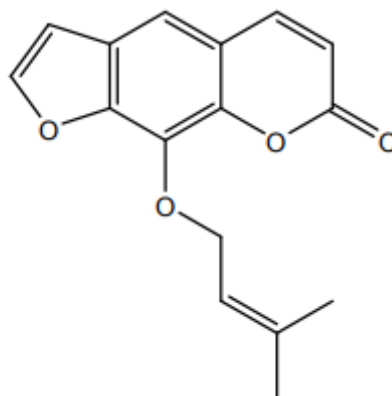


Figure II.6: Impératorine

Les furocoumarines peuvent être linéaire ou angulaire, basée sur la position de fixation du cycle furane à la structure de la coumarine (Keating et al., 1997).

- Le grand groupe de coumarines sont les pyranocoumarines. Elles ont un noyau hétérocyclique à six chaînons contenant un atome d'oxygène, et peuvent exister sous formes linéaires ou angulaires. ex. Seseline (**Figure II.7**).

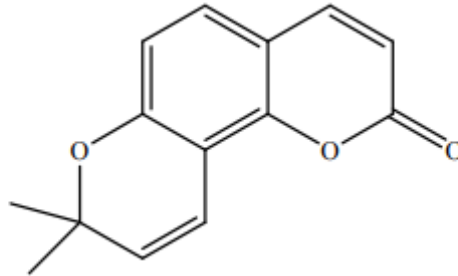


Figure II.7: Seseline

- Un autre groupe majeur des coumarines qui sont substitués dans le noyau pyrone soit en positions 3 ou 4, tels que 4-méthylcoumarine (**Figure II.8**).

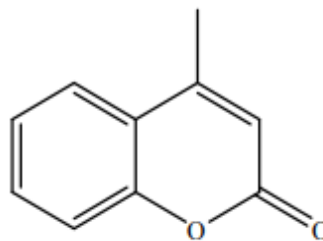


Figure II.8: 4-méthylcoumarine

- Le dernier groupe comporte les dimères de la coumarine, qui comportent généralement deux unités de la coumarine reliées entre elles. ex. Bishydroxycoumarine (**Figure II.9**).

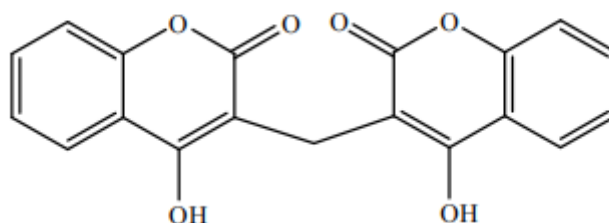


Figure II.9: Bishydroxycoumarine

IV. 2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés, hétérocycliques et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (**Zenk et al., 2007**). Leurs noms se terminent toujours par < -ine >. Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils ont un large rang de types structuraux de près de 10000 à 12000 structures (**Stöckigt et al., 2002**). A faible dose, ils sont toxiques et possèdent une remarquable activité physiologique et thérapeutique (**Hopkins et Evrard et al., 2003**).

❖ Classification :

Parmi les nombreux systèmes proposés pour la classification des alcaloïdes, on peut citer, selon leur biogénèse et la position de l'azote, celui qui divise les alcaloïdes en trois groupes (**Dehak et al., 2013 ; Beddou et al., 2015**):

- Alcaloïdes vrais.
- Pseudo-alcaloïdes.
- Proto-alcaloïdes.

a. Les alcaloïdes vrais (**Tadeusz et al., 2007**)

Les alcaloïdes vrais représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes qui sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde (**Figure II.10**).

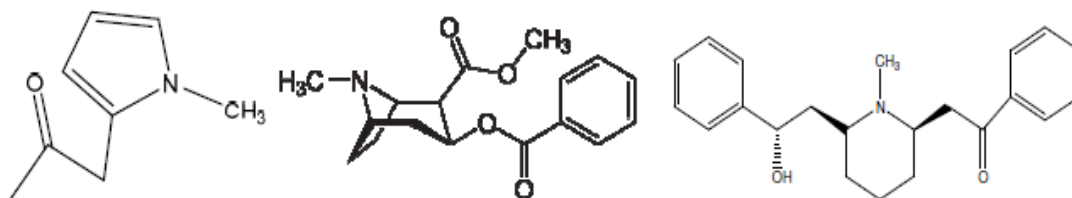


Figure II.10 : Structure de quelques alcaloïdes vrais.

b. Les pseudo-alcaloïdes

Les pseudo-alcaloïdes sont des composés qui, le plus souvent présentent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais le squelette carboné de base ne dérive pas d'acide aminé. (**Badiaga et., 2011**). Il s'agit d'alcaloïdes aromatiques qui sont, dans la majorité des cas connus, des isoprénoides comme la capsaïcine. La caféine et la noréphédrine sont aussi des pseudo-alcaloïdes (**Figure II.11**).

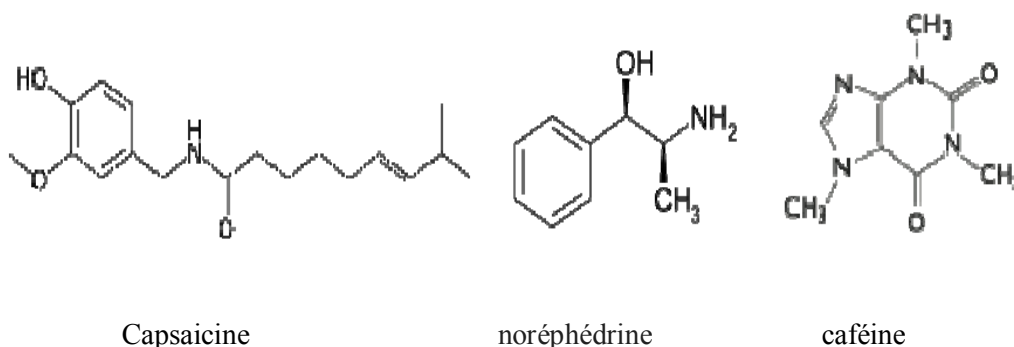


Figure II.11 : Structures de quelques pseudo-alcaloïdes.

c. Les proto-alcaloïdes:

Ce sont des amines simples qui dérivent d'acides aminés dont l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine), certains s'associent à des résidus terpéniques, exemple : alcaloïdes indoliques monoterpéniques (utilisés contre le cancer) (**Figure II.12**). Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont soluble dans l'eau. (**Badiaga et al., 2011**).

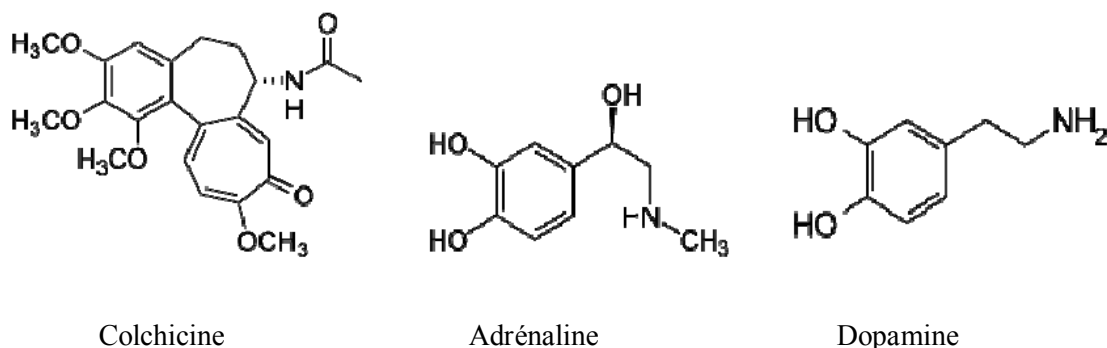


Figure II.12 : Exemple des proto-alcaloïdes.

❖ Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des substances azotées ayant des masses moléculaires très variables de 100 à 900g/mol (**Dehak et al., 2013**).

Les alcaloïdes et leurs sels purs sont, en général des produits solides cristallisés, caractérisés par un point d'ébullition propre. Certains d'entre eux sont amorphes et se trouvent sous forme de cires. D'autres, ayant de faibles points d'ébullitions sont l'état liquide sous forme d'huiles et ont une viscosité variante (**M. Paris et al., 1986**).

Ils sont solubles, dans l'eau et les solvants organiques polaires comme les alcools, tant qu'ils sont placés en milieu acide (sels d'alcaloïdes), ils sont solubles aussi, dans les solvants organiques peu polaires comme le dichlorométhane, le chloroforme, etc...en milieu alcalin (alcaloïdes sous forme de base) (**Vigor et al., 2010-2011**).

La basicité des alcaloïdes est très variable et dépend de la disponibilité du doublet libre de l'atome d'azote. Cette basicité est fortement influencée par la présence des groupements liés à l'atome d'azote : les groupements électro-attracteurs adjacents l'atome d'azote diminuent la basicité tandis que les groupements électro-donneurs la renforcent. La colchicine et la pipérine, du fait de l'existence du carbonyle de l'amide, sont pratiquement neutres (**Stenart et al., 2013**).

❖ Propriétés thérapeutiques des alcaloïdes (**Bruneton et al., 1993 ; BEDIAGA et al., 2011**):

Ils sont utilisés dans plusieurs médicaments, ils affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétyl choline, norepinephrine, aminobutyrique (GABA), dopamine et la sérotonine.

D'autres effets pharmacologiques sont attribués également aux alcaloïdes telles que l'effet anesthésique local (cocaïne), anti-cholinergique (atropine), antifibrillant (quinidine), antipaludique (quinine), antihypertensive (réserpine), antitussive (codéine), stimulant centrale (caféine), dépressant cardiaque et diurétique narcotique (morphine), anti-tumeur (vinblastine) et sympathomimétique (éphédrine) (**Badiaga et al., 2011**).

Ces différentes activités (et d'autres) conduisent à une utilisation pharmaceutique des plantes à alcaloïdes. D'une manière générale, les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques très variées ainsi que par leur toxicité.

IV. 3. Les terpènes

Les terpènes (= terpénoïdes) sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles, on les trouve fréquemment dans les huiles volatiles des plantes (**Lamarti et al., 1994**).

Les terpènes ont été isolés chez les champignons, les insectes, les éponges, les algues maritimes, et une grande majorité spécifique du règne végétal. Chez les bactéries et les levures, les composés terpéniques sont des métabolites de base (**Thoppil et Bishayee, 2011**). La biosynthèse de ces composés se fait par deux voies métaboliques, la première découverte dans les années 1950 qui conduit également au cholestérol via la voie des mévalonates dans le cytoplasme, la deuxième voie est la voie du méthylérythritol phosphate (ou voie non-mévalonate) dans les chloroplastes des végétaux, cette voie a été découverte à la fin des années 1980.

Les terpénoïdes ont été utilisés dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies comme le cancer, ils ont des propriétés antimicrobienne, antifongique, antiparasitaire, antivirale, anti-allergénique, antispasmodique, anti-hyperglycémique, anti-inflammatoire et immuno-modulatrice (**Rabi et Bishayee, 2009 ; Wagner et Elmadfa, 2003; Sultana et Ata, 2008; Shah et al., 2009**). En outre, les terpènes ont d'autres applications comme substances insecticides et protectrices dans le stockage des produits agricoles (**Theis et Lerdau, 2003**).

❖ Classification

Les terpénoïdes sont des hydrocarbures linéaires ou cycliques avec l'isoprène (C₅H₈) comme molécule de la base. Leur classification est basée sur le nombre d'unités condensées « tête-à-queue » de cette molécule : hémiterpènes (C₅), monoterpènes (C₁₀), sesquiterpènes (C₁₅), diterpènes (C₂₀), sesterpènes (C₂₅), triterpènes (C₃₀), tetraterpènes (C₄₀) et polyterpènes. Plus de 40.000 composés terpéniques ont été trouvés, existant largement dans les fruits et légumes (**Thoppil et Bishayee, 2011**) (**Figure II.13**).

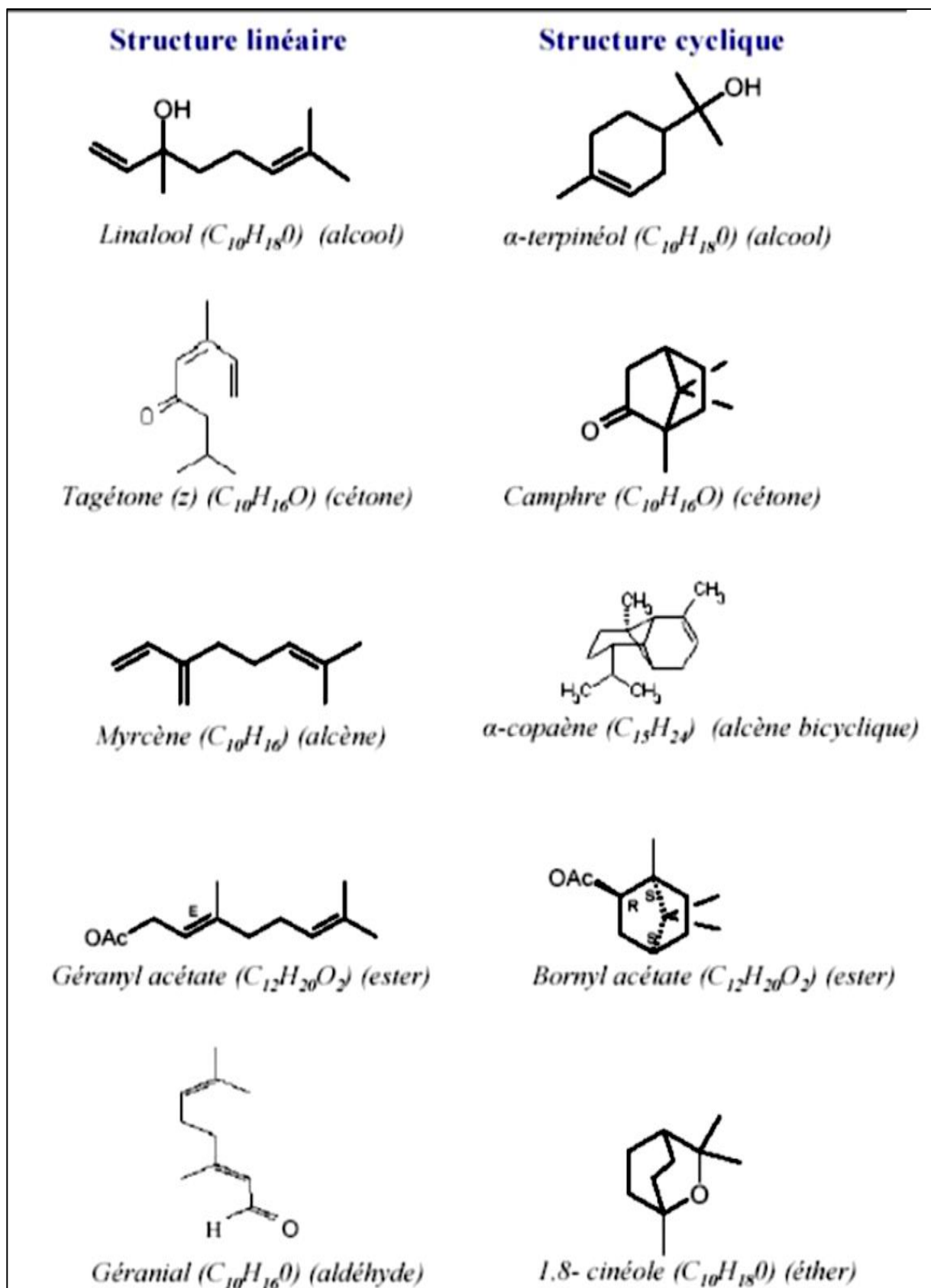


Figure II.13 : Certains exemples des types chimiques représentés parmi les composés terpéniques (ORMENO in AIT-SAID, 2011).

Chapitre III

**Rappels théoriques sur les
activités biologiques**

I. Introduction

Un certain nombre de plantes médicinales ont été consacrées pour traiter différentes maladies chez l'homme et les animaux, ceci est dû à la présence des molécules bioactives (**Bourgou et al. 2016**).

Ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur. Le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (**Cole et al. 2005 ; Liu 2003 ; Riboli et Norat et al., 2003**). Certaines études ont aussi montré que les antioxydants peuvent retarder la progression de la maladie d'Alzheimer qui est fréquemment observée chez les personnes âgées (**Howes et al., 2003**).

II. Activité antioxydante

Depuis le début du 20^{ème} siècle, les radicaux libres et les antioxydants sont les termes les plus utilisés dans le domaine de la recherche scientifique, caractérisés par leur capacité à s'oxyder en d'autres molécules. Leur effet sur la santé n'a été étudié par les biologistes qu'au début des années 60 grâce aux travaux réalisés sur les vitamines et les flavonoïdes, suivis par les travaux sur l'acide ascorbique à la fin des années 70 (**Cameron et Pauling et al., 1976**).

II. 1. Stress oxydatif

Dans les systèmes biologiques, l'oxygène est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est très importante puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire (sous forme d'adénosine triphosphate (ATP)) pour assurer ses fonctions (**Favier et al., 2003**). Le processus n'est toutefois pas parfait car une faible partie de l'oxygène (2 à 5%) est transformé en espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Pincemail et al., 2003**).

Le stress oxydant se définira donc comme un déséquilibre de la balance entre la formation des espèces réactives de l'oxygène à caractère pro-oxydant et les antioxydants qui régulent leur production, en faveur des premières (**Halliwell et Aruoma, 1993 ; Azzi et al, 2004**;

Soares, 2005; Valavanidis et al., 2006 ; França et al., 2007) (figure III.1).

