

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de BIOLOGIE



Laboratoire de recherche, Antibiotiques, Antifongiques, physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique



MÉMOIRE

Présenté par

M^{elle} YAHYAOUI KHADIDJA

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Evaluation de l'activité antioxydante de la plante médicinale *Rhaponticum acaule*.

Soutenu le, devant le jury composé de :

Président	Mr Chaouche Tarik Mohammed	MCA	Univ. Tlemcen
Examinatrice	Mme Belkacem Nacéra	MCA	Univ. Tlemcen
Encadreur	Mme Laoufi Hind	MCB	Univ. Tlemcen

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciement

Avant toute chose nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir accordé la force et la santé afin de pouvoir réaliser ce travail.

Nous adressons tout d'abord nos sincères remerciements à notre encadreur Mme **LAOUFI HIND**. Maître de conférences B à l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, pour son aide et qui n'a cessé de nous orienter et nous appuyer à chaque étape ; c'est par sa disponibilité, ses conseils précieux et son aide que ce travail s'est concrétisé en souhaitant à elle une bonne santé et que Dieu protège sa famille.

Nous tenons vivement à remercier les membres du jury :

Mr CHAUCHE TARIK MOHAMMED. Chef de département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, pour l'honneur qu'il a fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

Mme BELKACEM NACERA. Maître de conférences de classe A d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire et spécialement aux membres des laboratoires pédagogiques de Biochimie, Faculté SNV-STU pour leur aide.



Dédicaces

Je remercie tout d'abord Dieu le tout puissant de m'avoir dû la santé, la patience, et la volonté pour achever ce mémoire.

Je dédie mon modeste travail

A la femme et a l'homme, qui ont été la source de ma force, m'ont donné moi la patience, un sens à ma vie et mon succès : mes chères parentes

Et spécialement à mon mari qui n'a pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir au cours de mes études.

Sans oublié mes sœurs, mes frères et tout ma famille.

A mon encadreur madame Laoufi Hind Docteur maitre de conférence classe B à l'université de Tlemcen pour m'avoir donné du courage et l'insistence durant tout l'année.

A mes amis Fatima, Rahma et Sarra et l'ensemble des étudiants de la promotion Master 2 biochimie de l'année universitaire 2023/2024.

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits organiques et aqueux des racines de *Rhaponticum acaule* par la méthode de DPPH.

Le screening phytochimique de ces extraits a révélé la richesse de cette plante en alcaloïdes, flavonoïdes, quinones libres, saponines, terpenoïdes, tanins et composés réducteurs. De même une absence totale des anthraquinones dans tous les extraits a été observée.

Les résultats de dosage révèlent que les extraits organiques eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-Butanol contient une quantité élevée équivalente de 166,94 µg Eq AG/mg Ext, 396,87 µg Eq AG/mg Ext et 241,59 µg Eq AG/mg Ext, respectivement pour les polyphénols et 194,5 µg Eq C/mg Ext, 351,51 µg Eq C/mg Ext, 223,64 µg Eq C/mg Ext, respectivement pour les flavonoïdes. Tandis que l'extrait aqueux exprime des valeurs relativement faible 138,80 µg Eq AG/mg Ext en polyphénols et 84,82 µg Eq C/mg Ext en flavonoïdes.

Concernant l'activité antioxydante, les extraits organiques eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-Butanol ont réduit le DPPH avec des CI_{50} inférieurs à celle de l'extrait aqueux (5,98 mg/ml, 9,30 mg/ml, 7,98 mg/ml et 11,88 mg/ml, respectivement). Ces valeurs restent inférieures à celle obtenue par l'acide ascorbique (0,18 mg/ml).

L'effet antioxydant de ces extraits est probablement lié à leur richesse en métabolites secondaires en particulier les polyphénols et les flavonoïdes ce qui confère à cette plante d'être classée parmi les plantes médicinales.

Mots clés : *Rhaponticum acaule*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, DPPH, stress oxydant.

Abstract

The objective of this study is the evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of organic and aqueous extracts of the roots of *Rhaponticum acaule* by the DPPH method.

The phytochemical screening of these extracts revealed the richness of this plant in alkaloids, flavonoids, free quinones, saponins, terpenoids, tannins and reducing compounds. Likewise a total absence of anthraquinones in all the extracts was observed.

The content results reveal that the organic extracts water-methanol, ethyl acetate and n-Butanol contain a high equivalent amount of 166.94 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$, 396.87 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$ and 241.59 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$, respectively for polyphenols and 194.5 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$, 351.51 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$, 223.64 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$, respectively for flavonoids. While the aqueous extract expresses relatively low values of 138.80 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$ in polyphenols and 84.82 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$ in flavonoids.

Concerning the antioxidant activity, the organic extracts water-methanol, ethyl acetate and n-Butanol reduced DPPH with lower IC_{50} than the aqueous extract (5,98 mg/ml, 9,30 mg/ml, 7,98 mg/ml and 11,88 mg/ml, respectively). These values remain lower than that obtained by ascorbic acid (0,18 mg/ml).

The antioxidant effect of these extracts is probably linked to their richness in secondary metabolites, in particular polyphenols and flavonoids, which allows this plant to be classified among medicinal plants.

Key words : *Rhaponticum acaule*, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, DPPH, oxidative stress.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضادات الأكسدة في المختبر للمستخلصات العضوية والمائية لجذور نبات

Rhaponticum acaule بطريقة DPPH.

أظهر الفحص الكيميائي النباتي لهذه المستخلصات غنى هذا النبات بالقلويدات والفلافونويدات والكينونات الحرة والصابونين والتربينويدات والعفص والمركبات المرجعة. وبالمثل لوحظ الغياب التام للأنتراكينونات في جميع المستخلصات.

تكشف نتائج الاختبار أن المستخلصات العضوية، الماء-الميثانول، وأسيئات الإيثيل، والبيوتانول تحتوي على كمية مكافئة عالية تبلغ 166.94 ميكروغرام معادل حمض القاليك ملغ؛ 396.87 ميكروغرام معادل حمض القاليك ملغ؛ 241.59 ميكروغرام معادل حمض القاليك ملغ على التوالي للبوليفينول و194.5 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ؛ 351.51 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ؛ 223.64 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ على التوالي للفلافونويدات. بينما يعبر المستخلص المائي عن قيم منخفضة نسبياً تبلغ 138.80 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ في البوليفينول و84.82 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ في الفلافونويدات.

فيما يتعلق بنشاط مضادات الأكسدة، فإن المستخلصات العضوية مثل الماء/ الميثانول وأسيئات الإيثيل والبيوتانول تقلل من مفعول الجذور الحرة DPPH مع انخفاض CI_{50} مقارنة بالمستخلص المائي (5.98 ملغ / مل؛ 9.30 ملغ / مل؛ 7.98 ملغ / مل و 11.88 ملغ / مل على التوالي). وتبقى هذه القيم أقل من تلك التي يحصل عليها حمض الأسكوربيك (0.18 ملغ/مل).

ومن المحتمل أن التأثير المضاد للأكسدة لهذه المستخلصات يرتبط بغناها بالمستقلبات الثانوية، وخاصة البوليفينول والفلافونويدات، مما يسمح بتصنيف هذا النبات ضمن النباتات الطبية.

الكلمات المفتاحية: *Rhaponticum acaule*، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH، الإجهاد التأكسدي

Liste des tableaux

Tableau 1 : Types et sources de antioxydants (Goudable et Favier, 1997).....	7
Tableau 2 : Effet antiradicalaire de quelques plantes médicinales sur le DPPH	8
Tableau 3 : Résultats de l'activité antioxydante des racines de <i>Rhaponticum acaule</i> .	
Tableau 4 : Mode opératoire du dosage de polyphénols dans les extraits de racines de <i>Rhaponticum acaule</i>	20
Tableau 5 : Mode opératoire du dosage de flavonoïdes dans les extraits de racines de <i>Rhaponticum acaule</i>	22
Tableau 6 : Mode opératoire pour mesurer l'activité antiradicalaire des extraits de <i>Rhaponticum acaule</i> sur le DPPH.	24
Tableau 7 : Quelques caractéristiques des extraits de racines de <i>Rhaponticum acaule</i>	26
Tableau 8 : Résultats des tests phytochimique réalisés sur les extraits des racines de <i>R. acaule</i>	26
Tableau 9 : Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits des racines de <i>Rhaponticum acaule</i>	27
Tableau 10 : Pourcentage de réduction du DPPH par les extraits aqueux et organiques des racines de <i>R. acaule</i>	29
Tableau 11 : Pourcentage de réduction du DPPH par l'acide ascorbique à différentes concentrations.	29
Tableau 12 : IC ₅₀ des extraits aqueux et organiques des racines de <i>Rhaponticum acaule</i> et de l'acide ascorbique.....	29

Liste des figures

Figure 1 : Origines des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.	4
Figure 2 : Image de <i>Rhaponticum acaule</i>	13
Figure 3 : Photographie de <i>Rhaponticum acaule</i> sur terrain	13
Figure 4 : Carte Géographique de la localisation de <i>Rhaponticum acaule</i>	13
Figure 5 : Racines de <i>Rhaponticum acaule</i> après séchage.	15
Figure 6 : Protocole de préparation des extraits aqueux et organiques des racines de <i>Rhaponticum acaule</i>	17
Figure 7 : Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	28
Figure 8 : Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoides totaux.	28

Sommaire

Introduction	1
Synthèse bibliographique	2
1. Stress oxydatif.....	2
2. Phytothérapie	8
3. <i>Rhaponticum acaule</i> (tafgha)	11
Matériel et méthodes	2
1. Matériel végétal.....	14
2. Extraction du matériel végétal	15
2.1 Extraits aqueux (EA)	15
2.2 Extrait eau-méthanol (EM)	15
2.3 Extrait acétate d'éthyle (EA _C).....	15
2.4 Extrait n-Butanol (En-B)	16
2.5 Rendement de l'extraction	16
3. Tests phytochimiques	18
3.1 Protocole (Trease et Evans, 1987).....	18
4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux.....	19
4.1 . Dosage de polyphénols totaux	19
4.2 Dosage de flavonoïdes totaux	20
5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits aqueux et organiques de <i>Rhaponticum acaule</i>	23
5.1 Principe de la méthode DPPH.....	23
5.2 Mode opératoire (tableau 5).....	23
5.3 Expression des résultats	24

5.3.1	Pourcentage de réduction du DPPH	24
5.3.2	Détermination de l'CI ₅₀	24
5.3.3	Détermination de l'activité antiradicalaire	25
Résultats et interprétations		26
1.	Extraction.....	26
2.	Tests phytochimiques	26
3.	Dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux	27
4.	Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits aqueux et organiques des racines de <i>Rhaponticum acaule</i> sur le DPPH.....	28
Discussion		31
Conclusion et perspectives		37
Références bibliographiques		37
Résumé		44

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

DPPH : 2,2- Diphényle -1- Picryl-Hydrazyl

EA : Extrait aqueux

E_{AC} : Extrait acétate d'éthyle

EM : Extrait eau-méthanol

En-B : Extrait n-Butanol

ERA : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives oxygénées

RNS : Reactive nitrogen species

ROS : Reactive oxygen species

ERN : Espèce réactive de nitrogène

FRAP : Réduction du fer, Ferric Reducing Antioxydant power

ABTS : acide 2,2'-Azino-Bis-3-éthylbenzoThiazoline-6-Sulphonique

SOD : Superoxydes dismutases

AGPI : Acide gras polyinsaturé

GPS : Glutathion-peroxydases

GR : Glutathion réductase

O₂⁻ : Anion superoxyde

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂O : Monoxyde de dihydrogène

DO_C : Densité optique du DPPH (contrôle positif).

DO_E : Densité optique de l'extrait testé.

ARP : Activité antiradicalaire.

O₂ : Oxygène

OH[·] : Hydroxyle

NO : Monoxyde d'azote

¹O₂ : Oxygène singulet

ONOOH : Nitroperoxyde

ROO[·] : radicaux peroxydes

C₂₀H₃₂O₂ : Acide arachidonique C₂₀H₃₂O₂

C₁₈H₃₂O₂ : Acide linoléique

Rdt : Rendement

MeOH : Méthanol

HCl : Chlorure d'hydrogène

FeCl₃ : chlorure ferrique

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Ammoniaque hydroxyde d'ammonium

H₂SO₄ : Acide sulfurique

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique

H₃PMO₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique

W₈O₂₃ : Tungstène

MO₈O₂₃ : Molybdènes

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

NaNO₂ : Nitrite de sodium

Introduction

Le stress oxydant, les radicaux libres, les antioxydants, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'activité antioxydante sont des notions largement évoquées dans le monde médical en particulier dans le diagnostic de la plupart des maladies. Ainsi, le déséquilibre prononcé entre les radicaux libres et les antioxydants conduit au stress oxydant. Ce dernier conduit à des dommages au niveau de tous l'organisme (**Favier, 2006 ; Hamma et al., 2015**).

Pour se protéger des effets délétères des ERO, les scientifiques recherchent des substances naturelles dotées de capacité antioxydante pour remplacer celles de synthèse ou pour les intégrer dans leurs formulations (**Dickinson et Chang, 2011**).

Les plantes médicinales, et toute la richesse biologique qu'elles recèlent, agissent de façon préventive ou curative sur notre organisme et renferment des effets bénéfiques qui permettent d'être utilisés dans le but thérapeutique. Elles répondent parfaitement à l'exigence de recourir progressivement à une « pharmacopée durable » (**Cleur et Carillon, 2012**).

Rhaponticum acaule est une plante forestière, bisannuelle et médicinale, qui possède de nombreuses actions thérapeutiques complémentaires ou synergiques (multithérapeutiques). Malgré tous ses bienfaits peu d'études sont réalisées sur cette plante dans notre pays. La partie efficace de cette plante utilisée en médecine traditionnelle est la racine et elle est majoritairement utilisée pour la gastrite (**Zhang et al., 2002**).

L'objectif principal de notre étude est l'évaluation de l'activité antioxydante de *Rhaponticum acaule*. Dans ce but nous avons procédé à une préparation des extraits aqueux et organiques à partir des racines de cette plante ; une analyse phytochimique de ces extraits et un dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux ; ainsi une évaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

Synthèse bibliographique

1. Stress oxydatif

Au milieu des tissus sains, les défenses antioxydantes détruisent les radicaux libres en excès ce qui assure l'équilibre de la balance Oxydants /Antioxydants. Dans certains cas, et en raison d'une surproduction radicalaire ou d'une diminution des capacités antioxydantes le déséquilibre s'installe, ce qui déclenche le stress oxydatif. Ce dernier est responsable de l'oxydation, de manière irréversible et non spécifique de molécules biologiques, et conduit à des dommages au niveau des cellules et des organes (**Carrière *et al.*, 2006 ; Migdal et Serre, 2011**).

Le stress oxydant potentialise l'apparition des maladies telles que : le diabète, le cancer, le parkinson, le sida, les maladies du foie, oculaires, cardiovasculaires, auto-immunes, respiratoires et inflammatoires, ainsi que les troubles rénaux et neurologiques (**Sohal *et al.*, 2002**).

Un radical libre est une molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur son orbitale externe. Extrêmement instables, elles s'accouplent de force avec le premier électron rencontré, sa réactivité varie selon la nature du radical et ainsi que la cible touchée (**Mercan, 2010**). La durée de vie du radical libre est hautement courte, de l'ordre de milliseconde à de nanoseconde (**Majidi *et al.*, 2010**).

Le rôle des ERO est très complexes car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. A faible concentration les ERO jouent un rôle majeur dans l'apoptose des cellules cancéreuse ainsi que dans la réponse immunitaire (**Harman, 1981**). Elles interviennent dans la synthèse de l'ADN, des acides gras insaturés, des hormones stéroïdes et aussi dans la biosynthèse de mitochondries. Dans des conditions normales, les ERO jouent un rôle de messagers secondaires capables d'activer des facteurs de transcription essentielle pour le fonctionnement normal et la survie des cellules (**Dröge, 2002**). Aussi, les ERO jouent un rôle crucial dans le processus de la génération des enzymes antioxydants (**Arteel *et al.*, 2003**).

A l'opposé, quand les ERO sont générés en concentrations importantes, elles deviennent pathologiques et activent l'expression des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoire ou des protéines d'adhésion (**Haleng *et al.*, 2007**).

Les radicaux libres qui interviennent au cours du processus du stress oxydant sont soit des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) ou de l'azote (ERA ou RNS) c'est selon la

caractéristique d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène (ERO ou ROS) ou d'azote (ERN ou RNS) (**Atta et al., 2010**).

Les ERO sont des espèces issues lors des réaction enzymatique ou bien chimique, leurs productions est principalement au niveau des mitochondrie (chaîne respiratoire et transport d'électron) à l'aide des enzymes spécifiques. Il s'agit de superoxyde dismutases (SOD) qui transforme l'anion superoxyde (O_2^-) en H_2O_2 et de catalase qui transforme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en H_2O et O_2 , aussi le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en hydroxyle (OH^-) (**Eddhima, 2019**).

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 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 l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^\bullet , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO. Les espèces réactive 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. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (figure 1). Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde (O_2^\bullet) comme le monoxyde d'azote ($^\bullet NO$) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques telles la vasodilatation capillaire, la prolifération ou le message de neurones. En revanche, des radicaux comme les radicaux peroxydes (ROO^\bullet) ou surtout le radical hydroxyle (HO^\bullet) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. Ces radicaux libres de l'oxygène ou de l'azote, même réactifs, ne sont pas uniquement toxiques ; au contraire, ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose (**Monique et al., 2003 ; Favier, 2003 ; Lobo et al., 2010 ; Schieber et Chandel, 2014**).

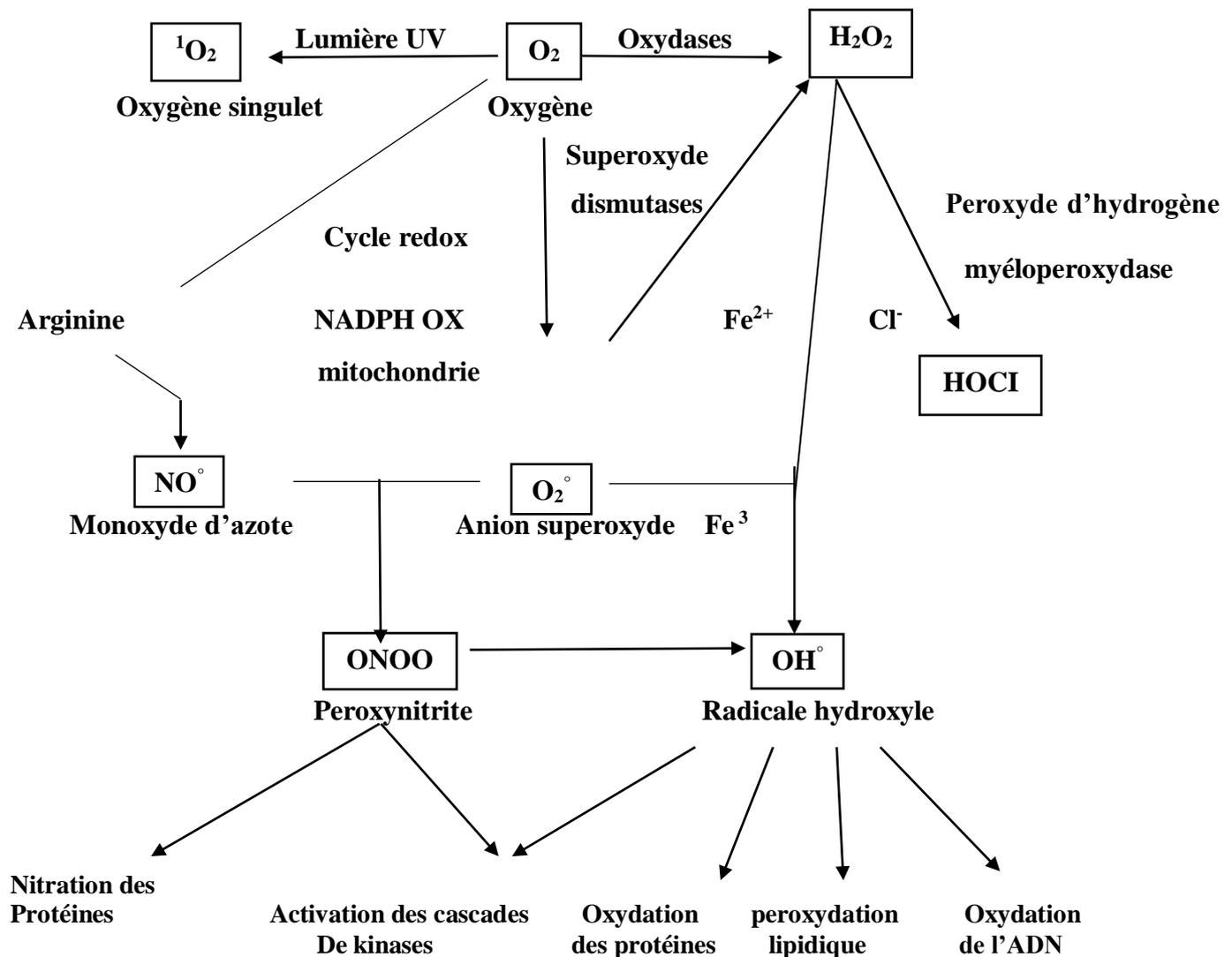


Figure 1 : Origines des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.