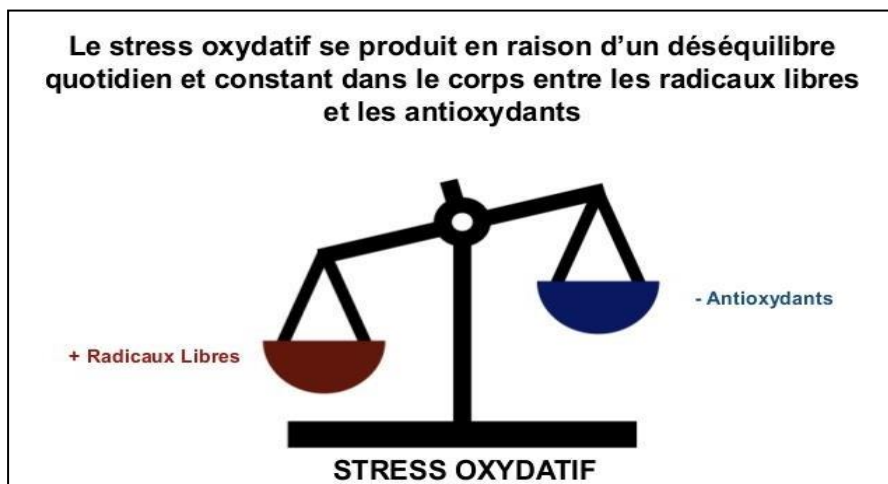


Figure III.1 : le stress oxydatif.

II. 2. Les radicaux libres

Par définition, un radical libre est comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataires) sur l'orbitale externe (Levesque et al., 2006). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (ERN). La présence d'un électron célibataire lui confère une réactivité importante (demi-vie courte) : les radicaux libres réagissent avec des molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (Januel, 2003 ; Baril et al., 2007).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie (Park et al., 2007) et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels que : l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel que : le monoxyde d'azote NO^{\bullet} (Yoshikawa et al., 2000). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (figure III.2). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Favier et al., 2003).

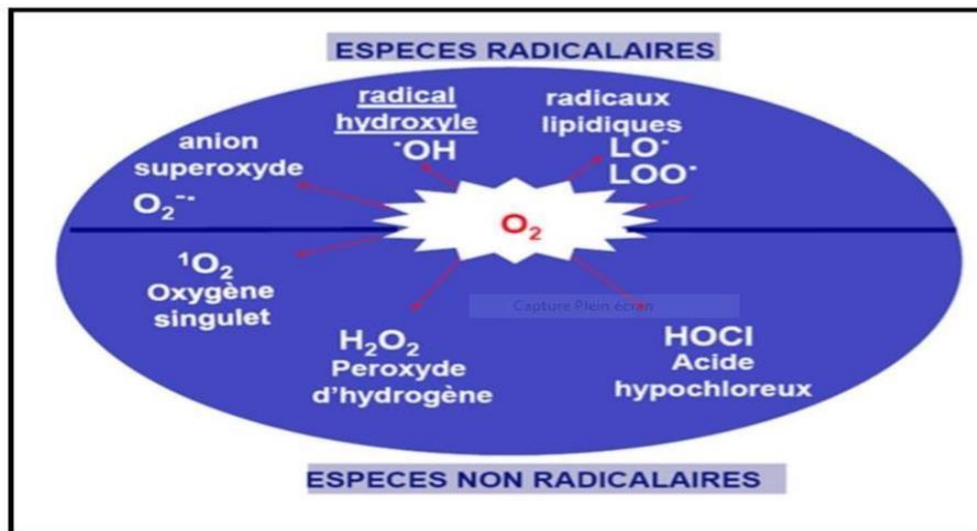


Figure III.2 : Espèces réactives de l'oxygène (ERO).

II. 3. Antioxydants

Les antioxydants ont été défini comme étant toute substance présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable qui inhibe ou retarde l'oxydation de ce substrat. Ils sont présents sous de nombreuses formes et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres et leur éliminer (antioxydants primaires et secondaires).

II. 3. 1. Principe des antioxydants

La réaction d'oxydation est souvent une réaction en chaîne, les antioxydants bloquent cette chaîne et empêchent ainsi les radicaux libres d'attaquer les cellules du corps. Les antioxydants vont se lier aux radicaux libres et réalisent une réaction d'oxydation avec eux, ce qui va les rendre faibles et donc rendre impossible leurs oxydations par les protéines ou les acides gras. (Figure III.3).

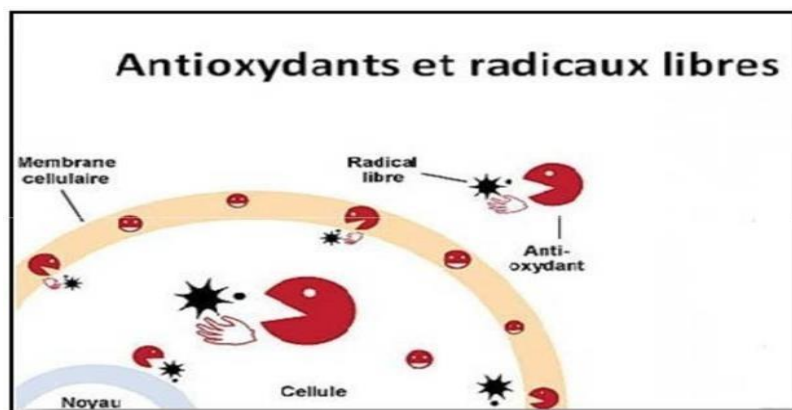


Figure III.3 : Principe des antioxydants.

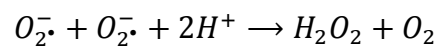
II. 3. 2. Les différents types et sources d'antioxydants

1. Antioxydants enzymatiques

Il y a plusieurs systèmes d'enzymes qui catalysent des réactions pour neutraliser des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène. Ces enzymes sont :

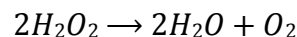
✓ **Superoxydes dismutases (SOD)**

Ce sont des métalloenzymes, Ils s'agissent d'une des premières lignes de défense contre les ERO, catalysent la dismutation des ions superoxydes en molécules peroxyde d'hydrogène et oxygène (**Beaudeau et Durand et al., 2011**).



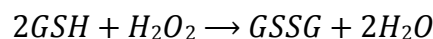
✓ **Catalases**

Les catalases sont localisées dans les peroxysomes et sa cible principale est le H_2O_2 . Capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Beaudeau et Durand et al., 2011**).



✓ **Glutathion peroxydase (GPX)**

Les glutathion peroxydases sont localisées dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et dans la membrane interne des mitochondries. Permettent de réduire H_2O_2 en H_2O en parallèle de l'oxydation du glutathion (**Thérond et al., 2003**).



2. Antioxydants non enzymatiques

Ces antioxydants renferment de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles : le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque (**Attou 2011; Meziti et al., 2009**).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation (antioxydants naturels), telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), les polyphénols en particulier les flavonoïdes, ou les caroténoïdes, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (**Attou et al., 2011**) (**Figure III.4**).

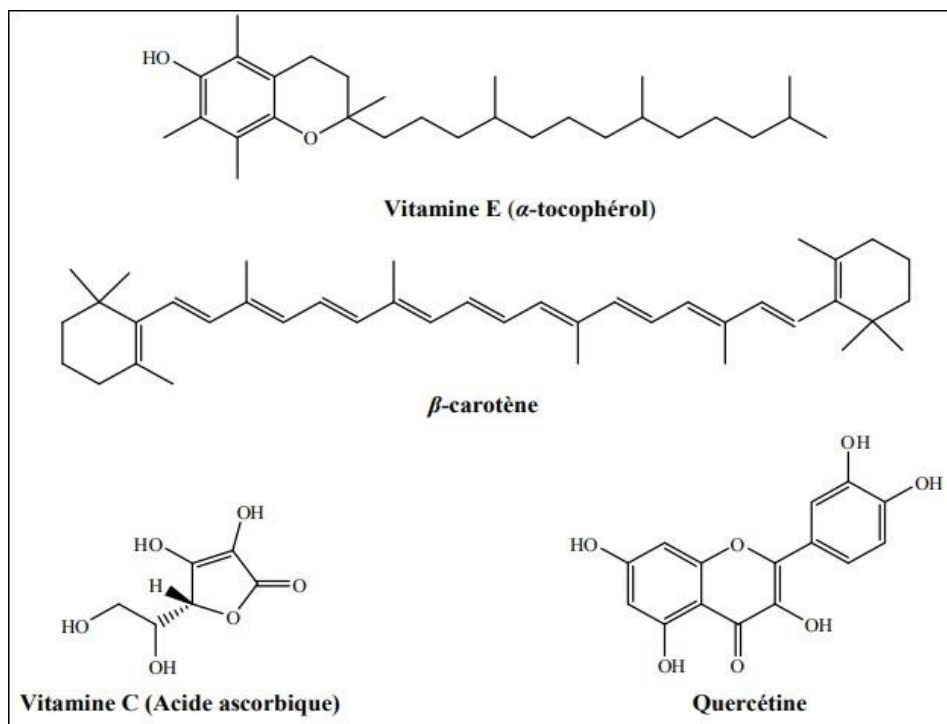


Figure III.4 : structures chimiques des antioxydants naturels.

3. Antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont des composés phénoliques tels que : butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la tert -butylhydroquinone (TBHQ) et le gallate de propyle (PG) (Hudson et al., 1990) (Figure III.5).

Le BHA et le BHT sont relativement stables à la chaleur, ils sont souvent utilisés pour la stabilisation de matières grasses dans des produits cuits au four. Les produits naturels apparaissent comme plus sains et plus sûrs que les antioxydants synthétiques (Valenzuela et Nieto et al., 1996).

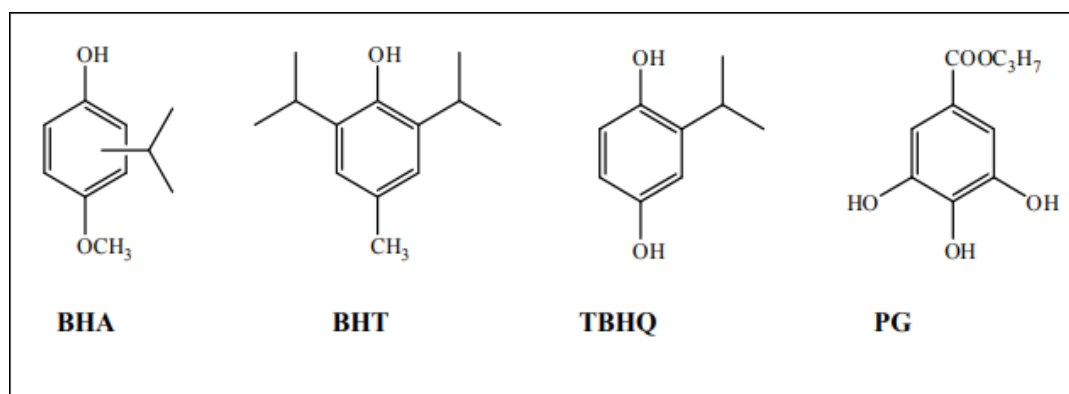


Figure III.5 : Les structures chimiques des antioxydants synthétiques.

II. 3. 3. Caractéristiques d'antioxydants

Un composé est considéré antioxydant *in vivo*, lorsqu'il nécessite les propriétés suivantes (Valko et al., 2006) : Agi spécifiquement sur les radicaux libres ; Chélate les métaux de transition ; Agi en synergie avec d'autres antioxydants pour se régénérer ; Agi à des concentrations physiologiques relativement faibles.

La demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant.

II. 3. 4. Antioxydants et système de défense

Les antioxydants, analogues de l'acide ascorbique, sont des substances naturellement présentes dans l'organisme et capables de neutraliser ou stabiliser les radicaux libres par résonance (Figure III.6). L'organisme possède des enzymes qui peuvent métaboliser les ERO (Morena et al., 2002). Les systèmes de défense contre les dommages induits par ROS/RNS sont classés en trois catégories : Les antioxydants préventifs qui suppriment la formation de radicaux libre, les antioxydants piègeurs de radicaux, qui inhibent ou empêchent le déclenchement des réactions en chaîne et arrêtent la propagation et les antioxydants impliqués dans des processus de réparation.

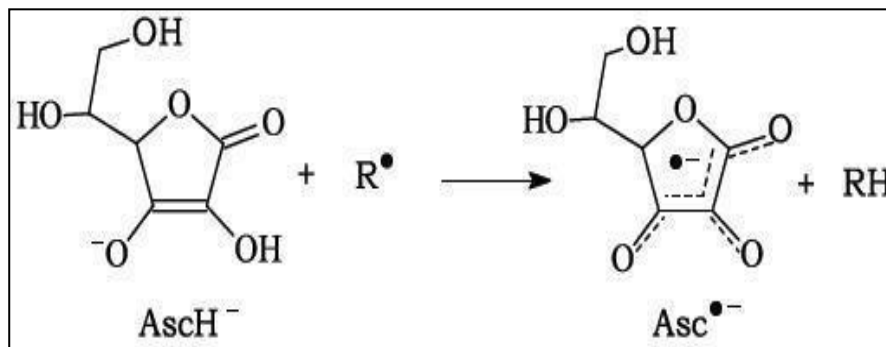


Figure III.6 : Action de la vitamine C sur les radicaux libres.

En effet, les cellules disposent d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (Figure III.7). Ces dernières peuvent se diviser en systèmes non enzymatiques ; apportées par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; et systèmes enzymatiques qui se composent d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et les systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases (Yue T L et al., 1992).

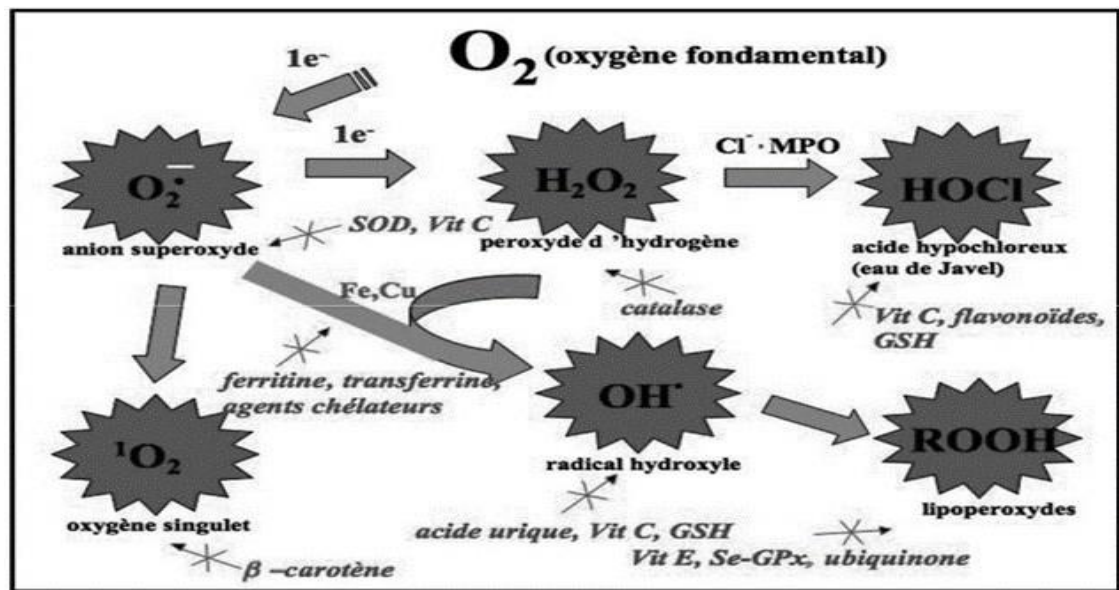


Figure III.7 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (ERO) et des antioxydants régulateurs de leur production. (Pincemail, 1999).

II. 3. 5. Les méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes in vitro

Les antioxydants présentent une grande diversité moléculaire agissant contre les processus d'oxydation de différentes manières. Ainsi, afin de mesurer l'activité antioxydante d'une molécule, on peut coupler plusieurs tests. Par exemple, on retrouve le test au radical libre DPPH \cdot (2,2-DiPhényl-1-PicrylHydrazyle) ainsi que le test au radical libre ABTS \cdot qui est obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulfonique)). Ces deux tests sont les plus utilisés mais on peut également retrouver d'autres méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant : Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC), Test du Pouvoir réducteur.

a. Le test DPPH

→Principe du piégeage du radicale libre

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable, possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle.

En sa forme radicalaire, le DPPH absorbe à 517 nm, mais lorsqu'il est réduit par un antioxydant ou une espèce radicalaire, son absorbance diminue. L'activité de piéger les radicaux libres a été déterminée par l'essai de DPPH (Blois et al., 1958) avec quelques modifications (Öztürk et al., 2011).

Le test au radical DPPH est généralement utilisé pour les composés, qui contiennent les groupements donneurs d'hydrogène, comme R₂-NH, R-OH et R-SH. Lorsque le DPPH• réagit avec un antioxydant, un atome d'hydrogène vient se fixer sur le radical, ce qui entraîne une perte de couleur (**Figure III.8**). C'est ce qui permet le suivi de l'efficacité d'un antioxydant par spectrophotométrie.

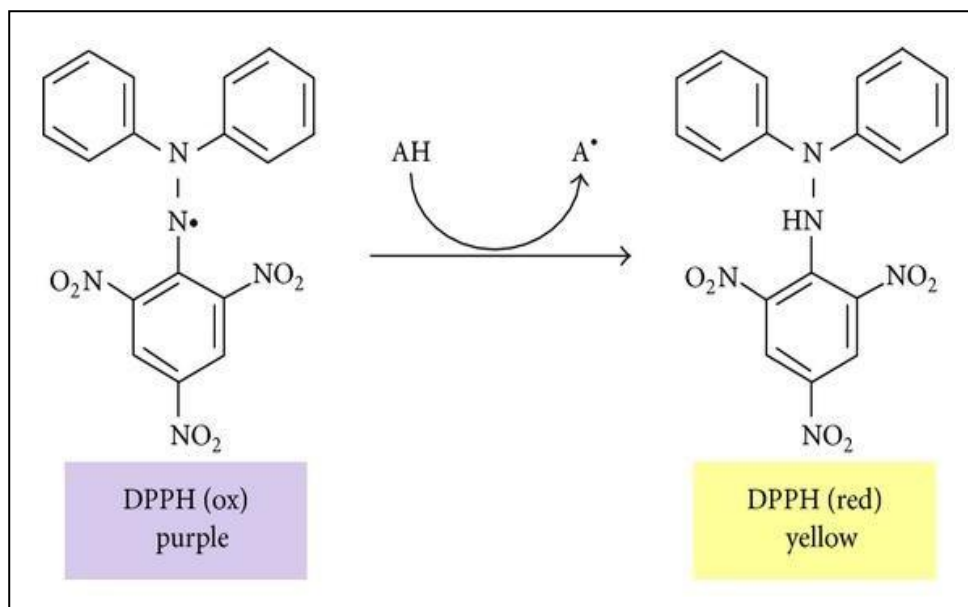


Figure III.8 : L'effet d'un antioxydant (AH) sur le radical DPPH• (Foti, M. C. 2015)

b. Test ABTS

→Principe du Piégeage de radical ABTS

Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium (K₂S₂O₈) pour former le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert. L'addition d'un composé antioxydant engendre la réduction du radical ABTS^{•+} en ABTS.