Parmi les molécules biologiques transformées par le stress oxydant figurent les acides aminés et les protéines. 50 à 70% des ERO (E : espèces, R : réactives, O : oxygène) produites par une cellule peuvent être piégées par les protéines (Levine, 2002).

Aussi, les acides gras polyinsaturés comme (l'acide linoléique $C_{18}H_{32}O_2$, et l'acide arachidonique $C_{20}H_{32}O_2$, présentent particulièrement dans les membranes plasmiques des cellules sont une cible fondamentale du stress oxydant. L'oxydation des lipides par les ERO nommé peroxydation lipidique, conduit à la formation de multiples produits primaires (les hydro peroxydes) et secondaires (les aldéhydes), responsables de la diminution de la fluidité de ces membranes (Murphy, 1996).

Les molécules d'ADN sont aussi touchées par l'oxydation. L'atteinte radicalaire possible est directe et peut engendrer l'oxydation des bases, entraînant la modification d'un grand nombre de bases, elle peut aussi affecter la liaison entre la base et le sucre (désoxyribose), aboutissant à la séparation du simple brin de l'ADN (**Cadet *et al.*, 2002**). La modification de la structure d'ADN conduit à des mutations avec une transversion des cellules normales en cellules cancéreuses, c'est les premières étapes de la carcinogenèse et ce n'est pas une coïncidence si les agents cancérigènes sont tous des générateurs forts de radicaux libres (**Favier, 2003**).

De nombreuses molécules sont susceptibles d'être attaquées ou modifiées par les ERO, dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les acides aminés, les protéines, les lipides, le sucre et l'acide désoxyribonucléique (ADN) (**Halliwell et Whiteman, 2004 ; Valko *et al.*, 2007**).

- Les protéines

Les protéines sont constituées principalement par des acides aminés qui sont la cible des ERO (cystéine, méthionine, tyrosine, tryptophane, histidine, lysine, phénylalanine). L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut induire des modifications structurales plus importantes. Les protéines modifiées deviennent plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (**Jung *et al.*, 2007**).

- Les lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique sont la cible privilégiée des ERO en raison de leurs Hydrogènes bisallyliques facilement oxydables. Les produits d'oxydation formés peuvent participer à la régulation de fonctions métaboliques et le dysfonctionnements cellulaires (**Beckman et Ames, 1998**).

- Les acides nucléiques (ADN)

L'ADN est la cible privilégiée des ERO, ces derniers transformés les bases puriques et pyrimidiques en produits de fragmentations et en bases oxydées. Les altérations du matériel génétique s'accumulent au sein de l'ADN et provoquent des maladies telle que la mutagenèse, le vieillissement...etc (**Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Favier, 2003**).

Pour lutter contre la génération d'ERO et prévenir les maladies qui résultent plusieurs systèmes antioxydants existent.

Un antioxydant est une substance chimique qui est capable, à concentration faible de réduire le stress oxydatif, d'empêcher l'oxydation d'un radical libre, d'entraver, d'annuler et bloquer les différents ERO et radicaux libres, cela stimule la protection de l'organisme contre les différents effets du stress oxydant puisqu'il augmente les capacités du système de défense. Il s'agit d'un ensemble de polyphénols, de vitamines et d'autres composés. La nature de ces systèmes varie en fonction de leur emplacement, qu'il soit intracellulaire ou extracellulaire. Certaines plantes médicinales comme *Zingiber officinale* (le gingembre), *Camellia sinensis* (le thé vert), *Melissa officinalis* (la mélisse), *Thymus vulgaris* (thym) sont des sources aux vertus antioxydantes qui aident à lutter contre le stress oxydant (**Berger, 2006**).

Dont les effets sont contrôlés par l'action des antioxydants, ces derniers forment un groupe hétérogène constitué de deux systèmes distincts : le système endogène (produit par l'organisme lui-même), qui comprend les antioxydants enzymatiques et naturels, et le système exogène, qui rassemble les antioxydants non enzymatiques (fournis par l'alimentation) (Tableau 1) (**Goudable et Favier, 1997**).

Tableau 1: Types et sources de antioxydants (Goudable et Favier, 1997).

Types des antioxydants	Exemples	Source	Rôles
Antioxydants enzymatique	<ul style="list-style-type: none"> - Superoxydes dismutases (SOD) - Catalases - Glutathion-peroxydases (GPS) - Glutathion réductase (GR). 	Endogènes	<ul style="list-style-type: none"> - Convertir les radicaux libres en des formes inactives pour devenir inoffensifs. - Il s'accouplent à des coenzymes qui exercer leur fonction. - préserver l'hémoglobine et supprimer les radicaux lipidiques.
Antioxydants non enzymatiques	<ul style="list-style-type: none"> - Coenzyme Q10 - Vitamine A (rétinol), - Vitamine C (acide ascorbique), - L'albumine et bilirubine - Ubiquinone. 	Exogènes	<ul style="list-style-type: none"> - Inhiber les radicaux libres - Production endogène du collagène - Restauration des altérations cutanées
Antioxydants naturels	<ul style="list-style-type: none"> - L'acide urique, - βcarotène, - Vitamine E (αtocophérol) - Palmitate d'ascorbyle 	Endogènes	<ul style="list-style-type: none"> - Destruction des cellules endommagées - Renforcer le système immunitaire et lutter contre la peroxydation des lipides - Assure la stabilité, équilibre et le bon fonctionnement de organisme.

Les antioxydants d'origine végétale sont les polyphénols, qui sont des substances organiques actives telles que : les flavonoïdes, les flavones, les caroténoïdes, la vitamine C, les acides phénoliques et les tanins (Zhao *et al.*, 2014).

De nombreuses plantes, renferment des composés phénoliques à effet antioxydants présents dans ses parties (graines, fleurs, fruits, ou autre). Quelques plantes douées de pouvoir antioxydant sont citées dans le tableau 2

Tableau 2 : Effet antiradicalaire de quelques plantes médicinales sur le DPPH

Plantes médicinales	Partie utilisé	Extrait	CI ₅₀ (mg/ml)	Références
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Aérienne	Méthanolique	0,083	(Khennaoui et Ghiti, 2022)
<i>Erodium montanum</i>	Aérienne	Méthanolique	0,080	(Khennaoui et Ghiti, 2022)
<i>Ephedra alata alenda</i>	Tige	Méthanolique	1,81	(Benarba et al., 2021)
<i>Urtica dioica L</i>	Aérienne	Aqueux	0,018	(Rolta et al., 2020)
<i>Carthamus caeruleus L</i>	Racine	Méthanolique	0,4	(Ramdani et Zaouani, 2022)

2. Phytothérapie

Le mot phytothérapie se compose étymologiquement de deux racines grecques « phuton » et « therapeia » qui signifient respectivement « plante » et « traitement ». La phytothérapie est une pratique et discipline à l'origine des connaissances empiriques transmises d'une génération à une autre. Elle est destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnelles et /ou certains états pathologiques en utilisant des plantes, de parties de plantes ou des préparations à base de plusieurs plantes qu'elles soient consommées ou utilisées en voies externes (Bruneton, 1999).

Il existe plusieurs modèles de phytothérapie :

Aromathérapie : est une science méthodique se concentre sur les huiles essentielles, qui sont les extraits aromatiques de diverses plantes. Elle repose sur des preuves scientifiques solides confirmées en laboratoire. Les huiles essentielles sont connues pour leurs multiples vertus sur la santé, notamment pour apaiser, soulager les tensions et tonifier. L'utilisation la plus courante des huiles essentielles est l'application topique (Morel, 2020).

Gemmothérapie : La gemmothérapie est une approche médicale qui se sert principalement de bourgeons de plantes pour soigner. Cette méthode est performante étant donné qu'elle exploite toutes les potentialités futures de la plante adulte. Elle a la capacité de diminuer le stress renforce le système immunitaire et apaise les problèmes cardiovasculaires et articulaires (Besançon, 2012).

Herboristerie : est une science qui explore les végétaux à visée médicinale et leurs caractéristiques ainsi que les extraits associés à leur commercialisation. Elle utilise les plantes fraîches ou desséchées. Cette pratique repose sur des méthodes aisées et accessibles, le plus

souvent à base d'eau, tels que les infusions, les décoctions ou les macérations (**Besançon, 2012**).

Homéopathie : Elle repose sur le concept de similitude en utilisant la méthode "similia similibus curentur". Dans ce modèle, les plantes fraîches sont préalablement macérées dans de l'alcool (**Zeghad, 2009**).

Phytothérapie chinoise : est un ensemble de méthodes et de pratiques qui englobent l'acupuncture ainsi que la diététique chinoise, considérée comme particulièrement puissante. Elle utilise également des extraits de plantes pour soigner diverses affections et prévenir l'apparition de maladies (**Strang, 2006**).