L'activité antioxydante est déterminée par la décoloration de la solution et s'exprime par le pourcentage d'inhibition (PI) de l'absorbance à 734 nm, longueur d'onde à laquelle le radical ABTS^{•+} présente une bande d'absorption caractéristique (Osman et al., 2006 ; Moon et Shibamoto et al., 2009).

Le schéma réactionnel impliquant le cation radical ABTS est représenté dans la (**Figure III.9**) (Pannala et al. 2001).

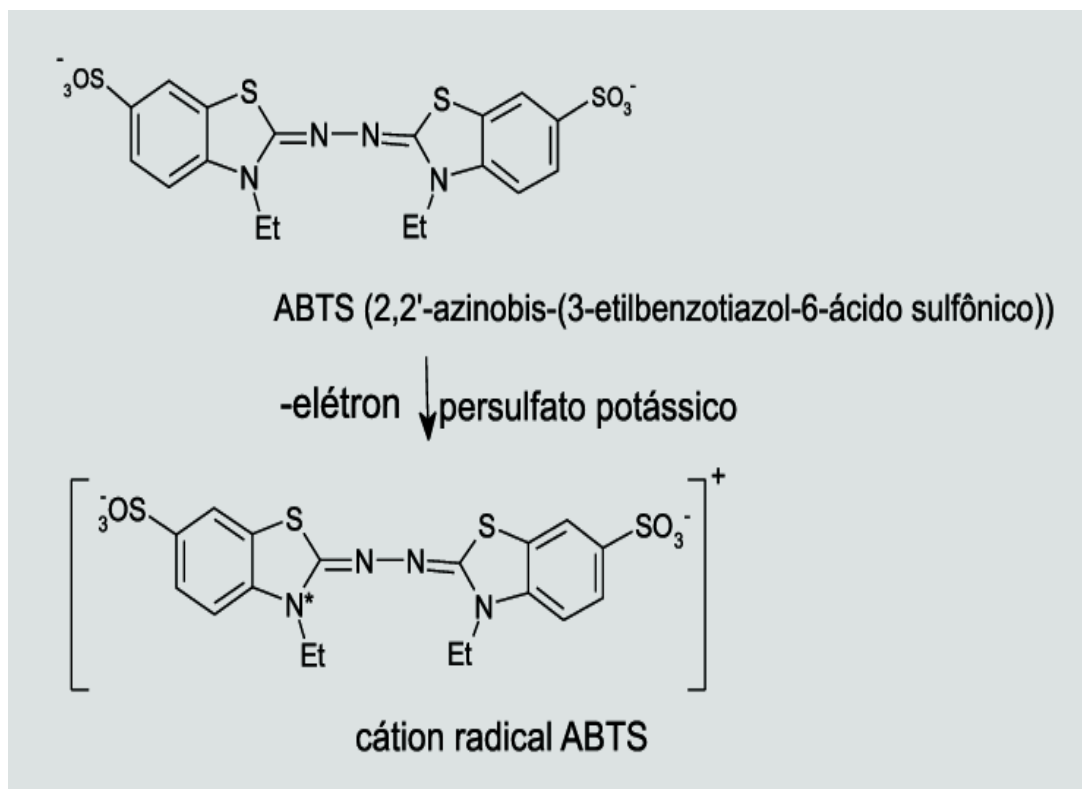


Figure III.9 : Formation du radical cation ABTS^{•+} à partir de l'ABTS (Pannala *et al.* 2001).

c. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

→Principe

La méthode de CUPRAC a été développée par (Apak *et al.*, 2006). Ce dosage est basé sur la réduction de Cu^{+2} en Cu^{+} par l'action combinée de tous les antioxydants ou réducteurs dans un milieu aqueux-éthanolique (pH 7.0) en présence de Neocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phenanthroline), par les polyphénols, donnant un complexe Cu^{+} avec un pic d'absorption maximale à 450 nm (Figure III.10) (Gülçin, 2008 ; Lee *et al.*, 2011). Cette méthode peut être utilisée pour la détermination de la capacité antioxydante du constituant alimentaire par le complexe Cu^{+2} -Neocuproïne (Cu^{+2} -Nc) en tant que réactif oxydant chromogène.

Le neocuproïne est un composé organique hétérocyclique et un agent chélatant. Le dosage de CUPRAC est économique, rapide, stable, sélectif et approprié pour une variété d'antioxydants.

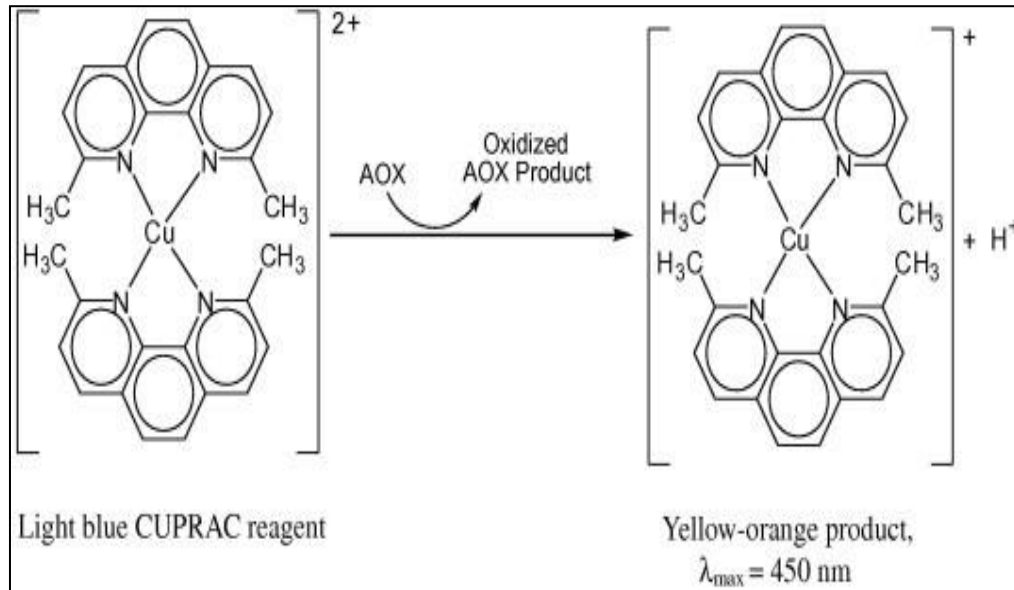


Figure III.10 : Réduction du complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc (Gülçin, 2008 ; Lee et al., 2011).

d. Test du Pouvoir réducteur

→Principe

L'activité reducing power était déterminée par la méthode de réduction du dosage de puissance (Oyaizu et al., 1986). Les substances, qui ont un potentiel de réduction, réagissent avec ferricyanure de potassium (Fe^{+3}) pour former du ferrocyanure de potassium (Fe^{+2}), qui réagit ensuite avec le chlorure ferrique pour former un complexe ferreux qui a un maximum d'absorption à 700 nm. ((Figure III.11).

Dans ce test, la couleur jaune de la solution d'essai change à différentes nuances de vert et de bleu, selon la réduction du pouvoir de chaque composé.

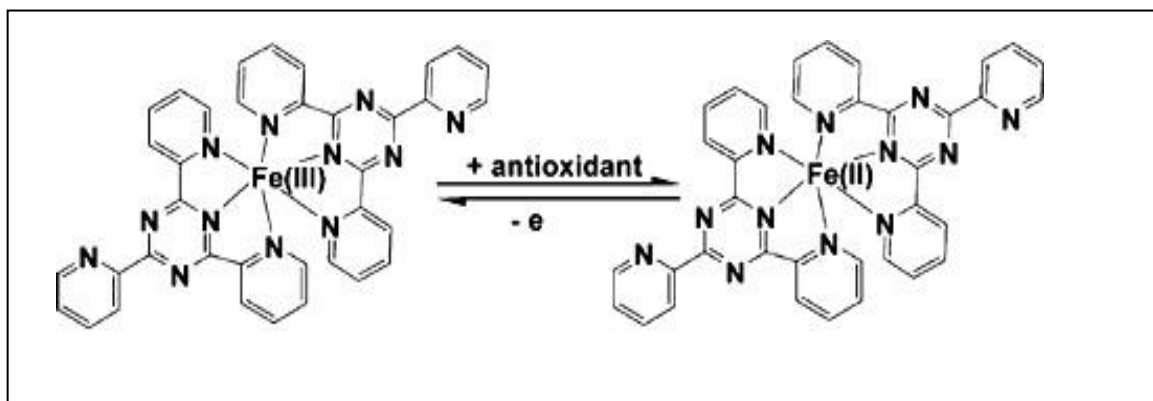


Figure III.11 : Réaction redox pour le complexe ferrique dans le test FRAP (PRIOR et al., 2005).

III. Activité enzymatique

1. Action Anti-Alzheimer

- **Activité Anti-cholinestérase**

L'acétylcholinestérase (AChE) est l'enzyme responsable de la métabolisation de l'acétylcholine, neurotransmetteur du système cholinergique qui est impliqué notamment dans les fonctions cognitives. L'inhibition de cette enzyme va engendrer une diminution du turnover de l'acétylcholine et donc augmenter les effets cholinergiques. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont utilisés pour diminuer les symptômes de la maladie d'Alzheimer.

Dans la Maladie d'Alzheimer (MA), les cellules nerveuses se détériorent progressivement, surtout celles produisant de l'acétylcholine, substance importante pour la mémoire. On a montré qu'il existe une baisse de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau de patients atteints de MA. Les anti-cholinestérasiques diminuent l'activité de l'acétylcholinestérase, enzyme détruisant l'acétylcholine. Leur action favorise donc l'élévation de la concentration d'acétylcholine dans le cerveau.

L'activité Acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase est déterminée par la méthode d'Ellman (**Ellman et al., 1961**) (**Figure III.12**).

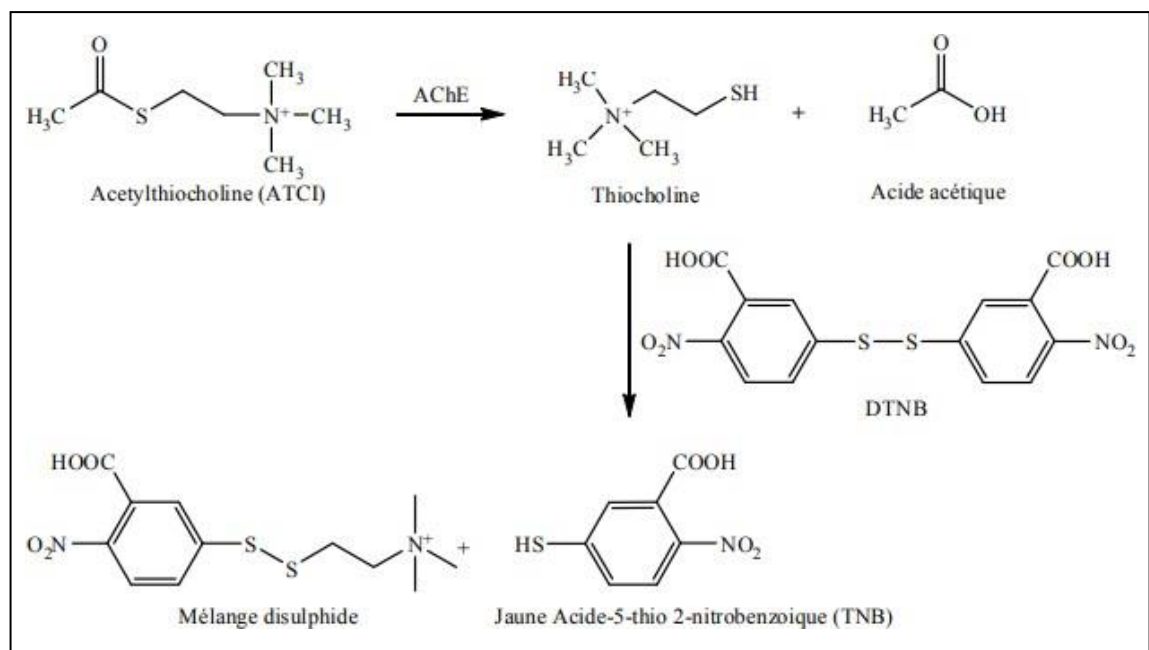


Figure III.12 : Mécanismes chimiques de la méthode d'Ellman. (**Ellman et al., 1961**)

IV. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses en trois essais. Les valeurs de CI50 (Concentration d'inhibition à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA uni-varié. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05.

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I

Matériel et Méthodes

Le présent travail porte sur une étude phytochimique de l'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus*, afin de quantifier les métabolites secondaires en particulier, les polyphénols et flavonoïdes contenus dans cet extrait, et évaluer leur effet antioxydant et enzymatique *in vitro*. Pour cela, la partie expérimentale de ce travail a été réalisée comme suit :

- Une première partie qui concerne l'extraction de notre plante qui a été faite au laboratoire de chimie
- Une deuxième partie qui est consacrée à l'évaluation des divers activités biologiques, qui ont été réalisées au laboratoire 02 de Biochimie, au niveau du Centre National de Recherche en Biotechnologie « CRBt », Nouvelle Ville –Constantine.

I. Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée la fin de novembre 2019. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri de la lumière, les parties aériennes (tiges, feuilles, fleurs) ont été coupées en petits morceaux et pesées (93g).



Figure I.1 : L'espèce *Ranunculus bullatus*.

II. Méthodes d'étude

II. 1. Analyses phytochimique

- **Extraction de la plante**

Après broyage de 93 g des parties aériennes sèches de notre espèce, la matière végétale a subi une macération avec un solvant polaire qui est l'éthanol pendant 6 heures, cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant et les filtrats sont combinés et concentré à sec, sous vide à basse température (< 45°C). Après concentration on a obtenu notre extrait éthanolique.

III. Étude quantitative

III. 1. Dosage des polyphénols totaux TPC (Total Phenolic Content)

- **Principe**

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi et al., 1965).

Les propriétés colorimétriques du réactif de Folin- Ciocalteu sont modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules comme la fonction OH des phénols. Ce réactif est formé d'acide phosphomolybdique $12\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ et d'acide phosphotungstique $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ qui sont réduits par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène $\text{W}_8 \text{O}_{23}$ et de molybdène $\text{Mo}_8 \text{O}_3$, cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleu foncé (Wong et al., 2006). La coloration bleue est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

- **Protocol expérimental**

La teneur en polyphénols totaux est déterminée selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par (Muller et al., 2010), avec une légère modification.

1 mg d'extrait est dissout dans un volume de 1 ml de méthanol.

A un volume de 20µl d'échantillon, sont ajoutés 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois dans l'eau distillée (1/10), puis 75 µl de la solution de carbonate de

sodium (Na_2CO_3) à une concentration de 7.5 % dans les puits d'une microplaque de 96 puits.

Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 2h à température ambiante, puis la lecture est faite à une longueur d'onde de 765 nm.

Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). Les tests ont été effectués trois fois pour une fiabilité des résultats.

- **Teneur en Polyphénols Totaux (TPC)**

La quantification des polyphénols totaux a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage, réalisée par l'acide gallique à différentes concentrations (25-200 $\mu\text{g/ml}$) et dans les mêmes conditions que les extraits.

Le résultat est exprimé en μg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg d'extrait), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée.

Selon la formule suivante :

$$TPC = \frac{c \cdot v}{M}$$

Avec :

C : [a.g] $\mu\text{g/ml}$.

V : Volume d'extrait (ml).

M : Poids de l'extrait (mg).

III. 2. Dosage des Flavonoïdes Totaux, TFC (Total Flavonoid Content)

- **Principe**

La méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans ces extraits (Athamena et al., 2010), basé sur la formation d'un complexe entre Al^{+3} et les flavonoïdes (Topçu et al., 2007).

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure

d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**RibereauGayon et al., 1968**).

- **Protocol expérimental**

La méthode de (**Topçu et al., 2007**) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

1 milligramme d'extrait est dissout dans un volume de 1 ml de méthanol.

A un volume de 50µl d'échantillon, on ajoute 130 µl de méthanol (MeOH), 10 µl de potassium acétate (CH₃COOK) préparé dans l'eau et 10 µl de la solution aqueuse de nitrate d'aluminium (Al (NO₃)₃, 9H₂O). L'absorbance est lue à 415 nm, après incubation à température ambiante pendant 40 min.

Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50µl extrait + 150µl méthanol).

- **Teneur en Flavonoïdes Totaux (TFC)**

La quantification des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (25-200 µg/ml), comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en µg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait), en utilisant l'équation de la régression linéaire de courbe d'étalonnage tracée avec cette dernière.

En appliquant la formule suivante :

$$TFC = \frac{c \cdot v}{M}$$

Où :

C : [Q] µg/ ml.

V : Volume d'extrait (ml).

M : Poids extrait (mg).

IV. Evaluation des activités biologiques *in vitro*

- **Principe**

Pour les activités biologiques testées *in vitro* une microplaque à 96 puits, de volume 200 μ l a été utilisée et les essais répétés trois fois pour chaque dilution, sachant que leurs dispositions dans les puits se fait de la plus faible concentration jusqu'à la plus forte.

Pour toutes les lectures, les absorbances ont été mesurées via un lecteur de microplaque Multi-mode En Spire R Perkin Elmer.

- **Préparation des dilutions des extraits**

Une gamme de sept dilutions (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) a été établie pour l'extrait, en partant d'une concentration de solution mère:

1 milligramme d'extrait éthanolique est dissout dans 1ml de méthanol (solution mère). A partir de cette dernière une série de dilution a été préparé selon le **Tableau I.1**.

Tableau I.1: Série de dilution et concentration respective d'extrait.

Extrait éthanolique							
Dilution	1/1 (solution mère)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentration de la solution (mg/ml)	1	0.5	0.25	0.125	0.00625	0.03125	0.015625
Concentration dans le milieu réactionnel (μ g/ml)	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125

VI. 1. Etude de l'activité antioxydante

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante d'extrait éthanolique de la plante *Ranunculus bullatus*, six méthodes détaillées prochainement ont été réalisées.

VI. 1. 1. Activité antiradicalaire du DPPH

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH (Blois 1958), le principe de ce test se résume en la capacité de l'extrait à réduire le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette foncée, qui se transforme en coloration jaunâtre (après réduction). Cette décoloration est mesurable par spectrophotométrie (Merouane et al.2014).

- **Protocole expérimental**

Une solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, La solution est gardée à -20 C° à l'abri de la lumière avant l'utilisation.

Dans une microplaque de 96 puits, un volume de 40 µl de différentes concentrations de l'échantillon est déposé dans chaque puits, un volume de 160 µl de la solution méthanolique de DPPH est additionné par la suite. Après une période d'incubation de 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm.

- ❖ Un contrôle négatif a été préparé, en mélangeant 40 µl de méthanol avec 5 ml de la solution de DPPH.
- ❖ Les résultats de l'activité obtenus pour chacun des extraits testés sont comparés à ceux de trois standards antioxydants l'α-tocophérol, BHT et BHA à différentes concentrations.

- **Expression des résultats**

- ✓ **Calcul des pourcentages d'inhibitions**

L'activité anti radicalaire de chaque échantillon est exprimée en pourcentage d'inhibition du DPPH en utilisant la formule suivante (**Khantouche et Abderabba 2018**) :

$$\% d'inhibition_{DPPH} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs extrait}}{\text{Abs control}} \times 100$$

Avec :

- Abs Contrôle est l'absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.
- Abs Extrait est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

- ✓ **Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50)**

Le pourcentage d'inhibition est utilisé pour calculer la valeur d'IC50, qui est défini comme étant la concentration qui cause 50% de réduction de la concentration du radical libre DPPH•, elle est obtenue graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés : pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des fractions testées.

La plus faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure de l'extrait.

VI. 1. 2. Activité du piégeage du radical l'ABTS

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de (**Re et al., 1999**), avec une légère modification. Le radical ABTS•⁺ (absorbant à 734nm) est formé par arrachement d'un électron e⁻ à un atome d'azote de l'ABTS.

En présence d'antioxydant donneur de H•, l'atome d'azote concerné piège un H•, conduisant à l'ABTS⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution (**Marc et al., 2004**).

- **Protocol expérimental**

Le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ est produit par la réaction entre 7 mM de l'ABTS dans l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium.

Le mélange est mis en incubation, à l'obscurité, pendant 16 heures à température ambiante. Avant l'utilisation du radical $ABTS^{\bullet+}$ la solution obtenue est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,020$ à 734 nm.

160 μ l de la solution de $ABTS^{\bullet+}$ sont ajoutés à 40 μ l de la solution d'extrait à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance est mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits.

- ✓ Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 40 μ l de méthanol avec 160 μ l de la solution de $ABTS^{\bullet+}$.
- ✓ Le BHA (Hydroxyanisolebutylé) est utilisé comme standards antioxydants.

✚ L'activité $ABTS^{\bullet+}$ est exprimée en pourcentage et calculée en utilisant la même équation précédemment utilisée pour la méthode du DPPH.

VI. 1. 3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre(CUPRAC)

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par (Apak et al., 2004). Le réactif de cette méthode est beaucoup plus stable que d'autres radicaux, tels que le DPPH et ABTS.

- **Protocol expérimental**

40 μ l de chaque concentration sont rajouté à 60 μ l du tampon d'acétate d'ammonium ($ACNH_4$) à (pH = 7) préparé dans H_2O , Puis 50 μ l de la solution aqueuse du chlorure de cuivre ($Cu Cl_2, 2H_2O$) et enfin 50 μ l de la solution éthanolique de la neocuproïne dans chaque puits.

La microplaque a été mise à l'abri de la lumière, et après une heure du temps, l'absorbance est mesurée à 450nm.

- ✓ Le contrôle négatif a été effectué en remplaçant les extraits par le méthanol.
- ✓ Le BHA et le BHT ont été pris comme standards antioxydants pour ce test.

- **Expression des résultats**

Une absorbance élevée correspond à un pouvoir supérieur. D'autre part, les résultats sont exprimés en concentration effective (CE_{50} , $\mu\text{g}/\text{ml}$), qui est la concentration de l'extrait indiquant 0,50 d'absorbance. La valeur de CE_{50} est obtenue par interpolation de la courbe de régression linéaire, (Mau et al., 2004).

VI. 1. 4. Activité de Phenanthroline

L'activité de Phenanthroline est déterminée par ma méthode de (Szydłowska-Czerniaka 2008).

- **Protocol expérimental**

Un volume de 50 μl de FeCl_3 à 0.2%, 30 μl de la solution méthanolique de Phenanthroline (0.5%) et 110 μl de méthanol MeOH, sont respectivement ajoutés à un volume de 10 μl de la solution à différentes concentrations.

L'incubation a été faite à 30°C pendant 20 min dans l'obscurité, les absorbances ont été mesurées à 510 nm.

- ✓ Le contrôle négatif a été parallèlement préparé dans les mêmes conditions et avec les mêmes solutions, en remplaçant seulement les extraits par le solvant de dilution le méthanol.
- ✓ Le contrôle positif est réalisé avec une solution d'un antioxydant standard le BHT.

✚ Les résultats ont été calculés tels que pour les deux tests précédents.

VI. 2. Etudes de l'activité anti-enzymatique

VI. 2. 1. Activité anti-Alzheimer ou Anti-cholinestérase(AChE)

L'activité acétylcholinestérase (AChE) a été mesurée par la méthode spectrophotométrique décrite par (Ellman et al., 1961).

- **Protocol expérimental**

Dans une microplaque de 96 puits, 150 µl de tampon phosphate de sodium, 10 µl de chaque concentration et un volume de 20 µL l'AChE sont mélangés et incubés pendant 15 min à 25C°, puis 10 µl de DTNB est ajoutés. Ensuite, la réaction est initiée par l'addition de 20 µl de l'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM).

L'absorbance est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 412 nm, pour 0 min et 15 min.

L'acétylcholinestérase hydrolyse le substrat ATCI (Iodure d'acétylthiocholine) en thiocholine et en acétate, produits non colorés. La thiocholine en présence du DTNB (acide 5, 5''-dithiobis-2- nitrobenzoïque) donne un produit jaune, le 5-thio-2-nitrobenzoate, ce qui permet de suivre la cinétique au spectrophotomètre (Mindiédiba 2012).

- ✓ Le contrôle négatif a été préparé par la substitution d'extrait par le méthanol (Méthanol avec le tampon phosphate, pH8).
- ✓ Le galantamine est utilisé comme composé de référence.

Le pourcentage d'inhibition de l'AChEa été déterminé par comparaison des vitesses de réaction des solutions d'extraits par rapport à un contrôle négatif en utilisant la formule suivante:

$$I\% = \frac{(E - S)}{E} \times 100$$

Où :

E : l'activité de l'enzyme sans extrait.

S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait.

Chapitre II

Résultats et Discussion

II. 1. Analyse quantitative

II. 1. 1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

Les valeurs des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux dans l'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus* sont exprimées en μg équivalent :

- D'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/mgE}$), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**Figure II.1**) pour le dosage des polyphénols.
- Et de quercétine (EQ) par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg E}$) (**Figure II.2**) pour le dosage des flavonoïdes.

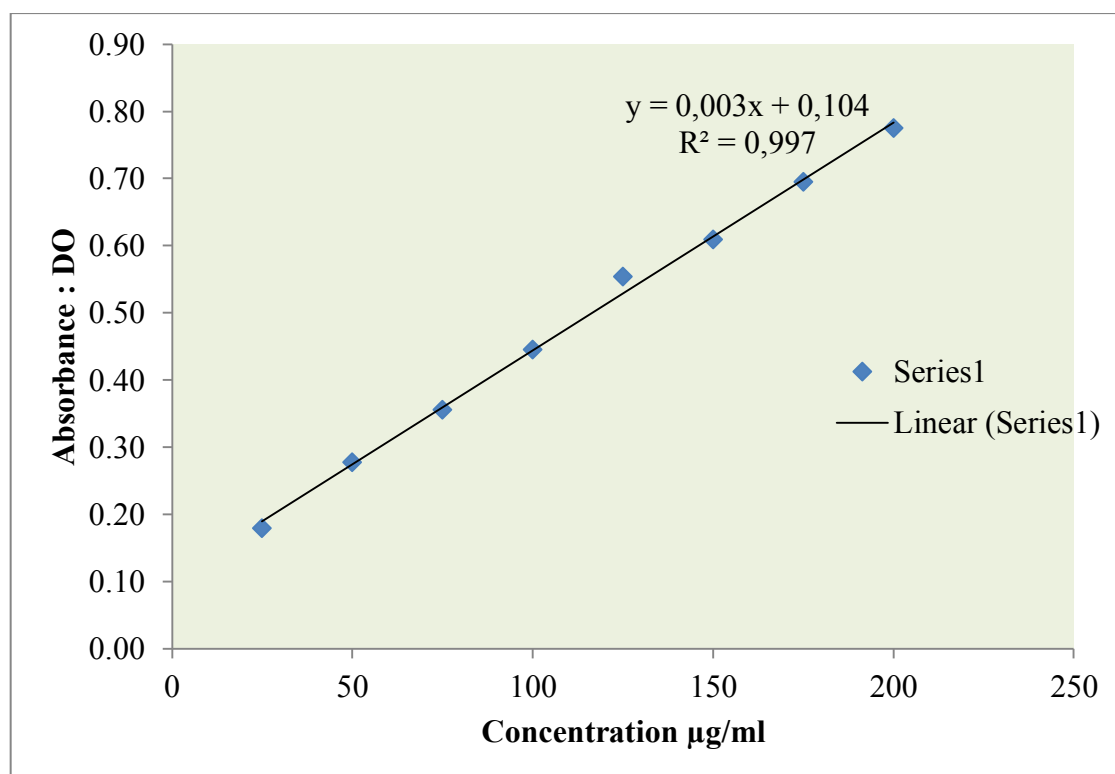


Figure II.1: Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

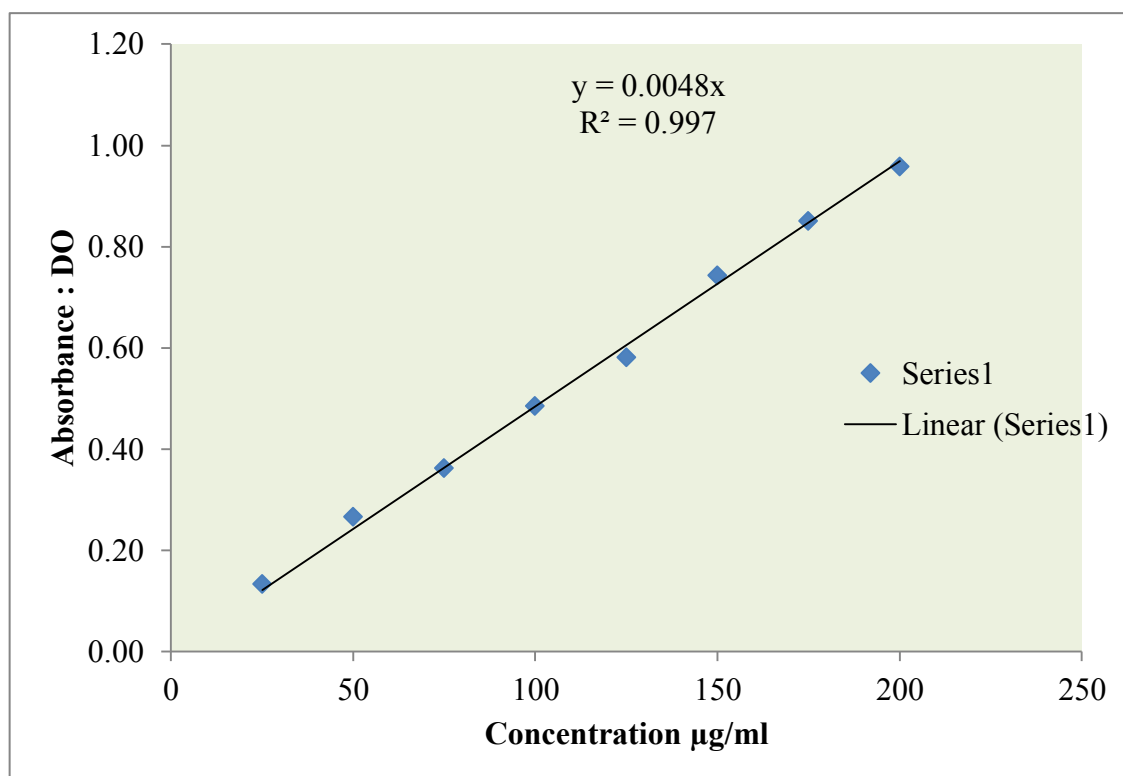


Figure II.2: Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

➤ Les résultats obtenus sont reportés dans le **tableau II.1**.

Tableau II.1: teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux dans l'extrait éthanolique de la plante *Ranunculus bullatus*.

Extrait	Teneur en phénols totaux (µg EAG /mg d'extrait).	Teneur en flavonoïdes (µg EQ /mg d'extrait)
Ethanolique	12.33±5.19	30.42±3.91

- les composés phénoliques totaux sont exprimés au µg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait éthanolique (µg GAE / mg E).
- les flavonoïdes totaux sont exprimés au µg équivalent de quercétine par mg d'extrait éthanolique (µg GE / mg E).

✚ Nos résultats montrent que la fraction éthanolique de *Ranunculus bullatus* contient une quantité faible en polyphénols avec une teneur de (12.33±5.19) µg EAG/mg d'extrait et des quantités importantes en flavonoïdes avec une teneur de (30.42±3.91) µg EQ / mg E.

En effet, plusieurs facteurs peuvent avoir un impact sur la répartition qualitative et quantitative des composés phénoliques dans les fractions tel que les propriétés génétiques ainsi qu'à l'origine géographique, les conditions et la durée de stockage, de la récolte et également les méthodes d'extraction appliquées.

Il faut noter qu'aucune études n'a été réalisée concernant le taux de polyphénols et flavonoïdes sur la fraction éthanolique, ce qui rend difficile la discussion des résultats de cette fraction.

II. 2. Evaluation des activités biologiques

II. 2. 1. Evaluation de l'activité antioxydante

Il existe de nombreuses méthodes qui diffèrent sur le plan de leurs principes d'analyse et les conditions expérimentales et les antioxydants ont des contributions différentes au potentiel antioxydant total. Pour cette raison l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits.

Quatre méthodes précédemment décrites ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante de notre extrait éthanolique

Les résultats de l'activité sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (**CI₅₀**) (DPPH, ABTS), la concentration d'absorbance 0,5 (**A_{0.50}**) (CUPRAC, Phénanthroline).

1. Test DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité anti-radicalaire des extraits de plante. Les résultats obtenus lors du test de mesure de la réduction du radical DPPH sont présentés dans le **tableau II.2**.

Tableau II.2: Inhibition du radical DPPH par l'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus*.

Extrait	% Inhibition de DPPH							
	3.125 µg	6.12 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/mL
LR	4.40±3.44	2.36±0.58	9.06±1.37	20.64±1.21	42.20±3.53	73.94±1.58	78.07±0.49	64.67±3.01
BHA	28,95±1,16	54,33±1,59	76,76±1,65	84,09±0,35	87,53±0,82	87,73±0,15	88,43±0,23	5.73±0.41
BHT	11,69±1,88	22,21±1,30	37,12±1,80	52,63±2,70	56,02±0,53	83,60±0,23	87,28±0,26	22.32±1.19

- Les résultats obtenus sont par la suite convertis en courbes comparatives **Figure II.3**.

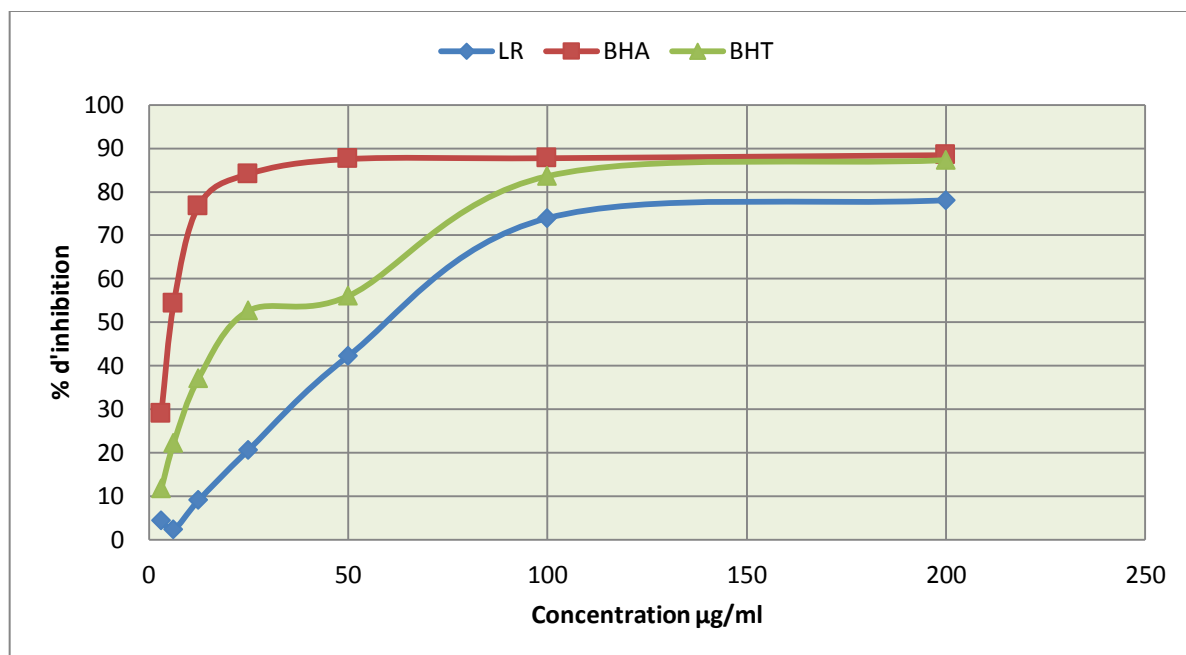


Figure II.3 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• des antioxydants de références et de l'extrait éthanolique (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Les profils de l'activité anti-radicalaire obtenue grâce à l'allure des courbes comparatives des pourcentages d'inhibition du radical DPPH par l'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus*.