Phytothérapie pharmaceutique : elle utilise des substances extraites de plantes d'origine végétale. Cela exige des quantités de plantes plus importantes pour garantir une action rapide et efficace. C'est pourquoi les concentrations sont augmentées, tout en veillant à ce que le traitement ne soit pas toxique pour l'organisme (**Strang, 2006**).

Depuis longtemps, à l'exception de ces cent dernières années, l'homme n'a eu que les plantes pour se soigner, contre de maladies bénignes (rhume ou toux) ou plus graves telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments exemples : les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus résistent de plus en plus aux médicaments. Alors, la phytothérapie qui propose des remèdes naturels est bien tolérée par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle est utilisée en pays d'occident pour le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite avec moins d'effets secondaires (**Paul et Ferdinand, 2006**). La science joue un rôle dans la thérapie médicamenteuse actuelle, qui comprend une variété de remèdes à base de plantes connus depuis l'Antiquité et utilisés depuis des milliers d'années. Les plantes médicinales contiennent de nombreux éléments ou ingrédients actifs qui ont des propriétés thérapeutiques complémentaires ou qui agissent en synergique. Ces éléments ont été analysés et reproduits par voie chimique afin de les incorporer facilement dans divers médicaments (**Newman et al., 2003**).

L'effet de la phytothérapie sur le corps humain est déterminé par la composition des plantes utilisées. Depuis le XVIII^{ème} siècle, des chercheurs ont commencé à extraire et isoler les

composants chimiques contenus dans ces plantes. Les plantes et leurs effets sont étudiés en se basant sur leurs composants actifs. Par conséquent, il est essentiel de comprendre l'impact des divers composants actifs pris individuellement (**Iserin et al., 2001**).

La phytothérapie, à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi (totum) plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Etudier et réussir à en identifier les parties essentielles ne permet pas de comprendre comment elle fonctionne, de même, disséquer une plante médicinale pour isoler ses principes actifs ne suffit pas pour expliquer comment elle agit. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants. Ainsi, des chercheurs ont démontré que les principes actifs de nombreuses plantes tel que du *ginkgo biloba* (ginkgo), agissent de manière complexe et combinée pour produire un effet thérapeutique globale (**Iserin et al., 2001**).

Prenant l'exemple de la rhubarbe de Chine, dont les dérivés anthracéniques irritants stimulent la paroi intestinale pour faciliter l'évacuation, est souvent utilisée comme laxatif. Toutefois, son efficacité n'est garantie qu'à des doses élevées. À faibles quantités, certains composants tels que les tanins ont plutôt un effet astringent sur les muqueuses intestinales. En conséquence, la rhubarbe de Chine a des effets opposés selon la quantité ingérée : elle agit comme un laxatif à des doses modérées ou importantes, et comme un antidiarrhéique à de faibles doses. Cette illustration met en évidence que l'expertise conjointe du thérapeute et du patient est fréquemment le moyen le plus fiable pour évaluer l'efficacité thérapeutique des plantes entières. La qualité d'une plante médicinale ne se résume pas à la liste de ses composants actifs (**Iserin et al., 2001**).

Les avancées notables dans la reconnaissance des composés actifs font de la phytothérapie une discipline à part entière de la médecine, permettant ainsi la découverte de nouvelles propriétés pharmacologiques et en particulier, la rareté des effets secondaires liés aux médicaments dérivés de plantes (**Lacoste, 2014**).

En Afrique, nos ancêtres et nos parents connaissaient expérimentalement le pouvoir curatif des végétaux (**Nacoulma, 1996**). Il convient de noter que certains extraits de plante ont démontré une efficacité essentielle dans la prévention de la propagation de maladies multifactorielles telles que l'hypertension artérielle, le diabète et la polyarthrite rhumatoïde.

Cela est attribuable aux éléments présents dans ces extraits assurant des activités biologiques (**Bousta et Ennabili, 2011**). En Algérie les plantes médicinales sont utilisées en médecine traditionnelle, ces plantes ont toujours eu un rôle très fascinant à travers les

différentes générations en raison de leurs couts et de leurs propriétés curatives. Grâce aux avancées de la chimie, les chercheurs ont réussi à isoler les principes actifs de ces plantes, qui sont des substances chimiques naturelles considérées comme responsables de leur action. C'est pourquoi les plantes médicinales sont jugées plus efficaces et fiables que les médicaments. Ces derniers ont des principes actifs isolé et qui sont sélectionnés pour cibler une action en particulier avec ou sans effets secondaires tandis que les plantes renferment plusieurs composants actifs, capables d'avoir des effets potentialisés et d'autre d'agir en synergie c'est-à-dire ont des activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques sans effets secondaires (**Benghanou, 2012**).

3. *Rhaponticum acaule* (tafgha)

Dans le but d'étudier les effets thérapeutiques ainsi que la phytochimie de quelques plantes médicinales Algériennes nous nous somme intéressé à l'étude de la plante *Rhaponticum acaule*, appelée communément « tafgha ». C'est une plante de la famille des Asteraceae connu par sa richesse en flavonoïdes, terpenoïdes et alcaloïdes. Ainsi que, les lactones sesquiterpéniques qui expriment des principes amers caractéristiques de la familles (**Harborne et Swain, 1969**).

C'est une plante à fleurs violettes parfumées juxtaposées sur un capitule de 4 cm de longueur et ces fruits sont des akènes gigantesques, cylindriques et d'une couleur brune. Cette plante est dépourvue de tiges (figures 2 et 3).

Les racines de cette plante sont volumineuses, charnus et pivotante. Ces racines englobent des rhizomes principales rampants qui forme un navet de grand dimension à compartiment très dure, jaunâtre et fibreuse (**Négre, 1962**).

Différentes recherches sur la composition chimique de *R. acaule* ont été réalisés. L'analyse des huiles de racines de *R. acaule* réalisé par **Chalchat et al., (1999)** montre que cette partie de la plante contient d'heptane (0,5%), de 1,8-cineole (Tr%), de Benzaldéhyde (0,8%), de 1-phenyle,2-propanone (0,2%), de (2, E) a-farnesene (0,2%), de Sesquiphellandrene (0,2%), de ar-curcumene (0,6%) et de 2-Benzyl-furylacetylene (97,2%). Ainsi, **Benyelles, 2009** a montré que les racines de *R. acaule* contient des terpènes (43,38%), des composés aromatiques (14,10%), des hydrocarbures et leurs dérivés (4,85%), des acides gras et leurs ester (7,97%), des époxydes et d'éthers (5,76%), des aldéhydes (2,82%) et de cétone (1,90%).

Les racines de *R. acaule* sont utilisées comme tonique, fortifiant, dépurative, cholagogue, digestive, apéritif et stimulant la sécrétion biliaire (**Benyelles et al., 2014**).

Les racines broyées de cette plante, mélangées au miel, diminuent les douleurs de l'intestin (**Lahsissene et al., 2009**). Les racines fraîches coupées en petits morceaux et mises en compresse sur les brûlures ont un effet cicatrisant fort, percutant et efficace (**Massoudi, 2005**).

La poudre de racines, mélangée au jaune d'œuf, est un remède pour les troubles respiratoires (affections pulmonaires ou pneumopathie) (**Lahsissene et al., 2009**).

Le fruit de *R. acaule* ingéré traite la gastrite (atteinte inflammatoire aigue ou chronique de la paroi ou de la muqueuse de l'estomac) (**Bouayyadi et al., 2015**).

De même, la plante en entier est utilisée pour le traitement des infections des voies urinaires, les maladies de la peau, les affections cutanées et les blessures (**Tucakov, 1971**).

Ainsi, d'autres troubles et maladies sont traités par cette plante tel que les douleurs gastriques, la tuberculose et les douleurs dentaires. Cette plante peut être utilisée comme antidote contre les poisons et comme vermifuge contre le ténia (**Garnier et al., 1961**).

Le tableau suivant présente quelques travaux sur l'activité antioxydante des racines de *Rhaponticum acaule*.

Tableau 3: Résultats de l'activité antioxydante des racines de *Rhaponticum acaule*.

Extraits testés	Méthode utilisé	Concentrations (mg/ml)	CI ₅₀ (mg/ml)	Références
Eau-méthanol	DPPH	1	0,31	(Bendimerad et al., 2018)
Acétate d'éthyle		1	0,36	
n-Butanol		1	0,42	
Eau-méthanol	DPPH	0,76	0,39	(Khaldi, 2017)
Acétate d'éthyle	DPPH	1	3,7	(Benmenni, 2017)
Eau-méthanol		1	0,31	
Eau-méthanol	FRAP	15	0,208	(Pille et al., 2016)
Acétate d'éthyle	DPPH	12	1,71	(Ais, 2016)

L'objectif principal de notre étude est l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de *Rhaponticum acaule* en utilisant le radicale libre DPPH.

Dans ce but nous envisageons :

- Une préparation des extraits aqueux et organiques à partir des racines de *Rhaponticum acaule* ;
- Une analyse phytochimique des extraits préparés : aqueux, eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-Butanol ;
- Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux ;
- Une étude de l'activité antioxydante des extraits de cette plante par la méthode de piégeage du radicale libre DPPH.



Figure 3 : Image de *Rhaponticum acaule* durant la floraison.



Figure 2 : Photographie de *Rhaponticum acaule* sur terrain.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé lors de notre étude est les racines de *Rhaponticum acaule* récolté à maturité en mois d'Avril dans la région de Tlemcen (Terni) (figure 4). Au sein de notre laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques, physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique », les racines de cette plante sont nettoyées et séchées à une température ambiante et à l'abri de l'humidité et de la lumière jusqu'au jour d'utilisation (figure 5).



Figure 4 : Carte Géographique de la localisation de *Rhaponticum acaule*.



Figure 5 : Racines de *Rhaponticum acaule*.

2. Extraction du matériel végétal

L'extraction est réalisée suivant le protocole de préparation des extraits organiques et aqueux à partir des racines de *Rhaponticum acaule* (figure 6).