En fonction de leurs concentrations respectives (**Figure II.3**), révèlent que l'extrait éthanolique commence à donner son effet à une concentration relativement faible de 3.125 $\mu\text{g/ml}$ avec un pourcentage d'inhibition de 4.40, atteint son IC₅₀ à une concentration de (64.67 \pm 3.01) $\mu\text{g/ml}$ et plafonne à une concentration de 200 μg avec 78.07% de pourcentage d'inhibition.

Le premier constat tiré de la (**Figure II.3**), est que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour les standards (BHA, BHT) ou pour l'extrait de la plante.

On a remarqué que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'extrait était inférieur à ceux des standards pour toutes les concentrations utilisées.

L'effet scavengers des extraits vis-à-vis du radical DPPH• est exprimé par la concentration inhibitrice de 50 % (IC₅₀) qui correspond à la concentration nécessaire pour

inhiber ou réduire 50% de DPPH•. Une valeur faible d'IC50 indique une activité antioxydante forte.

Nous avons déterminés pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical libre DPPH ou IC50. À partir des équations des régressions linéaires des graphes. Les valeurs des IC50 issus de l'extrait en comparaison avec des antioxydants existants sur le marché : BHA et BHT sont résumées dans l'histogramme (**Figure II.4**)

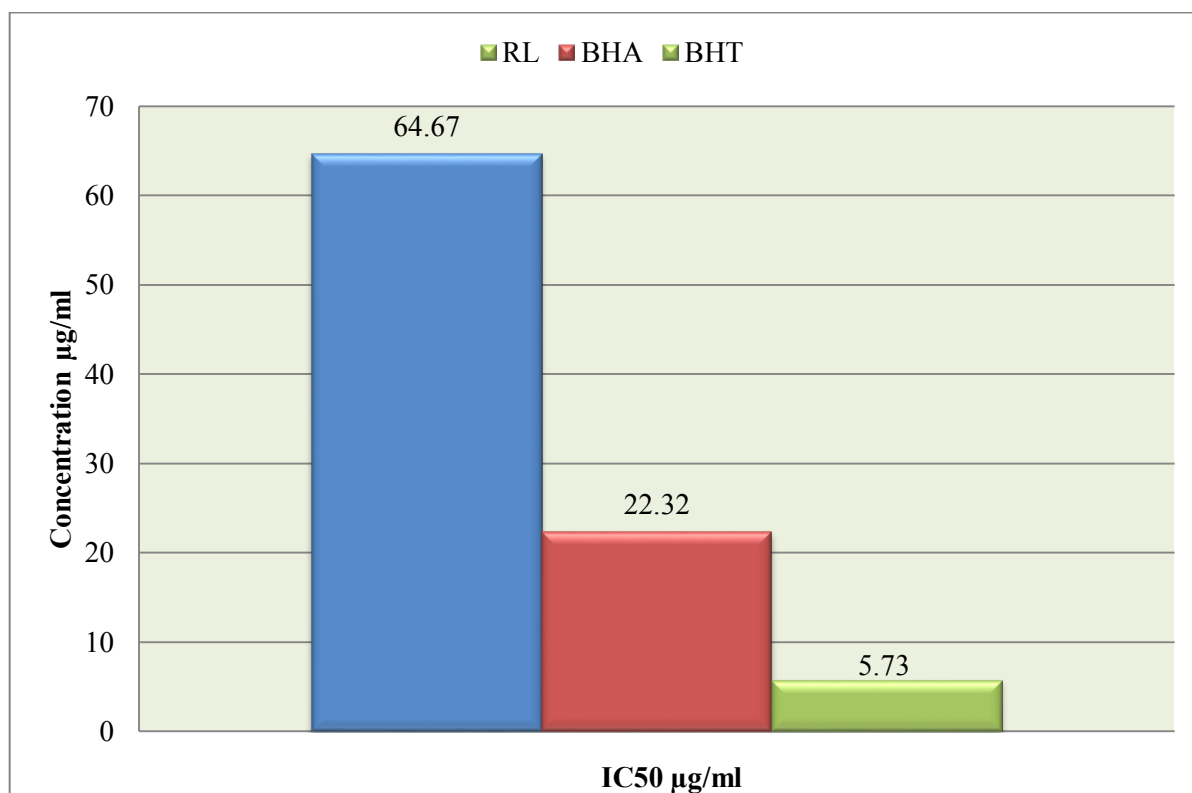


Figure II.4 : Valeurs des IC50 issus de l'extrait comparativement aux standards.

Ces résultats indiquent clairement que l'IC50 obtenu pour BHA et BHT utilisés comme des molécules de référence, est bien plus inférieur à celui de l'extrait éthanolique. Donc ces antioxydants standards, présentent une meilleure efficacité anti-radicalaire que notre extrait.

Nous n'avons pas trouvé de travaux similaires sur l'espèce *Ranunculus bullatus* et son genre *Ranunculus* ayant étudié le potentiel DPPH d'un extrait éthanolique.

Cependant, des études menées par **El-Agbar et al (2008)** et **Marlod et al (2009)**, concernant une plante de la famille des Renonculaceae : *Nijella sativa* montre que dans le test DPPH, l'extrait méthanoïque a présenté une faible activité antioxydante (IC50 : $168,8 \pm 2,1$ µg / ml et 2260 µg / ml) respectivement.

2. Test du piégeage du radical ABTS

L'activité scavenger de notre extrait est également étudiée en utilisant l'ABTS. Ce dernier réagit avec le persulfate de potassium pour donner le radical $ABTS^{\bullet+}$. La génération du radical avant l'ajout de l'extrait est nécessaire afin d'éviter l'interférence des composés dans la formation du radical ce qui conduit à une surestimation de la capacité antioxydante. L'ajout de l'extrait ou des standards (BHA, BHT) entraîne une décoloration de la solution indiquant l'existence d'une activité scavenger.

Les résultats obtenus exprimés en termes de concentration inhibitrice sont présentés dans le **tableau II.3** :

Tableau II.3 : Activité antiradicalaire (ABTS) de l'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus*.

Extrait	% Inhibition ABTS							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/mL
LR	6.76±0.78	14.35±0.90	23.81±0.70	41.52±1.64	63.84±3.45	86.77±1.93	91.05±0.14	49.07±2.70
BHT	59.22±0.59	78.55±3.43	90.36±0.00	92.18±1.27	93.37±0.86	94.87±0.87	96.68±0.39	1.29±0.30
BHA	83.42±4.09	93.52±0.09	93.58±0.09	93.63±0.16	93.63±0.95	94.20±0.90	95.39±2.62	1.81±0.10

- Les résultats obtenus sont illustrés sous forme de courbes de pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus*. (**Figure II.5**)

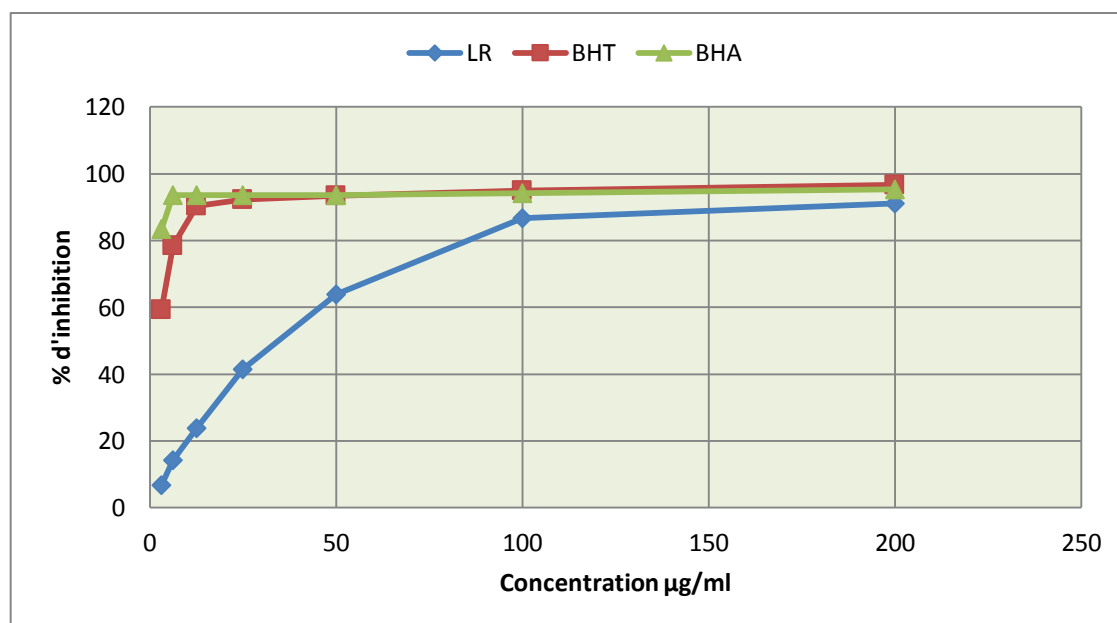


Figure II.5: Effet scavengers contre le radical $ABTS^{\bullet+}$ de l'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus*.

D'après les résultats obtenus, on remarque que le pourcentage d'inhibition pour l'extrait est inférieur à ceux des standards pour toutes les concentrations utilisées, avec un départ à la concentration de 3.125 $\mu\text{g/ml}$ et une inhibition de 6.76%, il atteint son IC_{50} à (49.07 ± 2.70) $\mu\text{g/ml}$ et plafonne son activité de 91.05% à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$.

- Les valeurs comparatives des IC_{50} obtenus sont présentées à l'aide d'un l'histogramme (Figure II.6) :

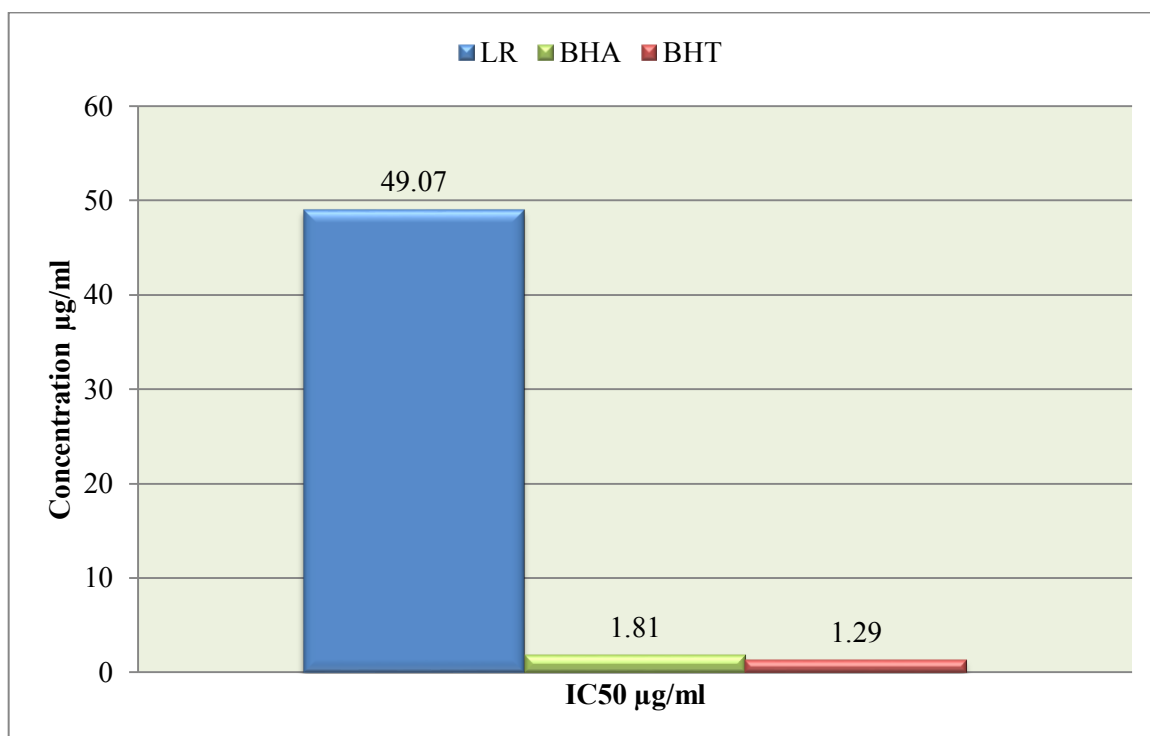


Figure II.6: valeurs des IC_{50} issu de l'extrait comparativement aux standards pour le test ABTS.

En conclusion, l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de la plante *Ranunculus bullatus* évaluée par le test ABTS, est présentée par la valeur IC_{50} qui est la concentration nécessaire de l'extrait pour inhiber 50% du radical ABTS, ces résultats sont comparés avec les deux standards utilisés BHA et BHT qui ont des IC_{50} de (1.81 ± 0.10) $\mu\text{g/ml}$ et (1.29 ± 0.30) $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Ce qui donne une estimation faible pour l'extrait éthanolique (49.07 ± 2.70) $\mu\text{g/ml}$, donc il a été beaucoup moins actif par rapport aux deux standards.

Il est possible de dire que les deux standards possèdent une activité inhibitrice du cation ABTS^+ plus grande que celle de l'extrait.

3. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Cette méthode est basée sur la mesure de l'absorbance à 450 nm, après la formation d'un complexe stable entre les ions néocuproïne et le cuivre (I). Ce complexe est produit par la réduction des ions du cuivre (II) par les composés potentiellement antioxydants.

Les résultats sont par la suite calculés à titre de A_{0.5} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0.50 d'absorbance. Ils sont présentés dans le **tableau II.4** :

Tableau II.4: Valeurs de l'absorbance de BHT, BHA et l'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus*.

Extrait	Absorbances de CUPRAC							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0.50} (µg/mL)
RL	0.30±0.02	0.36±0.01	0.41±0.02	0.57±0.01	0.80±0.04	1.07±0.07	1.87±0.16	20.18±1.37
BHA ^b	0.46±0.00	0.78±0.01	1.34±0.08	2.36±0.17	3.45±0.02	3.76±0.03	3.93±0.01	3.64±0.19
BHT ^b	0.19±0.01	0.33±0.04	0.66±0.07	1.03±0.07	1.48±0.09	2.04±0.14	2.32±0.28	9.62±0.87

*A_{0.50} : la concentration à l'absorbance 0,5.

- Les résultats obtenus sont par la suite convertis en une courbe comparative (**Figure II.7**).

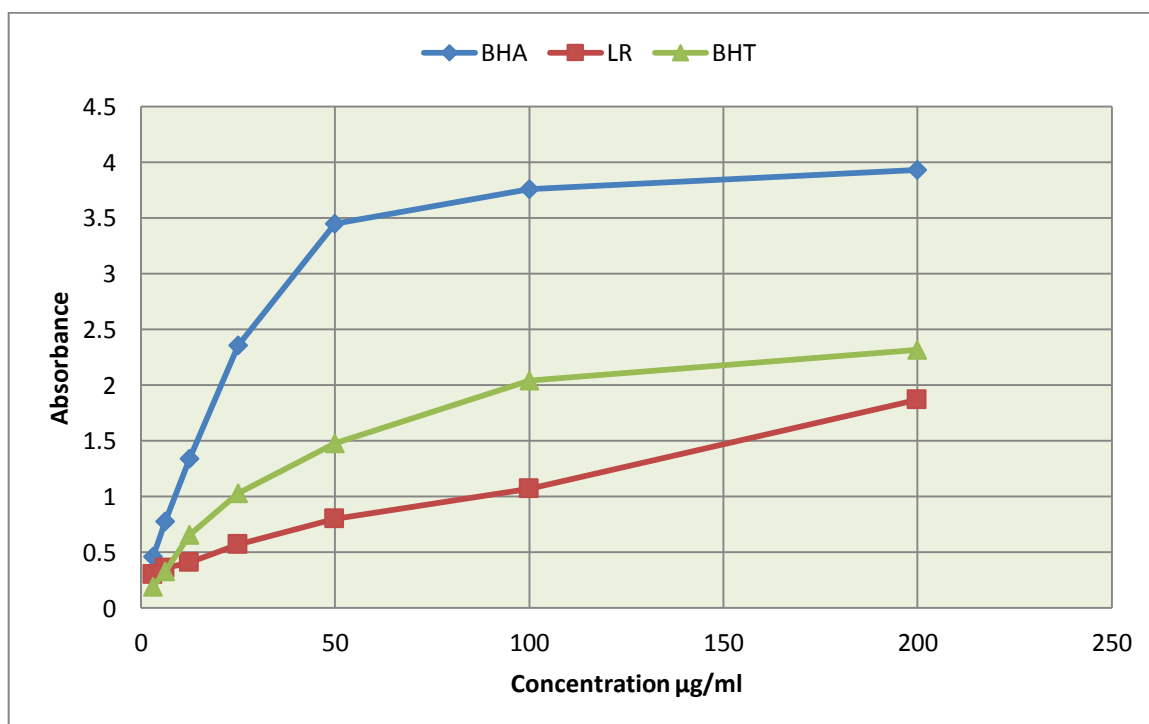


Figure II.7 : Courbe d'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de *Ranunculus bullatus*.

La capacité de réduction de l'extrait éthanolique de la plante *Ranunculus bullatus* a été comparée à celles de BHA et BHT.

D'après ces résultats, on remarque que l'absorbance augmente avec l'augmentation de la concentration. L'effet réducteur d'extrait éthanolique commence à une concentration de 3.125 µg/ml et présente déjà une absorbance de 0.30, il atteint son A0.5 avec une concentration de (20.18±1.37) µg/ml, pour aboutir à sa réduction maximale avec une absorbance de 1.87 à la concentration 200 µg/ml. Les valeurs d'absorbance de l'extrait éthanolique est loin de BHT et BHA.

Pour évaluer l'effet antioxydant d'un composé, il faut le comparer avec les antioxydants les plus puissants existant au marché, l'histogramme suivant permet de faire cette comparaison (**Figure II.8**).

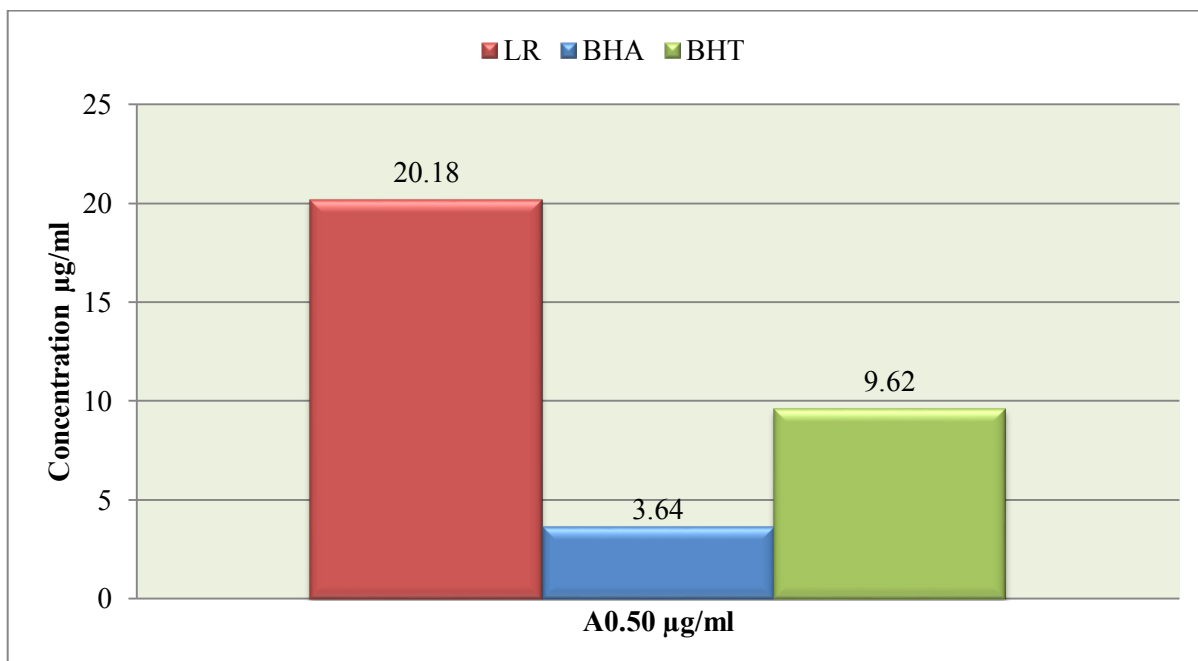


Figure II.8: les concentrations de l'extrait et standards obtenus à l'absorbance 0.50.

L'effet réducteur de l'extrait est présenté par la valeur de concentration à l'absorbance 0.50, l'extrait éthanolique présente la concentration la plus grande avec une valeur de 20.18 µg/ml comparativement aux standards, on peut dire que l'extrait éthanolique a révélé d'être capable de réduire le cuivre. Toutefois les deux standards montrent un pouvoir réducteur de cuivre plus important que celui de l'extrait éthanolique.

Il n'y a pas des études qui expliquent le pouvoir réducteur CUPRAC des extraits éthanolique du genre *Ranunculus*.

4. Activité Phenanthroline

Tableau II.5 : Absorbances de l'extrait éthanolique de la plante *Ranunculus bullatus* par l'activité de Phenanthroline.

Extrait	Absorbances de l'activité Phenanthroline							
	0.78125 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	A _{0.5} µg/mL
LR	0.29±0.00	0.31±0.00	0.33±0.01	0.37±0.01	0.43±0.03	0.53±0.02	0.80±0.01	22.36±2.17
BHA	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	0,93±0,07
BHT	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	2,24±0,17

*A_{0.5} : la concentration à l'absorbance 0,5.

- Les résultats obtenus sont par la suite présenté (**Figure II.9**).

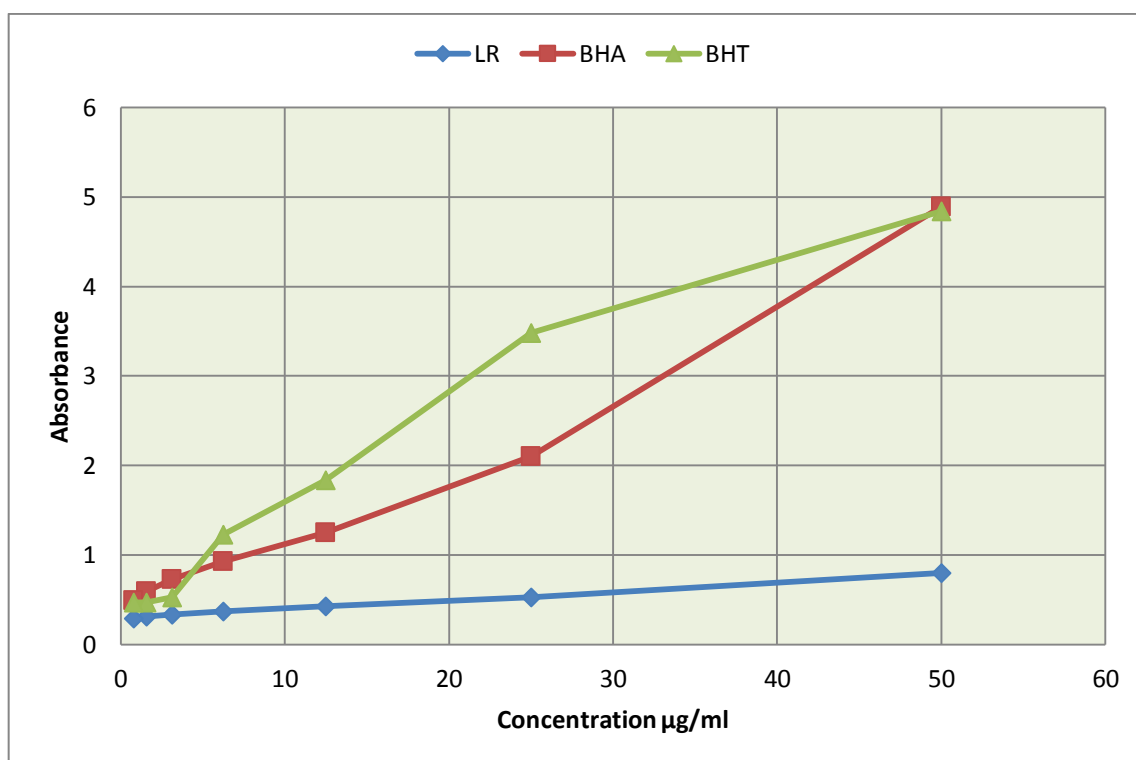


Figure II.9 : Courbe comparative des absorbances de l'activité Phenanthroline.

D'après ces résultats, on remarque que l'absorbance augmente avec l'augmentation de la concentration. Les valeurs d'absorbance de l'extrait éthanolique est loin de BHT et BHA avec une absorbance de 0.29 à la concentration de 0.78125 µg/ml, abouti à son A_{0.5} à la concentration de 22.36 µg/ml et continue son effet réducteur avec une absorbance de 0.80 à la concentration 50µg/ml.

- Les résultats obtenus sont par la suite exprimés en termes de A0.5 ($\mu\text{g/ml}$).

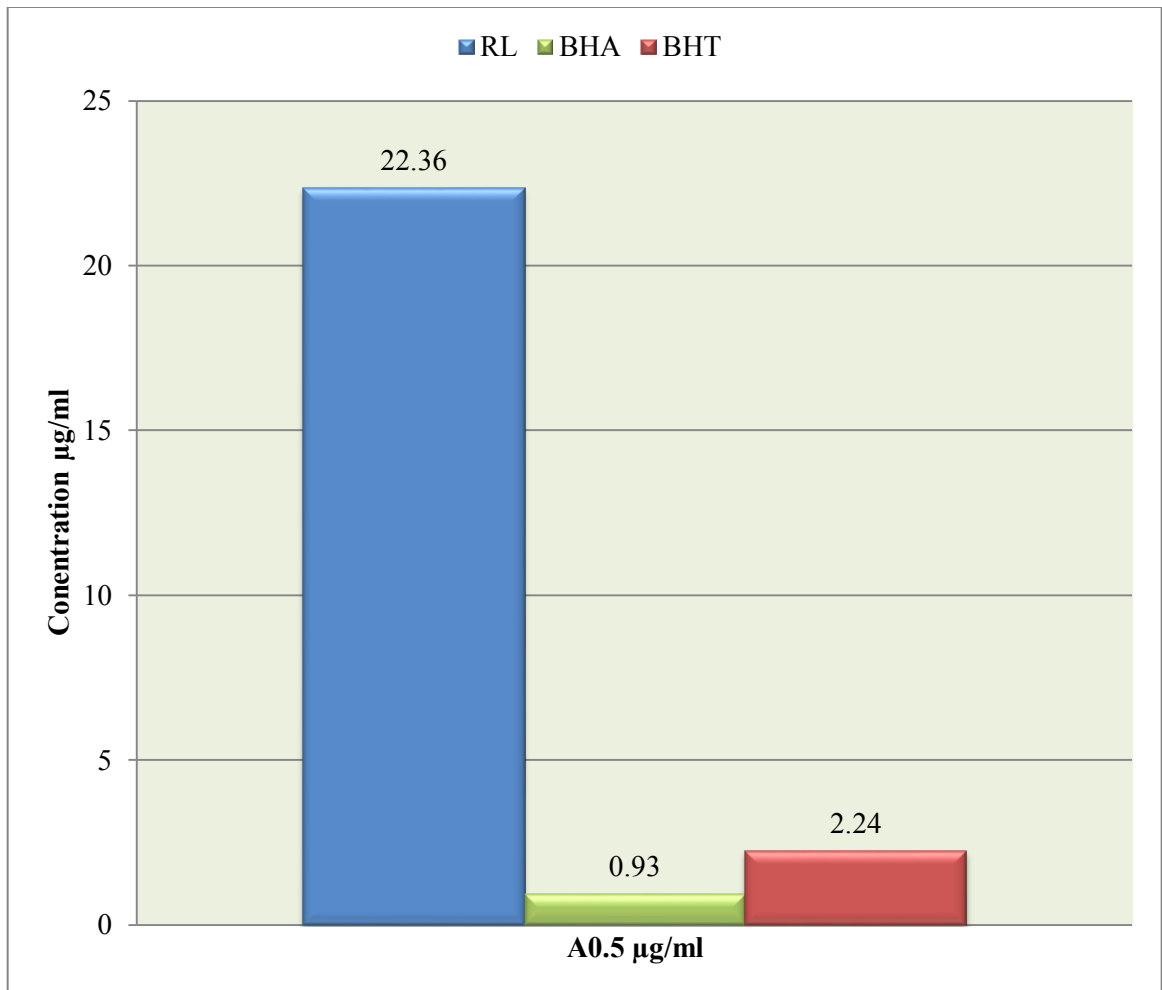


Figure II.10: présentation des valeurs des IC₅₀ de l'extrait éthanolique de la plante *Ranunculus bullatus* en comparaison avec les standards.

L'extrait éthanolique de la plante *Ranunculus bullatus* présente un effet réducteur trop loin des deux standards utilisés le BHA et le BHT.

II. 2. 2. Évaluation de l'activité enzymatique

1. Activité anticholinestérase

L'apparition de la couleur jaune indique que l'extrait ne possède aucune activité anticholinestérase (**Figure II.11**).

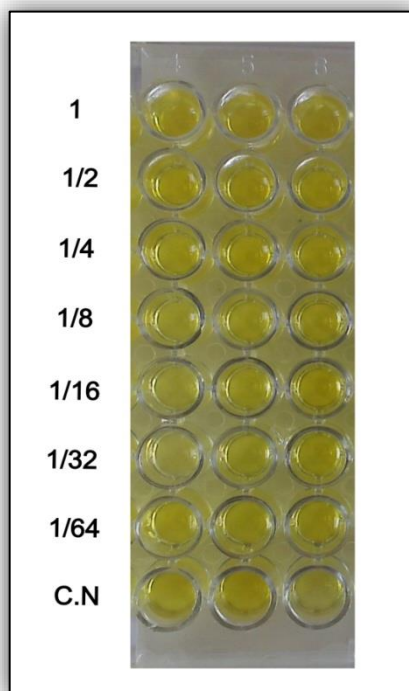


Figure II.11 : Microplaques de dosage de l'Activités anticholinestérase.

Tableau II.5 : Pourcentage d'inhibition de l'AChE.

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE							
Concentration	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg
	1.97	-20.09	-74.27	-21.00	-56.30	-33.83	-35.60

D'après le **Tableau II.5**, le pourcentage d'inhibition de l'AChE est négatif avec l'augmentation de la concentration de l'extrait éthanolique.

Conclusion générale

Cette étude visait d'abord à valoriser et promouvoir les plantes médicinales d'Algérie afin de faciliter l'accès des populations à des médicaments traditionnels améliorés avec moins d'effets secondaires et de risques de toxicité.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des activités biologiques des extraits éthanoliques de la plante *Ranunculus bullatus*.

Des tests biologiques d'évaluation de l'activité antioxydante ont été réalisés ainsi que l'estimation quantitative des métabolites secondaires (polyphénols et flavonoïdes). Dans la littérature peu de travaux ont étudiés l'activité des extraits de plantes, cela donne à notre travail de la nouveauté et de l'originalité.

En premier lieu, le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé que l'extrait éthanolique contient une quantité faible en polyphénols avec une valeur de : $(12.33 \pm 5.19) \mu\text{g EAG/mg}$.

De même, Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes totaux par la méthode au chlorure d'aluminium montrent également que l'extrait éthanolique présente une quantité importante en flavonoïdes avec une valeur de : $(30.42 \pm 3.91) \mu\text{g EQ / mg E}$.

Il faut noter qu'aucune étude n'a été réalisée concernant le taux de polyphénols et flavonoïdes sur la fraction éthanolique.

Par la suite, une série de tests biologiques a été réalisée *in vitro* afin d'évaluer le potentiel antioxydant de l'extrait étudié par quatre méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, le test ABTS, le test CUPRAC, et la méthode Phenanthroline. Présentant les résultats suivants :

Tests	DPPH	ABTS	CUPRAC	Phenanthroline
Extrait	IC ₅₀ $\mu\text{g/ml}$	IC ₅₀ $\mu\text{g/ml}$	A _{0.5} $\mu\text{g/ml}$	A _{0.5} $\mu\text{g/ml}$
RL	64.67 ± 3.01	49.07 ± 2.70	20.18 ± 1.37	22.36 ± 2.17

Les résultats de cette étude ont montré que l'extrait étudié a un potentiel antioxydant faible et qu'il est proportionnel à l'augmentation de la concentration des extraits.

Le test de l'activité anticholinestérase, réalisé sur l'extrait a montré que ce dernier ne possède aucune capacité d'inhibition de l'AChE.

En perspectives plusieurs travaux peuvent être envisagés dans la continuité des travaux entamés :

- Des tests biologiques supplémentaires seront nécessaires pour vérifier les activités nouvelles et bénéfiques de cette plante.
- Faire des études précliniques *in vivo* afin de prouver les résultats obtenus *in vitro*.
- Essayez d'ajuster les doses de l'extrait étudié.
- De développer le spectre des activités biologiques ciblées, en incluant les activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires ou autres.
- Des essais complémentaires seront nécessaires afin de pouvoir confirmer les activités mises en évidence.

Références

Abderrazak M. et Joël R., (2007). La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. p:177. ISBN 10: 2100506382.

Angiosperm Phylogeny Group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II [J]. Bot J Linn Soc, 141(4): 399-436.

Apak R., Guclu" K., Ozyurek M., Karademir S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: cuprac method. Journal of Agricultural and Food chemistry. 52: 7970–7981.

Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S., Khebri S. (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminum cyminum L. Lebanese Science Journal. 11 (1): 69-81.

Attou A. (2011). Contribution à l'étude photochimique et activités biologiques des extraits de la plante Ruta chalepensis (fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.

Azzi, A., Davies, K. J. A., Kelly, F. (2004). Free redical biology- terminology and critical thinking. FEBS Letters. 558: 3-6.

Badiaga, M., (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea Latifolia Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p.

BALDINI, R. M. & JARVIS, C. E. 2002, Typification of *Ranunculus bullatus* L. (Ranunculaceae). – Bull. Nat. Hist. Mus. London (Bot.) 32(1): 7-11.

Barbour, E.K., Sharif, M.A., Sagherian, A.N., Habre, R.S., Talhouk, S.N., 2004. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology 93, 1–7.

Baril, D., (2007). Les oncogènes brisent la molécule d'ADN : Une découverte de Gerardo Ferbeyre permet de mieux comprendre un mécanisme naturel de protection contre le cancer. FORUM : 41(17).

Baytop, T., (1999). Theraphy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present), 2nd ed. Nobel Tip Kitabevleri.

Beaudeau J.L., Durand G., (2011). Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives. Lavoisier (ed.). Paris. P. 127- 128.

Beddou F., (2015). Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales

sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen, Algerie.