2.1 Extraits aqueux (EA)

Extraction sous reflux à 50°C pendant 1h de 20 g de racines séchées dans 200 ml d'eau distillée. Après refroidissement, la solution est filtrée puis mis dans une étuve à 37°C pendant 48 h. Le produit obtenu est l'extrait aqueux.

2.2 Extrait eau-méthanol (EM)

- Pour préparer l'extrait EM, on procède à une macération de 20g de racines de *R. acaule* dans 100 ml du mélange eau-méthanol (20/80) pendant 48h sous agitation ;
- Filtration, puis évaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rotavapeur ;
- Récupération de l'extrait (EM).

2.3 Extrait acétate d'éthyle (EAc)

Cet extrait est récupéré à partir de l'extrait EM, après extraction et concentration de l'extrait eau-méthanol et traitement de la phase aqueuse récupérée par l'hexane ;

- La phase récupérée est traitée par l'acétate d'éthyle ;
- La phase d'acétate d'éthyle récupérée est évaporée à sec ;
- Récupération de l'extrait EAc .

2.4 Extrait n-Butanol (En-B)

Après l'extraction liquide-liquide de l'extrait EM par l'hexane et l'acétate d'éthyle, la phase aqueuse récupérée est soumise à une autre extraction liquide-liquide avec le n-Butanol ;

- La phase organique est évaporée à sec ;
- L'extrait n-butanol est récupéré.

2.5 Rendement de l'extraction

Le rendement des extraits secs est calculé selon le rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = (P_1 - P_2) / P_3 \times 100$$

P₁ : Poids du tube rempli par l'extrait ;

P₂ : Poids du tube vide ;

P₃ : Poids de la matière végétale de départ.

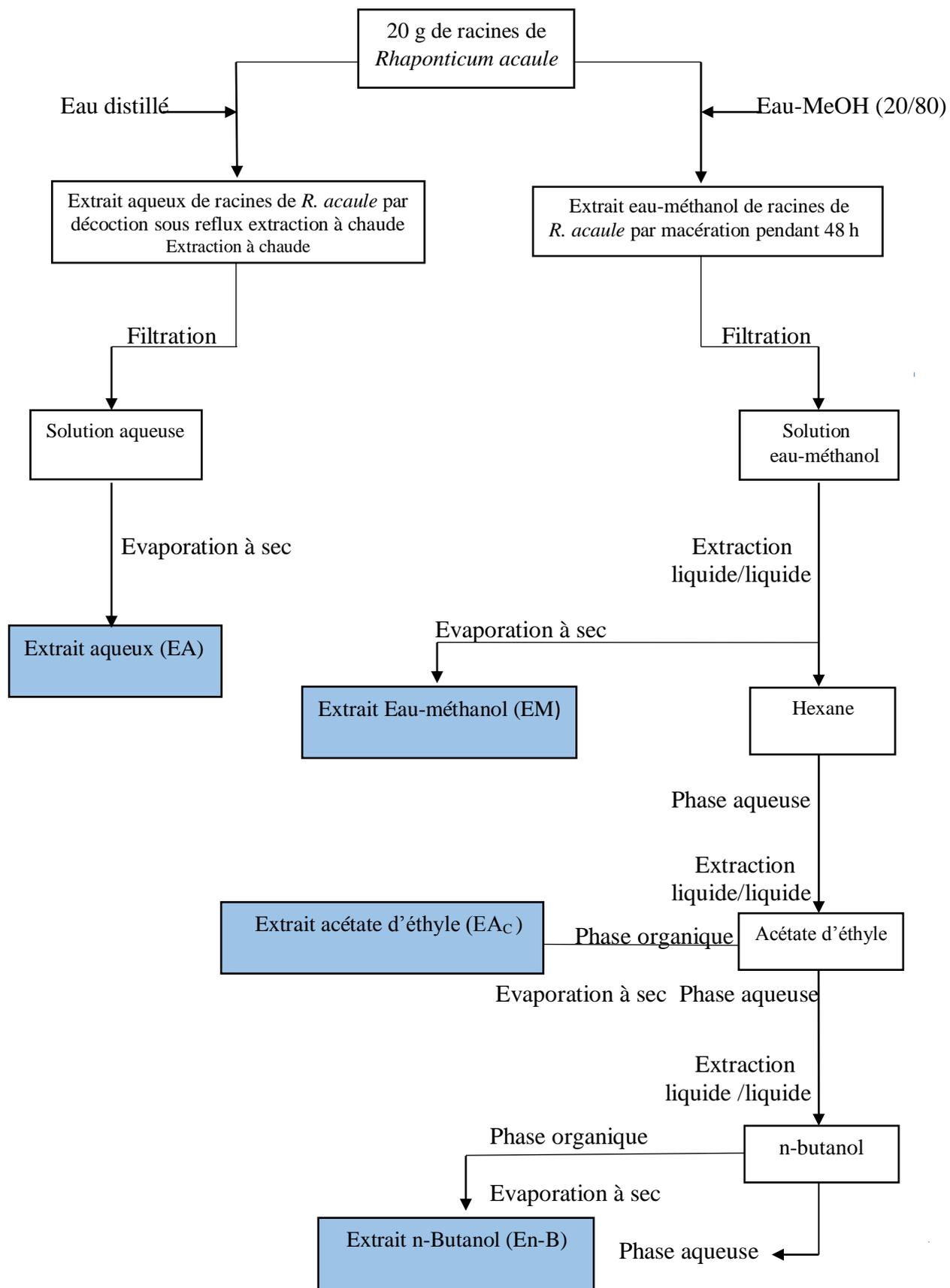


Figure 6 : Protocole de préparation des extraits aqueux et organiques des racines de *Rhaponticum acaule*.

3. Tests phytochimiques

Dans le but de connaître la composition des extraits préparés nous allons vérifier la présence ou l'absence de quelques composés phytochimiques en utilisant des réactifs chimiques spécifiques.

3.1 Protocole (Trease et Evans, 1987).

Alcaloïdes

Dans deux tubes à essai, nous mélangeons 0,5 ml de l'extrait à testé, quelques gouttes de HCl à 1% et 0,5 ml de réactif de Mayer dans le premier tube, et 0,5 ml du réactif de Wagner dans le second tube. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Tanins

Dans un tube à essai, mettre 1ml de l'extrait à analyser et ajouter 0,25 ml de chlorure ferrique (FeCl_3) à 1%. Le mélange est incubé à température ambiante durant 15 min. La présence des tanins est révélée par une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

Flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1 ml de l'extrait à analyser, ajouter 1 ml de HCl concentré et quelques morceaux de magnésium. La présence de flavonoïdes est mise en évidence par l'apparition d'une couleur rose, rouge ou jaune.

Quinones libres

Dans un tube à essai, mélanger 1 ml de l'extrait à analyser et 0,1 ml de NaOH à 1%. Un test positif (présence des quinones libres) est révélé par l'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violette.

Anthraquinones

1 ml de l'extrait à analyser est ajouté à 1 ml de NH_4OH à 10% sous agitations. La présence des anthraquinones est indiquée par l'apparition d'une coloration violette.

Saponines : test de mousse

10 ml de l'extrait à analyser est agité pendant 15 secondes puis laisser reposer pendant 15 min. La hauteur de la mousse supérieure à 1 cm désigne la présence de saponines.

Terpenoïdes

Test de Slakowski

1 ml de l'extrait à analyser est mélangé avec 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4 concentré). La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpenoïdes.

Composés réducteurs

Ajouter 1 ml de liqueur de Fehling à 1 ml d'extrait à analyser puis mélanger et incubé pendant 8 min dans un bain marie bouillant. La présence de composés réducteurs est indiquée par l'apparition d'un précipité rouge brique.

4. Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux

4.1 . Dosage de polyphénols totaux

Le dosage de polyphénols totaux des extraits de plantes est décrit par **Vermerris et Nicholson, (2006)**. Le principe de ce dosage est fondé sur une réaction de coloration par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est formé d'un acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'un acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), ce mélange de couleur jaune est réduit lors de l'oxydation des composés phénoliques en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdènes (MO_8O_{23}). Cette coloration présente un maximum d'absorption à 700 nm dont l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans l'extrait testé.

Mode opératoire

- Mélanger 0,1ml d'extrait (10 mg/ml) à 2 ml de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 2% fraîchement préparée ;
- Agiter et incubé pendant 5 min ;
- Ajouter 0,1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 0,2 N ;
- Incuber pendant 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante ;
- Mesurer l'absorbance à 700 nm contre le blanc (sans extrait).

Réaliser une gamme d'étalonnage à partir de l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations initiales (30 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 et 500 $\mu g/ml$) dans les mêmes conditions opératoires (**Singleton et al., 1999**).

Le mode opératoire du dosage des polyphénol totaux est résumé dans le tableau n°4

Tableau 4 : Mode opératoire du dosage de polyphénols dans les extraits de racines de *Rhaponticum acaule*.

Concentration de l'acide gallique (µg/ml)		Blanc	30	100	200	300	400	500				
Volume de l'acide gallique (ml)		-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1				
Les extraits (ml)	Aqueux								0,1			
	Eau-méthanol									0,1		
	Acétate d'éthyle										0,1	
	n-Butanol											0,1
Na₂CO₃ (ml)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Agitation et incubation pendant 5 min à température ambiante												
Folin-Ciocalteu (ml)		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 min												
Mesure de l'absorbance à 700 nm												

Les résultats obtenus sont exprimés en µg équivalent d'acide gallique /mg d'extrait (µg Eq AG / mg d'extrait). Ils sont calculés selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphénols}] = a.f / c$$

a : Concentration des polyphénols (µg / ml) déterminée à partir de la courbe étalon ;

f : Facteur de dilution (× 22) ;

C : Concentration d'extrait (10 mg/ml).

4.2 Dosage de flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux est réalisé suivant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et la soude (NaOH). Le principe de cette technique est basé sur une réaction formant un complexe jaune entre le AlCl₃ et les flavonoïdes qui change de couleur en ajoutant la soude et devient rose absorbant dans le visible à 510 nm (Zhishen *et al.*, 1999).

Mode opératoire

Le dosage de flavonoïdes totaux des extraits préparés à partir des racines de *Rhaponticum acaule* est réalisé par la méthode colorimétrique décrit par **Zhishen et al., (1999)**.