Bediaga m., (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali .thèse de doctorat. Université de Bamako . p 10.

Beecher G. R, (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutri.*, 133 (10), 3248S-3254S.

Benkhignou et Zidane L., (2010-2011). Etude ethnobotanique des plantes Médicinales dans la région de Mechraâ B el Ksiri (Région du Gharb du Maroc), 191-216 p.

Beta, T., Nams, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H. D., (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled ubeat and roller-milled fonctions, *Cereal chem.* pp: 390- 393.

Bhandari, N.N., Asnani, S. 1966. Studies in the family Ranunculaceae. XI. Morphology and embryology of *Ceratocephalus falcatus* Per. *Beitr. Biol. Pflanz.* 45: 271–290.

Blois M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 4617 (181): 1119-1200.

Boizot N. et Charpentier.J.P., (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra.* pp : 79-82. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

Bourgou S., Serairi Beji R., Medini F., Ksouri R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology.* 28 (12): 1649-1655.

Bourobou B.H., (2004). Approches sur la contribution des médicaments traditionnels améliorés dans les soins de santé primaires : étude des cas. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 13: 35-48.

Bragazza L., & Freeman C., (2007). High nitrogen availability reduces polyphenol content in *Sphagnum* peat. *Science of the Total Environment.* 377, pp: 439–443.

Bruneton, J., (1993). *Plantes Médicinales: Phytochimie, Pharmacognosie.* 2^{ème} Ed. Lavoisier, New York, 914.

Bruneton, J., (1999) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.* 3^{ème} Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575.

Cameron, E., & Pauling, L., (1976). Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(10), 3685–3689.

Cao, B.J., Meng, Q.Y., (1992). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Ranunculus japonicus* extract. *Planta Medica* 58, 496–498.

Cole, G.M., Lim, G.P., Yang, F., Teter, B., Begum, A., Ma, Q., Harris-White, M.C.,

Frautschy, A., (2005). Prevention of alzheimer's disease: omega-3 fatty acid and phenolic antioxidant interventions. *Neurobiology of Aging*. 26: 133-136.

Dacosta Y., (2003). Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. p: 317.

De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T, (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: pp: 31-63.

Dehak K., (2013). Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles. Université KASDI Merbah Ouargla.

E madzade, K., Gehrke, B., Peter Linder, H., & Hörandl, E. (2011). The biogeographical history of the cosmopolitan genus *Ranunculus* L. (Ranunculaceae) in the temperate to meridional zones. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58(1), 4–21. doi:10.1016/j.ympev.2010.11.002.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., and Curini, M., (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*; 68: pp: 939-953.

Erzengin, M., Basaran, I., Cakir, U., Aybey, A., Sinan, S., (2012). In Vitro Inhibition Effect of Some Dihydroxy Coumarin Compounds on Purified Human Serum Paraoxonase 1 (PON1). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 168(6), 1540-1548.

Favier, A., (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108-115.

Foti, M. C. (2015). Use and Abuse of the DPPH• Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(40), 8765–8776.

Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. G., Girao da Cruz, M. T., Cordeiro, M. N., Milhazes, N., Borges, F., Marques, M. P. M., (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg. Med. Chem.* 12, pp: 3581–3589.

França, M. B., Panek, A. D., Eleutherio, E. C. A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative biochemistry and physiology, part A*. 146 : 621-631.

Gershenson J et al., (2007). *Nature Chem Biol*, 3, 408.

- Gershenzon, J., Dudareva, N., (2007).** The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3, 408–414.
- Ghedira, K., (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, Vol 3(4) ; pp:162-169.
- Ghestem, A., Seguin, E., Paris, M., and Orecchioni, A.M, (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp:275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- Graham, T.L., (1998).** Flavonoids and flavonal glycoside metaolism in arabidopsis. *Plant physiol. biochem.* 36,pp:135-44.
- Gravot, A., (2008).** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 –L2.
- Gulçin, I., (2008).** Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L- tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids.* 32, 431-438.
- Gürhan, G., Ezer, N., (2004).** Plants used for hemorrhoid treatment in folk medicine I. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 24, 37–55.
- Halliwell, B., Aruoma, O.I., (1993).** DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement using chromatographic methods. In *Molecular Biology of Free Radicals Scavenger System.* (JG Scandalios, ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. NewYork. 47-67.
- HAO, D.-C., XIAO, P.-G., MA, H.-Y., PENG, Y., & HE, C.-N. (2015).** Mining chemodiversity from biodiversity: pharmacophylogeny of medicinal plants of Ranunculaceae. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(7), 507–520.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1,pp: 3-6.
- Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Culham, A., Seberg, O., (2007).** *Plant families of the world.* Richmond Hill, Ontario, Canada: Firefly Books.
- Hopkins, G.W., et Evrard, C-M., (2003).** *Physiologie végétale.* De Boeck Université, ed, p. 532.
- Hörandl, E., Paun, O., Johansson, J.T., Lehnebach, C., Armstrong, T., Chen, L., Lockhart, P., (2005).** Phylogenetic relationships and evolutionary traits in *Ranunculus* s.l. (*Ranunculaceae*) inferred from ITS sequence analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36, 305–327.
- Houël Emeline., (2011) :** Etude De Substances Bioactives Issues De La Flore Amazonienne, Thèse de Doctorat, Spécialité : Chimie des Substances Naturelles Université de Guyane.
- Howes, M.J.R., Perry, N.S.L., Houghton, P.J., (2003).** Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of alzheimer’s disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research.* 17: 1-18.
- Hudson, B.J.F., (1990).** *Food antioxidants.* Elsevier Applied Science (ed.). London. P. 309.

Januel, C., (2003). Stress Oxydant Au Niveau Des Plaquettes Sanguines Humaines Dans Le Contexte Du Diabete : Etude Du Glutathion Et De La Glutathion Péroxydase 4. Thèse Doctorale : Biochimie. Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé. Université Lyon I/ INSA-Lyon. N° : 03-ISAL-0024. 41–50.

Jeun, J. M., Annie. F., Chrystian. J. L., (2005). les composés phénoliques des végétaux, p203- 204.

Khantouche L., Abderabba M., (2018). Dosage des polyphénols et étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des différents extraits des feuilles du *Globularia alypum* L. IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT). 12 (1): 68-74.

keating, G.J., O’Kennedy, R., (1997). The chemistry and occurrence of coumarins. R. O’Kennedy, R.D. Thornes (Eds.), Coumarins: biology, applications and mode of action, Wiley Press, Chichester, UK. 23-66.

Kueny-Stotz, M., (2008). Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylum sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Chimie organique, Université Louis Pasteur Strasbourg, France. p54.

Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J.P., (1994). Biogénèse des monoterpènes : la chaîne isoprénique. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 133 : 79 – 99.

Lebham., (2005). Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale(UBO).

Lee, C., Chiang, L., Cheng, L., Liaw, C., Abd El-Razek , M.H., Chang, F., Wu, Y. (2009). Influenza A (H1N1) Antiviral and Cytotoxic Agents from *Ferula assa-foetida*. Journal of Natural Products. 72(9), 1568-72.

Levesque, E., (2006). Oligo-Elements Et Stress Oxydant. Alimentation & Santé. Actualités IMAAGE : p. 1–5.

Liu Z, et al., (2003) Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. Mol Cell 12(2):401-11.

Louis, S., (2004). Diversité structural et d'activité biologique des Albumines sentomotoxiques de type 1b des légumineuses. Thèse de doctorat. Lyon, p.259.

Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K., and Biro, L., (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. J. Acta biologica. szegediensis. 47 (1-4) pp:119-125.(Cited in Mohammedi Z, 2005).

Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V., Biro, L., (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. BiologicaSzegedientis* 1-4. pp: 119-125.

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

M. Paris, M., Hurabeille., (1986). Abrégé de matière médicale, tome2, Masson, 256-266.

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.

Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., Fritsch, P., (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine/Sciences*. 20 (4): 458-463.

Martin, S., Andriantsitohaina, R., (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51 ; pp :304-315.

Merouane, A., Noui, A., Medjahed, H., Nedjari Benhadj Ali, K., Saadi, A., (2014). Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 8 (4): 1865- 1870.

Meziti, A., (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Étude in vitro et in vivo. Mémoire de magistère. Université el-haj lakhdar batna. Département des Sciences Biologiques. P, 41-49.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *PharmacolRev*,52; pp: 673-839.

Mindiédiba, J.B., (2012). Etude photochimique et activité biologiques des tiges feuillées de *Lantana camara* L. et de *Lippia chevalieri* moldenke : deux verbenaceae du Burkina FASO. Thèse de doctora. Université Ouagadougou.

Moon, J.-K., & Shibamoto, T., (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655–1666.

Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J. p., Canaud, B., (2002). Stress oxydant, hémoincompatibilité et complication de la dialyse au long cours. *Néphrologie*. 5; pp:201-208.

Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., Böhm, V., (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*. 43: 992–999.

Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., (1996). Herbal Medicines. Pharmaceutical Press, London.

Organisation mondiale de la santé, (2003). K.P. Stenart B, editor(ed), World cancer rapport Lyon, Larc Press, PP.11.

Orhan, I., Sener, B., Atıcı, T., Brun, R., Perozzo, R., Tasdemir, D., (2006). Turkish fresh water and marine macrophyte extracts show in vitro antiprotozoal activity and inhibit Fab I, a key enzyme of Plasmodium falciparum fatty acid biosynthesis. *Phytomedicine* 13, 388–393.

Osman, A. E.; Bahhady, F.; Hassan, N.; Ghassali, B.; AL Ibrahim, T., (2006). Livestock production and economic implications from augmenting degraded rangeland with *Atriplex halimus* and *Salsola vermiculata* in northwest Syria. *J. Arid Environ.*, 65 (3): 474-490.

Oyaizu, M., (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics.* 44, 307-315.

Öztürk, M., Kolak, U., Topcu, G., Oksuz, S., Choudhary, M.I. (2011). Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radicalscavenging activity-guided fractionation. *Food Chemistry.* 126, 31-38.

Pannala, A.S.; Chan, S.T.; O'Brien, J.P.; Rice-Evans, A.C. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.282, n.5, p.1161-1168.

Park, W. H., Han, Y. W., Kim, S. H., Kim, S. Z., (2007). A superoxide anion generator, pyrogallol induces apoptosis in As 4.1 cells through the depletion of intracellular GSH content. *Mutation Research. Model MUT-10408.* 1–12.

Peng, Y., Chen, SB., Chen, SL., et al., (2006). Preliminary pharmaphylogenetic study on Ranunculaceae [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 31(13): 1124-1128.

Peng, Y, Chen, SB, Liu, Y, et al. (2006). Pharmaphylogenetic study on Isopyroideae (Ranunculaceae) [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 31(14): 1210-1214.

Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J O., (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4 (5).

Prieto, J.M., Recio, M.C., Giner, R.M., Manez, S., Rios, J.L., (2003). Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 131–137.

Prior, R L., Wu, X., Schaich, K., (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Agric. Food Chem.* (53) : 4290-4302.

Projet de numérisation de la flore de l'Abbé Coste par le réseau Tela botanica – 2011.

Quyou, A., (2003). Mise au point d'une base de données sur les plantes médicinales. Exemple d'utilisation pratique de cette base. Thèse de Doct. Univ. Ibn Tofail. Fac. Sci. Kénitra, Maroc. 110 p.

Rabi, T., Bishayee, A., (2009). Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Research and Treatment*. 115, 223-239.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.

Riboli, E., & Norat, T., (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 559S.

Ro/nne, C., Thrane, L., Åstrand, P.-O., Wallqvist, A., Mikkelsen, K. V., & Keiding, S. R. (1997). Investigation of the temperature dependence of dielectric relaxation in liquid water by THz reflection spectroscopy and molecular dynamics simulation. *The Journal of Chemical Physics*, 107(14), 5319–5331.

Sarni-Manchado, P., Veronique, C., (2006). Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France). p:398.

Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., Van Tunen, A.J., & Bovy A.G., (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*. 65, pp: 2631–2648.

Sezik, E., Yesilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., (2001). Traditional medicine in Turkey. X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology* 75, 95–115.

Shah, B.A., Qazi, G.N., Taneja, S.C. (2009). Boswellic acids: a group of medicinally important compounds. *Natural Product Reports*. 26, 72-89.

Simpson, S. H., Eurich, D. T., Majumdar, S. R., Padwal, R. S., Tsuyuki, R. T., Varney, J., & Johnson, J. A. (2006). A meta-analysis of the association between adherence to drug therapy and mortality. *BMJ*, 333(7557), 15.

Singleton V.L., Rossi J.A.J., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16: 144-158.

Smyth, T., Ramachandran, V.N., Smyth, W.F., (2009). A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33(5), 421-426.

Soares, A. F., (2005). Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes: Adiponectine et prostaglandins. Thèse doctorale : biochimie. Ecole doctorale interdisciplinaire science-santé. N° : 2005-ISAL- 00123 : 35-43.

Soltis, J., Leong, K., & Savage, A., (2005). African elephant vocal communication II: rumble variation reflects the individual identity and emotional state of callers. *Animal Behaviour*, 70(3), 589–599.

Stalikas, C. D., (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids *Review. J. Sep. Sci.* 30, pp:3268–3295.

Stöckigt J., Sheludk Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H. and Stöckigt D., (2002). High performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoreticelectrosprayionisationmass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of Chromatography A*, 967(1), pp:85-113.

Sultana, N., Ata, A., (2008). Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 23, 739-756.

Sumner, M. D., Elliott-eller, M., Weidner, G., Daubenmier, J. J., Chew, M. H., Marlin, R., Raisin, C. J., Ornish, D., (2005). Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 96, pp: 810–814.

Szydłowska-Czerniaka A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* 2008;76:899-905.

Tadeusz Aniszewski., (2007). Alkaloids - Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological significance, Applications and Ecological Role, Elsevier.

Takhtajan, A., (1997). Diversity and classification of flowering plants [M]. New York: Columbia University Press.

Tamura, M., 1993. Ranunculaceae. In: Kubitzki, K., Rohwer, J.G., Bittrich, V. (Eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants. 2. Flowering Plants. Dicotyledons, Magnoliid, Hamamelid, and Caryophyllid Families.* Springer, Berlin, pp. 563–583.

Tamura, M., 1995. Angiospermae. Ordnung Ranunculales. Fam. Ranunculaceae. II. Systematic Part. In: Hiepko, P. (Ed.), *Natürliche Pflanzenfamilien*, second ed., vol. 17aIV. Duncker & Humblot, Berlin, pp. 223–519.

Teixeira, I.M., Carvalho, m., Da siqueira, G., Facklam, R.R., (2007). Enterococcus. In P. R. Murray (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, pp : 430-442.

Theis, N., Lerda, M., (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. *The International Journal of Plant Sciences.* 164, S93-S103.

Thérond, P., (2003). Le sélénium : un oligo-élément essentiel pour la santé humaine. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* 38 (4): 250-256.

Thomas, O.P., (2009) Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Université Nice Sophia Antipolis.

Thoppil, R.J., Bishayee, A., (2011). Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World Journal of Hepatology.* 3, 228-249.

Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry.* 103 (3): 816-822.

- V**alavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*. 64: 178-189.
- Valenzuela, A.B., Nieto, S.K. (1996).** Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*. 47, 186-196.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico- Biological Interactions*. 160:1-40.
- Vania G.Zuin et Jenete. H.Y.Vilegas, (2000).** *Phytoterapy research*. 14. pp :73-88.
- Vermerris W., (2006),** *Phenolic compound biochemistry*, Springer, Dordrecht. ISBN10 1-4020 5163-8 (HB).
- Vigor, Claire., Vercauteren, Joseph., Montels, Jérôme., (2010-2011).** travaux pratiques de pharmacognosie; les substances naturelles dans la chaîne médicament.
- W**ang, W., Lu, AM., Ren, Y., et al., (2009). Phylogeny and classification of Ranunculales evidence from four molecular loci and morphological data [J]. *Persp Plant Ecol Evol Syst*, 11: 81-110.
- Williams, C.A., Grayer, R. J., (2004).** Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* Vol. 21(4); pp: 539-573.
- Y**ang, J., Guo, J., and Yuan, J., (2008). In vitro antioxydant properties of rutin. *LWT*.41:1060- 1066. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- Yoshikawa, T., Yamamoto, Y., Naito, Y. (2000).** *Free radicals in chemistry, Biology and Medicine*, Ed. Oica International, Londres.
- Yue, T L., Cheng, H Y., Lysko, P G., McKenna, P J., Feuerstein, R., Gu, J L., Lysko, K A., Davisand, L L., Feuerstein, G., (1992),** Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger the journal of pharmacology. <http://jpet.aspetjournals.org/content/263/1/92.short>.
- Z**enk M.H., Juenger M., (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68, (22-24), pp: 2757-2772.
- Zhu, S.H., (1990).** *Commercial Science of Chinese Medical Materials*, 1st ed. Beijing, People Healty Publishing House.

Annexes

Annexe I :**Matériel de laboratoire****✚ Appareillage :**

- **Lecteur de microplaque multi-mode Enspire^R PerkinElmer**

Le lecteur à plusieurs modes de fonctionnement de plat d'EnSpire est une Platform très accessible à la recherche :

- ✓ Pour la détection quantitative de l'émission et/ou l'absorbance de la lumière.
- ✓ A utilisateurs multiples de recherches qui exigent la technologie à rendement élevé, bien que la flexibilité pour une étendue des applications large tout en donnant la priorité à la sensibilité.
- ✓ Permettant des données plus appropriées au sujet des systèmes biochimiques et de la cellule.



Figure 1 : Lecteur de microplaque.

- **ETUVE**

Enceinte de chauffage fonctionnant, dans la majorité des cas, dans l'air parfois sous vide ou gaz neutre, permettant d'effectuer des traitements thermiques à températures réglée de l'ordre de 500 °C maximum.



Figure 3 : Etuve Memmert.

D'autres appareils ont été aussi utilisés tels que :



Figure 4 : Plaque Magnétique agitateur.



Figure 6 : pH mètre.



Figure 7 : Balance de précision.

- **Verrerie**

→ Flacons

→ Portoirs

→ Béchers

→ verres de montre.

→ Erlenmeyers

→ Ambons

→ Entonnoirs

→ Boites de pétries en verre.

→ Eppendorfs

→ Barreaux magnétiques.

→ Spatules

→ Micropipettes.

 **Produites et réactifs chimiques :**

Les réactifs chimiques et solvants utilisés sont de qualité analytique.


Tableau 1 : Réactifs et produits chimiques.

Solution DPPH	
DPPH	6 mg
MeOH	100 ml.
☞ -20 °C à l'abri de la lumière.	
Solution ABTS⁺	
ABTS (7 mM)	19,2 mg.
H2O	5 ml.
K2S2O8 (2.45 mM)	3,3 mg.
H2O	5 ml.
☞ 16 heure à l'abri de la lumière.	
Acetate d'ammonium (ACNH4, PH=7.0)	
ACNH4	1,927 g.
H2O	25 ml.
Chlorure de cuivre (II) (Cu Cl2, 2H2O)	
(Cu Cl2, 2H2O)	0,042625 g.
H2O	25 ml.
Neocupronin	
Neocupronin	0,039 g.
MeOH	25 ml.
Ferricyanure de potassium K3Fe(CN)6 à 1%	
K3Fe(CN)6	1 g.
H2O	100ml.
Trichloracétique (TCA) à 10%	
TCA	1 g.
H2O	10 ml.
Chlorure ferrique FeCl3 à (0.1%)	
FeCl3	0,1 g.
H2O	100 ml.

Phenanthroline à (0.5%)	
1,10-Phenanthroline	0.05g.
MeOH	10 ml.
Chlorure ferrique FeCl₃ à (0.2%)	
FeCl ₃	0.02 g.
H ₂ O	10 ml.
Solution DTNB	
DTNB	16 mg.
Tampon (PH=7)	1 ml.
NaHCO ₃	7,5 mg.
↳ Tampon (PH=7) 1 ml + 2 ml Tampon (PH=7) + 4 ml Tampon (PH=8).	
Solution de substrat ACI	
ACI	16 mg.
H ₂ O	4 ml.
Tampon (PH =8)	4 ml.
Solution d'enzyme AChE	
• <u>Solution A</u>	
AChE	0,2 mg.
Tampon (PH=8)	4 ml.
↳ solution A	20 µl.
Tampon (PH = 8)	3 ml.
Acétate de Potassium (CH₃COOK, 1 M)	
CH ₃ COOK	9.80 g.
H ₂ O	100 ml.
Nitrate d'aluminium (Al(NO₃)₃, 9H₂O) à 10%	
(Al(NO ₃) ₃ , 9H ₂ O)	10g.
H ₂ O	100 ml.
Carbonate de sodium (Na₂CO₃, 7,5%)	
Na ₂ CO ₃	7,5 g.
H ₂ O	100 ml.
Folin Ciocalteu (FCR) (2M) dilué 10 fois	
FCR	1ml.
H ₂ O	9 ml.

Annexe II :

Résultats des activités biologiques

 **Analyse quantitative :**

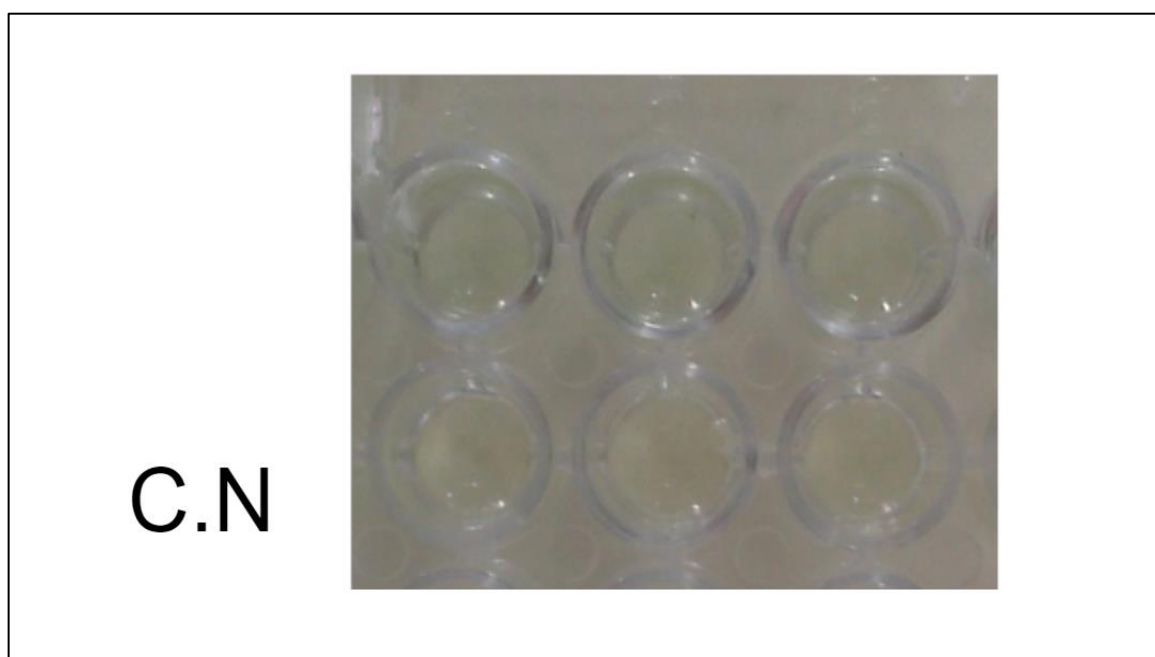


Figure 6: Dosage TPC.

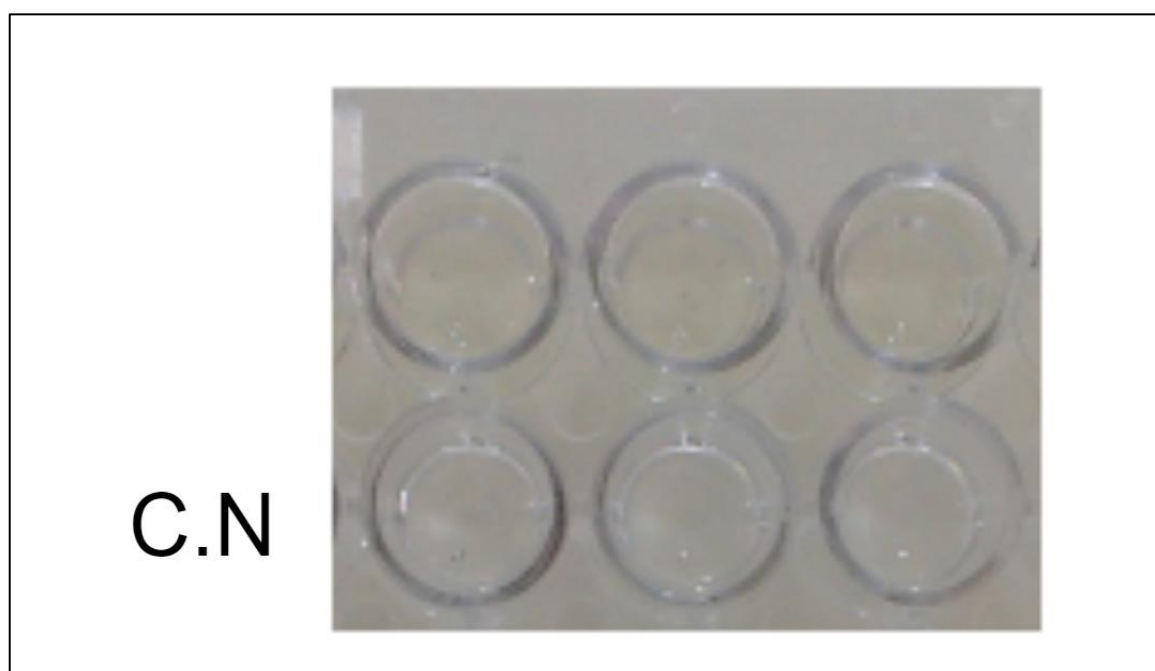


Figure 7: Dosage TFC.

Evaluation de l'activité antioxydante :

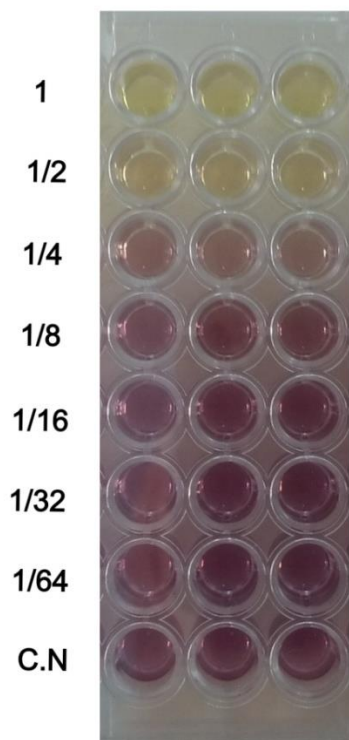


Figure 8 : Le test DPPH

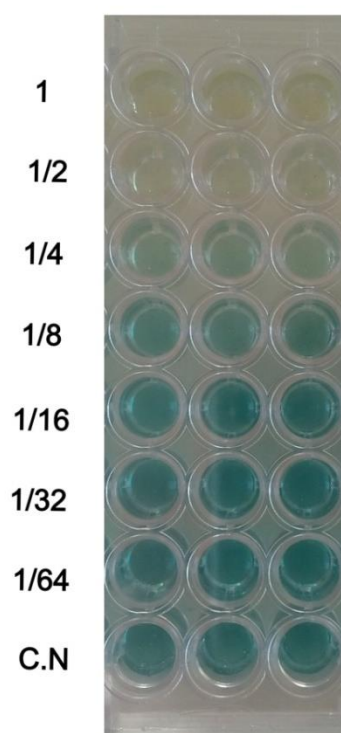


Figure9 : Le test ABTS

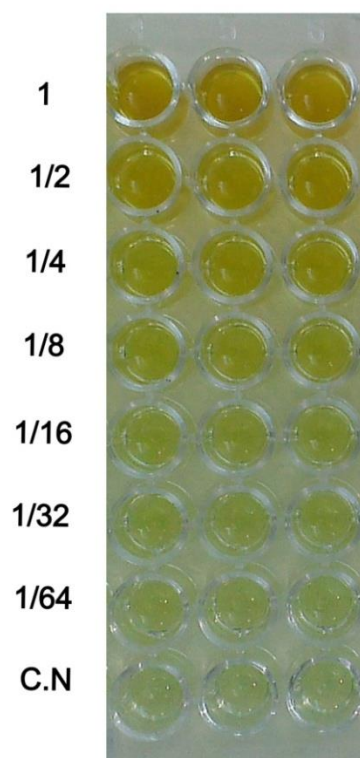


Figure 10 : le test CUPRAC

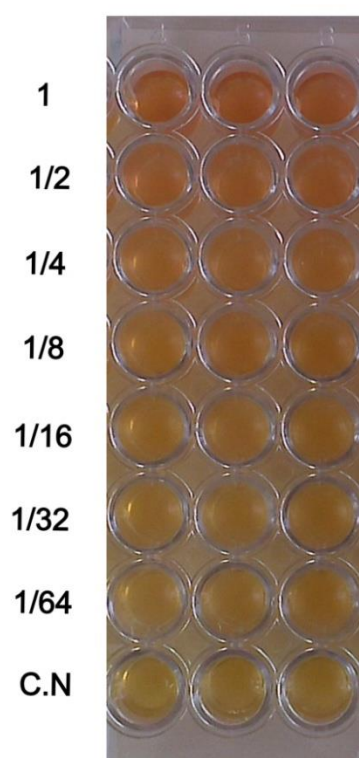
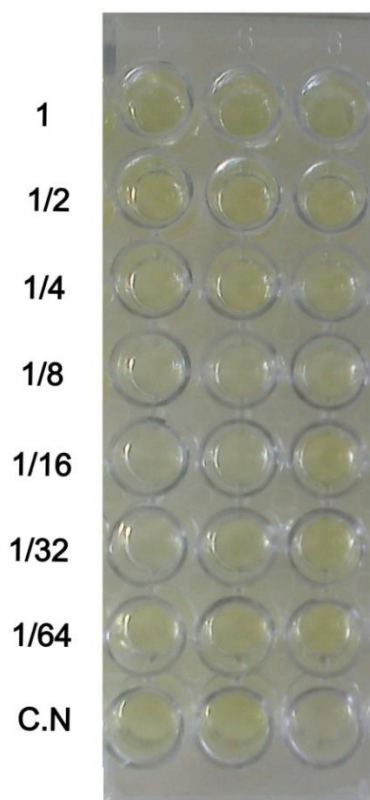
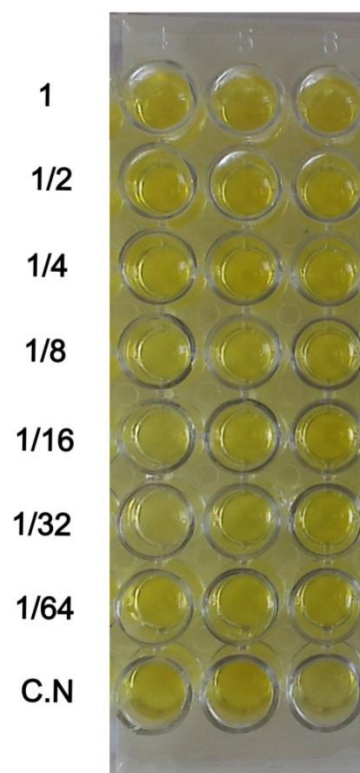


Figure 11 : le test Phenanthroline

✚ Etude de l'activité enzymatique :**Figure 12 : Activité de l'AChE à t0****Figure13 : Activité de l'AChE après incubation**

Résumés

Résumé

Ranunculus bullatus est une plante médicinale qui appartient à la famille des Ranunculaceae. Dans le cadre de la valorisation de cette plante par l'évaluation de ses propriétés chimiques et biologiques à savoir : les activités biologiques et la teneur en polyphénol et flavonoïde de l'extrait éthanolique

Le criblage phytochimique de l'extrait a permis de mettre en évidence la présence des principaux métabolites secondaires : les polyphénols et flavonoïdes totaux. Une considérable activité antioxydante de l'extrait éthanolique a été révélée par l'utilisation de quatre méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical ABTS, la réduction du cuivre par la méthode CUPRAC et le test de Phenanthroline.

D'autre part, l'activité anticholinestérase testée a montré que l'extrait éthanolique de la plante ne possède aucune capacité d'inhibition de l'AChe.

Mots clés : *Ranunculus bullatus*, activité antioxydante, métabolites secondaire, activité anticholinestérase.

Abstract:

Ranunculus bullatus is a medicinal plant that belongs to the family Ranunculaceae, As part of the enhancement of this plant by evaluating its chemical and biological properties, namely: biological activities and the polyphenol and flavonoid content of the ethanolic extract.

The phytochemical screening of the extract made it possible to demonstrate the presence of the main secondary metabolites: total polyphenols and flavonoids. An important antioxidant activity of the ethanolic extract has been revealed by the use of four methods: DPPH free radical scavenging, ABTS radical scavenging, the CUPRAC method based on the reduction of copper as well as the phenanthroline test.

However, the tested anticholinesterase activity showed that the ethanolic extract of the plant has no capacity to inhibit AChE.

Key words : *Ranunculus bullatus*, antioxidant activity, secondary metabolites, anticholinesterase activity.

ملخص:

Ranunculus bullatus هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة **Ranunculaceae**. كجزء من تعزيز هذا النبات من خلال تقييم خصائصه الكيميائية والبيولوجية ، وهي: الأنشطة البيولوجية ومحتوى متعدد الفينول و الفلافونيدات للمستخلص الإيثانولي.

أتاح الفحص الكيميائي النباتي للمستخلص إثبات وجود المركبات الثانوية الرئيسية: متعدد الفينول و الفلافونيدات . و تم الكشف عن نشاط كبير لمضاد للأكسدة في المستخلص الإيثانولي باستخدام أربع طرق: محاصرة الجذر الحر **DPPH** ، ومحاصرة الجذر الحر **ABTS** ، والحد من النحاس عن طريق **CUPRAC** و إختبار **phenanthrolin**.

كما أظهر نشاط مثبت إستيراز الأستيل كولين، الذي أجري على المستخلص الإيثانولي لا يمتلك أي قدرة على تثبيط إنزيم الاستيل كولين استراز.

الكلمات المفتاحية : *Ranunculus bullatus* ، نشاط مضاد الأكسدة، المركبات الثانوية، نشاط مثبت إستيراز الأستيل كولين.

Année universitaire : 2019/2020

Présenté par : FAS Lamis

HADJI Nesrine

Evaluation des activités biologiques des extraits éthanoliques de *Ranunculus bullatus*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master 2
en Biochimie de la Nutrition.

Ranunculus bullatus est une plante médicinale qui appartient à la famille des Ranunculaceae. Dans le cadre de la valorisation de cette plante par l'évaluation de ses propriétés chimiques et biologiques à savoir : les activités biologiques et la teneur en polyphénol et flavonoïde de l'extrait éthanolique

Le criblage phytochimique de l'extrait a permis de mettre en évidence la présence des principaux métabolites secondaires : les polyphénols et flavonoïdes totaux. Une considérable activité antioxydante de l'extrait éthanolique a été révélée par l'utilisation de quatre méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical ABTS, la réduction du cuivre par la méthode CUPRAC et le test de Phenanthroline.

D'autre part l'activité anticholinestérase testée a montré que l'extrait éthanolique de la plante ne possède aucune capacité d'inhibition de l'AChE.

Mots clés : *Ranunculus bullatus*, activité antioxydante, métabolites secondaire, activité anticholinestérase.

Laboratoire de recherche : Laboratoire 02 de Biochimie « CRBt », Nouvelle Ville – Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *MOUAS T. Nardjes* (MCA – UFM Constantine 1)

Rapporteur : *LEMOUI Redouane* (MCB - ENS Constantine 3)

Examineur : *NADJI Wassila* (MCB – ENSB Constantine 3).