- Mélanger 0,2 ml de l'extrait à analyser avec 1 ml d'eau distillée et 0,075 ml de la solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15 % ;
- Incuber pendant 6 min à température ambiante ;
- Ajouter 0,075 ml de chlorure d'aluminium AlCl_3 à 10 % ;
- Incuber 6 min à température ambiante ;
- Ajouter 1 ml de NaOH solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 % ;
- Compléter le volume total à 2,5 ml avec l'eau distillée ;
- Homogénéiser le mélange et incuber pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- Mesurer l'absorbance à 510 nm contre le blanc.

Une gamme d'étalonnage est préparée en utilisant la catéchine (contrôle positif) à différentes concentrations initiales (1,25 ; 2,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 et 500 $\mu\text{g/ml}$) dans les mêmes conditions opératoires.

Le mode opératoire du dosage de flavonoïdes totaux est résumé dans le tableau n°5

Tableau 5 : Mode opératoire du dosage de flavonoïdes dans les extraits de racines de *Rhaponticum acaule*.

Concentration de la Catéchine (µg/ml)		1,25	2,5	25	50	100	200	300	400	500				
Volume de la Catéchine (ml)		0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25				
Les extraits (µl)	Aqueux										0,25			
	Eau-méthanol											0,25		
	Acétate d'éthyle												0,25	
	n-Butanol													0,25
Eau distillée (ml)		1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
NaNO₂ (15%) (ml)		0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
1^{ère} incubation pendant 6 min à température ambiante														
AlCl₃(10%) (ml)		0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
2^{ème} incubation pendant 6 min à température ambiante														
NaOH (4%) (ml)		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3^{ème} incubation à l'obscurité pendant 30 min														
Mesure de l'absorbance à 510 nm														

Les résultats obtenus sont exprimés en µg équivalent catéchine / mg d'extrait (µg Eq C/mg d'extrait). Ils sont calculés selon la formule suivante :

$$[\text{Flavonoïdes}] = a.f / C$$

a : Concentration des flavonoïdes (µg / ml) déterminée à partir de la courbe étalon ;

f : Facteur de dilution (× 10) ;

C: Concentration initiale de chaque extrait (10 mg / ml).

5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits aqueux et organiques de *Rhaponticum acaule*

5.1 Principe de la méthode DPPH

Le DPPH est un radical libre de couleur violacée, utilisé pour mesurer l'activité antioxydant d'une molécule. En présence de composés antiradicalaires, ce radical est réduit et change de couleur en virant au jaune. L'absorbance mesurée à 517 nm serve à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH qui est proportionnelle au pouvoir antiradicalaire de l'extrait testé.

5.2 Mode opératoire (tableau 6)

L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la méthode décrite par **Sanchez *et al.*, (1998)**.

- Préparer le DPPH à la concentration de 0,025 mg/ml dans du méthanol ;
- Préparer les extraits dans le méthanol à différentes concentrations (3 ; 10 ; 17 ; 25 et 30 mg /ml) ;
- Ajouter 1950 μ l de solution du DPPH à 50 μ l de chaque extrait à différentes concentrations ;
- Préparer le tube blanc pour chaque concentration : 50 μ l de l'extrait correspondant et 1950 μ l méthanol (qui remplace 1950 μ l de DPPH) ;
- Préparer le tube contrôle négatif : 50 μ l méthanol (qui remplace l'extrait) + 1950 μ l de la solution de DPPH ;
- Ainsi le tube blanc du contrôle négatif contient seulement 2 ml du méthanol ;
- Incuber 30 min à température ambiante et à l'obscurité ;
- Mesurer l'absorbance à 517 nm.

Préparer une gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique (contrôle positif) à différents concentrations (100 ; 200 ; 300 ; 400 et 500 μ g/ml) dans les mêmes conditions opératoires.

Tableau 6 : Mode opératoire pour mesurer l'activité antiradicalaire des extraits de *Rhaponticum acaule* sur le DPPH.

Concentration de l'acide ascorbique (µg/ml)		100	200	300	400	500					
Volume de l'acide ascorbique (ml)		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05					
Les extraits (ml) à différentes concentrations (3, 10, 17, 25, 30) mg/ml	Aqueux						0,05				
	Eau-méthanol							0,05			
	Acétate d'éthyle								0,05		
	n-butanol									0,05	
Control négatif MeOH (ml)											0,05
Volume de DPPH (ml)		1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95	1,95
Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité											
Mesure de l'absorbance à 517 nm											

5.3 Expression des résultats

5.3.1 Pourcentage de réduction du DPPH

Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du DPPH selon la formule suivante (Ladoh *et al.*, 2014).

$$\% \text{ DPPH} = \frac{(\text{DO}_C - \text{DO}_E)}{\text{DO}_C} * 100$$

% DPPH : Pourcentage de réduction du DPPH.

DO_C : Densité optique du DPPH (contrôle positif).

DO_E : Densité optique de l'extrait testé.

5.3.2 Détermination de l'CI₅₀

La valeur CI₅₀ représente la concentration d'antioxydant qui réduit 50 % de l'activité du DPPH. Cette valeur est obtenue graphiquement pour chaque extrait à partir de la régression

linéaire des pourcentages d'inhibitions de DPPH en fonction des concentrations variées des extraits testés. (Heilerova *et al.*, 2003).

5.3.3 Détermination de l'activité antiradicalaire

Les résultats peuvent être aussi exprimés en activité antiradicalaire (capacité antioxydant) déterminée par le calcul de l'inverse des valeurs des CI_{50} qui est inversement proportionnelle à la concentration (Torres, 2006).

ARP : Activité antiradicalaire.

CI_{50} : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

$$ARP = 1 / CI_{50}$$

Résultats et interprétations

1. Extraction

L'extraction des racines de *Rhaponticum acaule* citée en matériel et méthodes, a permis de récupérer les extraits sous différents aspects et couleurs avec des rendements variables (tableau 7).

Tableau 7 : Quelques caractéristiques des extraits de racines de *Rhaponticum acaule*.

	Masse (%)	Aspect	Couleur	Solubilité	Rendement (%)
Aqueux	2,078	Poudre	Marron Foncé	Eau et méthanol	10,39
Eau-méthanol	1,795	Hygroscopique	Rouge	Eau, méthanol et eau-méthanol	8,97
Acétate d'éthyle	2,123	Hygroscopique	Jaune	Eau et méthanol	5,30
n-Butanol	1,414	Hygroscopique	Marron Clair	Eau et eau-méthanol	3,54

Les résultats obtenus (tableau 7), montrent que l'aspect de la majorité des extraits récupérés est sous forme hygroscopique à l'exception de l'extrait aqueux qui est sous forme de poudre. Le rendement d'extraction le plus élevé est celui de l'extrait aqueux (10,39%), suivi par les extraits eau-méthanol (8,97%) et celui de l'extrait acétate d'éthyle (5,30%). Cependant, l'extrait n-Butanol présente le plus faible rendement (3,54%).

2. Tests phytochimiques

Les résultats obtenus par l'analyse phytochimique réalisée sur les extraits des racines de *Rhaponticum acaule* sont mentionnés dans le tableau 8

Tableau 8 : Résultats des tests phytochimique réalisés sur les extraits des racines de *R. acaule*.

Tests et extraits	Aqueux	Eau-méthanol	Acétate d'éthyle	n-Butanol
Alcaloïdes	++	++	++	++
Tanins	+++	+++	+++	+++
Flavonoïdes	+++	+++	+++	+++
Quinones libres	+++	+++	+++	+++
Anthraquinones	-	-	-	-
Saponines	++	++	++	++
Terpenoides	+++	+++	+++	+++
Composés réducteurs	+++	+++	+++	+++

(+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (-) : Test négatif.

Les résultats montrent une forte présence des tanins, flavonoïdes, quinones libre, terpenoides et composés réducteurs dans tous les extraits de racines de *R. acaule* tandis que les alcaloïdes et les saponines sont moyennement présents. Par contre les anthraquinones sont totalement absents dans les extraits de cette plante.

3. Dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux

Les dosages des polyphénols et flavonoïdes totaux ont été effectués par une technique spectrophotométrique utilisant le réactif de **Folin-Ciocalteu** et le **trichlorure d'aluminium** respectivement.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau n°9. Les courbes étalons de l'acide gallique et la catéchine sont représentées dans les figures 7 et 8 respectivement.

Tableau 9 : Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits des racines de *Rhaponticum acaule*

Extraits	Polyphénols ($\mu\text{g Eq AG/ mg Ext}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g Eq C/ mg Ext}$)
Aqueux	138,80 \pm 0,02	84,82 \pm 0,03
Eau-méthanol	166,94 \pm 0,01	194,5 \pm 0,04
Acétate d'éthyle	396,87 \pm 0,05	241,59 \pm 0,03
n-Butanol	351,51 \pm 0,03	223,64 \pm 0,01

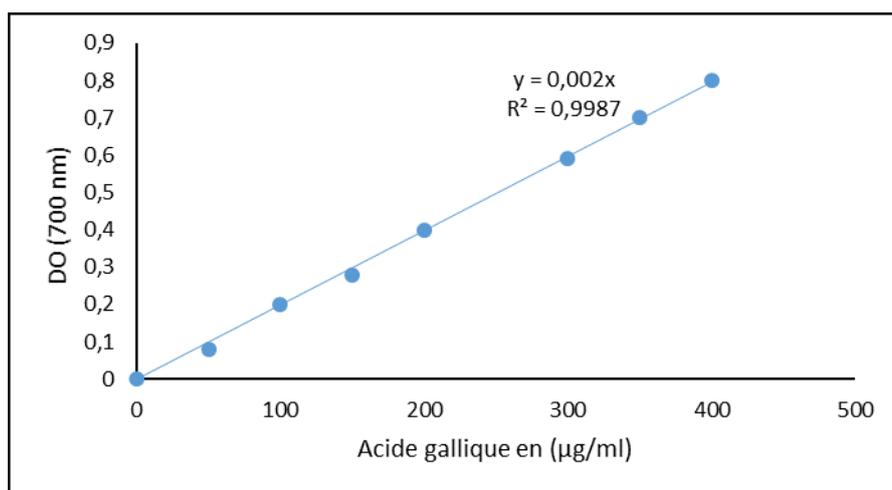


Figure 7 : courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

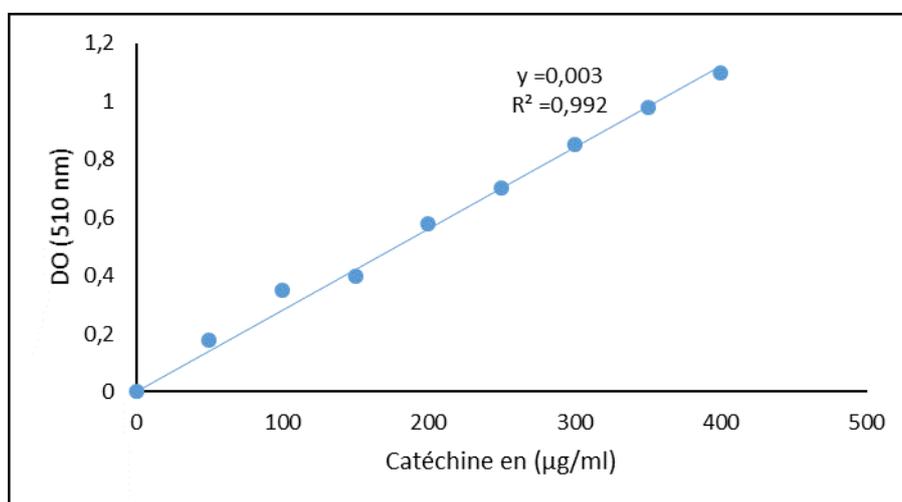


Figure 8 : Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

Selon les résultats mentionnés dans le tableau 9, nous constatons que les extraits organiques et aqueux renferment des quantités importantes de polyphénols et de flavonoïdes. L'extrait acétate d'éthyle et n-Butanol expriment le taux le plus élevée en polyphénols et flavonoïdes 396,87 µg Eq AG/mg Ext, 241,59 µg Eq C/mg Ext et 351,51 µg Eq AG/mg Ext, 223,64 µg Eq C/mg Ext, respectivement suivi par les extraits eau-méthanol et aqueux dont les teneurs en polyphénols se rapproche 166,94 et 138,80 µg Eq AG/mg Ext, respectivement mais les teneurs en flavonoïdes se diffèrent 194,5 et 84,82 µg Eq C/mg Ext, respectivement.

4. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits aqueux et organiques des racines de *Rhaponticum acaule* sur le DPPH

Les résultats de l'effet antioxydant des extraits aqueux, eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-Butanol des racines de *R. acaule* sont mentionnés dans le tableau 10 en pourcentage de

réduction. Le tableau 11 représente le pourcentage de réduction du DPPH par l'acide ascorbique. Ainsi, le tableau 12 regroupe les CI_{50} et l'activité antiradicalaire des différents extraits testés et de l'acide ascorbique.

Tableau 10 : Pourcentage de réduction du DPPH par les extraits aqueux et organiques des racines de *R. acaule*

	Concentration (mg/ml)				
	3	10	17	25	30
Extrait aqueux	21,08	51,97	70,62	88,99	93,20
Extrait eau-méthanol	39,57	59,39	73,99	90,00	94,30
Extrait acétate d'éthyle	28,87	56,18	73,86	88,20	96,25
Extrait n-Butanol	32,53	59,12	75,69	89,67	94,30

Tableau 11 : Pourcentage de réduction du DPPH par l'acide ascorbique à différentes concentrations.

Concentration (mg/ml)	100	200	300	400	500
% de réduction du DPPH	34,42	52,80	69,66	84,34	97,80

Tableau 12 : CI_{50} des extraits aqueux et organiques des racines de *Rhaponticum acaule* et de l'acide ascorbique.

	Acide ascorbique	Extrait aqueux	Extrait eau-MeOH	Extrait acétate d'éthyle	Extrait n-Butanol
CI_{50} (mg/ml)	0,18±0,23	11,88±0,20	5,98±0,13	9,30±0,19	7,98±0,21
Activité antiradicalaire 1 / CI_{50}	5,55	0,08	0,17	0,11	0,12

Selon les résultats représenté dans le tableau 10, nous remarquons qu'après 30 min une augmentation de l'activité antiradicalaire proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits testés. A faible concentration (3 mg/ml) les extraits présentent des pourcentages de réduction du DPPH variable, le pourcentage le plus élevé est celui de l'extrait eau-méthanol (39,57%), suivi par n-butanol, acétate d'éthyle et aqueux avec les pourcentages 32,53 ; 28,87 et 21,08 % respectivement. De même, à 10 mg/ml, tous les extraits atteint un

pourcentage de réduction supérieur à 50 %. A forte concentration (30 mg/ml), le pourcentage de réduction du DPPH de l'ensemble des extraits dépasse 90 %.

D'après les CI_{50} obtenue (plus la valeur est basse plus l'activité est grande), l'extrait eau-méthanol présente la plus faible valeur 5,98 mg/ml, suivi par les extraits n-Butanol et acétate d'éthyle dont l' CI_{50} est de l'ordre de 7,98 mg/ml et 9,30 mg/ml respectivement. Tandis que l'extrait aqueux présente une valeur plus élevée 11,88 mg/ml. En comparant ces résultats avec l'acide ascorbique ($CI_{50} = 0,18$), ce dernier présente un effet nettement supérieur par rapport aux extraits.

De même, l'activité antiradicalaire de l'extraits aqueux, eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol est 0,08 ; 0,17 ; 0,11 et 0,12 respectivement. Alors que l'acide ascorbique présente une activité antiradicalaire plus élevée (5,5).

Discussion

Depuis longtemps l'homme utilise les plantes et les herbes pour se soigner sans savoir sa constitution. Aujourd'hui des études sont menées sur les plantes d'intérêt médicale pour déterminer ses composés actifs. Ces plantes sont une source inépuisable des antioxydants naturels. Les travaux de recherche réalisés sur les antioxydants naturels reflètent leur importance dans plusieurs domaines tel que le domaine médical et le domaine alimentaire nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et le pouvoir antioxydant de différents extraits de racines de *Rhaponticum acaule* (Larousse, 1981 ; Bechlaghem, 2009).

Rhaponticum acaule communément connu sous le nom « Tafgha » de la famille des Astéracées. En médecine traditionnelle, *R. acaule* est utilisée pour traiter la bronchite, la fièvre, les hémorragies, les tumeurs, les douleurs gastriques et dentaires...etc.

Afin d'évaluer l'activité antioxydante de cette plante nous avons préparé différents extraits aqueux et organiques à partir de racines de *R. acaule*. L'étude phytochimique des extraits préparés aqueux (EA), eau-méthanol (MeOH), acétate d'éthyle (EAc) et n-butanol (n-But), nous a permis de déterminer le rendement massique de chaque extrait. Le rendement de l'extrait aqueux est plus important (10,39%) par rapport au rendement des extraits organiques eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-Butanol (8,975% ; 5,3075% et 3,5375%, respectivement).

Les résultats obtenus sont inférieurs à ceux obtenus par **Khaldi, (2017)** qui a réalisé une étude phytochimique sur les racines de *Rhaponticum acaule* dont l'extrait eau-méthanol était obtenu avec un rendement de 16,88%. Les rendements des extraits eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-Butanol des racines de *R. acaule* obtenus par **Bendimerad et al., (2018)** sont inférieurs à ceux obtenus lors de notre étude, ils sont de l'ordre de 5% ; 1,18% et 2% respectivement. Aussi, l'étude réalisée par **Benmenni, (2017)** montre des rendements des extraits organiques des racines de *R. acaule* estimés à 15,49% pour l'extrait eau-méthanol et 7,52% pour l'acétate d'éthyle ; ces valeurs restent supérieures à ceux que nous avons obtenus. En examinant les travaux de **Fifra, (2017)** et **Djefjel, (2017)** sur les racines de *R. acaule*, les valeurs des rendements d'extraction sont variables et restent supérieures aux nôtres. **Fifra, (2017)** a récupéré 13,82% d'extrait eau-méthanol ; 17,29% pour l'acétate d'éthyle et 3,59% pour n-butanol. **Djefjel, (2017)** a trouvé 20,18% pour l'extrait eau-méthanol et 18,22% pour l'extrait acétate d'éthyle. Ainsi, les résultats obtenus par **Bouchriha et Habbar, (2009)** sur les racines de *R. acaule* montrent des rendements de l'ordre de 11% pour l'extrait n-butanol et de 15,21% pour l'acétate d'éthyle. Ce qui est largement supérieur par rapport à nos rendements. Tandis qu'ils ont récupéré 0,5% pour l'extrait eau-méthanol. Ce résultat est inférieur à celui obtenu lors de notre étude. La différence entre les valeurs du rendement de

chaque extrait est due au polarité, pH, spécificité, température, solubilité et la nature du solvant utilisé (**Snyder et Kirk, 1979**).

Les tests phytochimique réalisés sur l'ensembles des extraits de racine de *R. acaule* ont permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, des coumarines et des composés réducteurs. De même une absence totale des anthraquinones dans l'ensemble des extraits.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de **Benyelles, (2009)** qui ont montré que les racines de *R. acaule* sont riches en tanins, en flavonoïdes et en saponines dans les extraits aqueux et organiques (eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol) et concernant les alcaloïdes leurs présence est faible dans l'ensemble des extraits de cette plante. Ainsi, l'étude réalisée par **Bechlaghem, (2009)** confirme la richesse de cette plante en composés réducteurs au niveau de l'extrait eau-méthanol. Cependant on assiste à quelques divergence en comparant nos résultats avec ceux obtenus avec le même auteur concernant la présence des alcaloïdes en faible quantité dans les extraits acétate d'éthyle et n-butanol. Les études réalisées par **Benmenni, (2017)** confirment que les extraits acétate d'éthyle et eau-méthanol des racines de *Rhaponticum acaule* sont très riches en tanins, flavonoïdes et alcaloïdes par contre les coumarines, les anthraquinones et les composés réducteurs sont complètement absents dans l'ensembles de ces extraits organiques des racines de cette plante. **Bendimerad et al., (2018)** ont trouvé que les extraits organiques des racines de cette plante renferment des quantités forte et considérables en flavonoïdes, en tanins à l'exception des alcaloïdes qui sont présents en petite quantité. Mais d'après **Semmler, (1889)** les extraits organiques eau-méthanol et acétate d'éthyle de cette plante renferment de faible quantité en tanins alors que les terpenoides sont abondants. Ces résultats sont différents à nos résultats et à ceux reportés par **Djefjel, (2017)** qui a montré que les racines de *R. acaule* contiennent plus de flavonoïdes que les tanins et les alcaloïdes dans les extraits eau-méthanol et acétate d'éthyle. D'autre travaux réalisés par **Bouchriha et Habar, (2009)** exprime la richesse des racines de *R. acaule* en alcaloïdes, en flavonoïdes et en tanins au niveau des extraits organiques. Les résultats obtenus par **Fifra, (2017)** indiquent que les extraits organiques eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol des racines de *R. acaule* renferment des quantités important en alcaloïdes, flavonoïdes et tanins, ce qui confirment les résultats des tests phytochimique obtenus par notre étude.

Les différences entre les résultats obtenus sont dépendues à la durée de stockage, la région et à la saison de récolte de cette plante. Les modes d'extractions utilisés lors de notre étude sont la décoction et la macération.

Au cours de cette analyse nous avons également déterminé le taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux. Les résultats obtenus ont montré que les extraits organiques et aqueux des racines de *R. acaule* sont très riches en polyphénols et en flavonoïdes. Les extraits eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol présentent des teneurs plus élevés en polyphénols et flavonoïdes 166,94 µg Eq AG/ mg Ext, 396,87 µg Eq AG/ mg Ext, 351,51 µg Eq AG/ mg Ext, respectivement en polyphénols et 194,5 µg Eq C/ mg Ext, 241,59 µg Eq C/ mg Ext, 223,64 µg Eq C/ mg Ext, respectivement en flavonoïdes suivi par l'extrait aqueux dont la teneur en polyphénols est de 138,80 µg Eq AG/ mg Ext et 84,82 µg Eq C/ mg Ext en flavonoïdes.

Nos résultats, expriment des teneurs plus importante en polyphénols et en flavonoïdes comparés à celles de **Bendimerad *et al.*, (2018)** dont les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits organiques eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-Butanol des racines de *R. acaule* sont de l'ordre de 97,89±0,02 µg Eq AG/mg Ext, 64,42±0,02 µg Eq AG/mg Ext, 78,96±0,05 µg Eq AG/mg Ext, respectivement en polyphénols et 45,05±0,06 µg Eq C/mg Ext, 23,50±0,13 µg Eq C/mg Ext, 33,30±0,02 µg Eq C/mg Ext, respectivement en flavonoïdes. **Djeffel, (2017)** montre que la teneur en polyphénols totaux des extraits organiques eau-méthanol et acétate d'éthyle sont de l'ordre de 662 µg Eq AG/mg Ext, 727 µg Eq AG/mg Ext, respectivement mais 240 µg Eq C/mg Ext, 260 µg Eq C/mg Ext, respectivement en flavonoïdes. Ces valeurs sont plus importantes et largement supérieurs par rapport à nos résultats.

Les différences dans les résultats obtenus sont principalement liées à la composition de la plante qui est influencée par le mode d'extraction (décoction, macération...), par les solvants utilisés (organiques ou aqueux), par les facteurs écologiques (climat, période de récolte...) et par les conditions expérimentales au laboratoire (**Wichtl, 2002**).

Dans le but de déterminer l'activité antioxydante des extraits de racines de *R. acaule* la méthode de DPPH (2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl) a été utilisée. Cette dernière est basée sur l'utilisation du radical libre DPPH qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour la détermination de l'activité antioxydante des composés phénoliques en déterminant la réduction du radical libre DPPH ou par l'CI₅₀ où 50% DPPH est réduit par ces composés.

Aussi, l'activité antiradicalaire ($1/CI_{50}$) détermine un paramètre de mesure de l'activité antioxydante (**Popovici et al., 2009**).

Les résultats obtenus pour la mesure de l'activité antioxydante montre que l'activité antiradicalaire augmente proportionnellement à l'augmentation de la concentration des extraits testés après 30 min d'incubation. À faible concentration (3 mg/ml), le pourcentage le plus élevé est celui de l'extrait eau-méthanol (39,57%), suivi par n-butanol (32,53%), acétate d'éthyle (28,87%) et aqueux (21,08%). À 10 mg/ml, l'ensemble des extraits aqueux et organiques atteint un pourcentage de réduction supérieur à 50%. À fort concentration (30 mg/ml), le pourcentage de réduction du DPPH de tous les extraits dépasse 90% comparable à des pourcentages de réduction du DPPH de l'acide ascorbique, ce dernier à faible concentration (100 μ g/ml) réduit 34,42% du DPPH. De même à 200 μ g/ml, 300 μ g/ml et 400 mg/ml le pourcentage de réduction est supérieur à 50 %. À fort concentration (500 μ g/ml) ce pourcentage de réduction plus que 90%.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par **Pille et al., (2016)**, ces derniers confirment que l'extrait méthanolique de racines de *R. acaule* présente des pourcentages de réduction de DPPH variables, On constate que nos valeurs reflètent un meilleure effet antioxydante. Ces auteurs à 15 mg/ml d'extrait trouvent un pourcentage de l'ordre de 50%. Ainsi, à la concentration de 5 mg/ml, le pourcentage de réduction de DPPH atteint 35%. D'autres résultats reportés par **Benmenni, (2017)** montrent qu'à faible concentration de 0,125 mg/ml l'extrait eau-méthanol réduit 36,89% du DPPH, suivi par l'extrait acétate d'éthyle avec 10,72%. A 0,5 mg/ml le pourcentage de réduction du DPPH de l'extrait méthanolique dépasse 50% par contre l'acétate d'éthyle (4,21%). A forte concentration (1mg/ml) le pourcentage le plus grand est celui de l'extrait eau-méthanol (74,91%) tandis que l'acétate d'éthyle avec 11,56%. Les résultats obtenus par **Bendimerad et al., (2018)** montrent qu'à faible concentration, les extraits eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol réduisent 36,89% ; 36,03% et 37,63% respectivement tandis que, l'acide ascorbique réduit 8,55% à la concentration (0,125 mg/ml). A 0,5 mg/ml le pourcentage le plus élevé est celui de l'extrait eau-méthanol (67,54%), suivi par l'acétate d'éthyle (57,04%) et n-butanol (53,72%) par rapport à l'acide ascorbique avec un pourcentage de 91,21%. A forte concentration (1 mg/ml) le pourcentage de réduction du DPPH est de l'ordre de 90% pour l'extrait acétate d'éthyle, 81,38% pour l'extrait n-butanol et 74,91% pour l'extrait eau-méthanol par rapport à l'acide ascorbique qui réduit 93,16% du DPPH. Ces valeurs montrent une efficacité antioxydante plus importante que la nôtre.

Concernant les valeurs CI_{50} obtenus, La CI_{50} de l'extrait aqueux est de (11,88 mg/ml) suivi par l'extrait acétate d'éthyle (9,30 mg/ml) ensuite, l'extrait n-Butanol (7,98 mg/ml) et l'extrait eau-méthanol (5,98 mg/ml) par rapport à l'acide ascorbique dont CI_{50} est de (0,18 mg/ml).

En comparant nos résultats avec ceux de **Bendimerad et al., (2018)** qui montrent que les extraits organiques de racines de *R. acaule* sont doués de pouvoir antiradicalaire plus important, la CI_{50} des extraits eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol sont de l'ordre de 0,31mg/ml ; 0,36 mg/ml et 0,42 mg/ml respectivement, comparé à la CI_{50} de l'acide ascorbique qui est de l'ordre de 0,18 mg/ml. En comparant nos résultats avec ceux de **Khaldi, (2017)** dont les résultats indiquent que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de racines de *R. acaule* est plus importante avec une CI_{50} de l'ordre de 0,39 mg/ml, comparés à la CI_{50} de l'acide ascorbique (0,063 mg/ml). Aussi, d'autres études réalisées par **Benmenni, (2017)** montrent que les extraits acétate d'éthyle et eau-méthanol de racines de *R. acaule* sont doués de capacité antioxydante avec une CI_{50} de 3,7 mg/ml ; 0,31 mg/ml comparé à la CI_{50} de l'acide ascorbique (0,4 mg/ml). Ces valeurs de CI_{50} obtenus par ces auteurs sont inférieures à nos résultats. Les résultats obtenus par **Pille et al., (2016)** montrent un pouvoir antioxydant plus important de l'extrait méthanolique avec une valeur de CI_{50} égale à 0,208 mg/ml. La CI_{50} de l'acide ascorbique est de 0,2 mg/ml. **Ais, (2016)** enregistre pour l'extrait acétate d'éthyle de racines de *R. acaule* une CI_{50} de 1,71 mg/ml et pour l'acide ascorbique une CI_{50} de 0,158 mg/ml. Nos valeurs de CI_{50} sont plus élevées que celles reportées par ces auteurs ; ce qui montre une activité faible de nos extraits.

Concernant l'activité antiradicalaire (ARP) de l'ensemble des extraits aqueux et organiques (eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol) de racines de *Rhaponticum acaule* est variable de l'ordre de 0,08 ; 0,17 ; 0,11 et 0,12 respectivement par rapport à l'acide ascorbique dont l'activité antiradicalaire est de (5,5).

Nos résultats sont inférieurs avec ceux de **Benmenni, (2017)** qui montrent que les extraits acétate d'éthyle et eau-méthanol sont doués d'activité antiradicalaire plus importante avec $ARP= 0,27$ et $ARP= 3,22$ respectivement comparable à celle de l'acide ascorbique ($ARP= 2,5$). Selon, **Bendimerad et al., (2018)** ont constatés que la capacité antiradicalaire des extraits organiques eau-méthanol (3,22) ; acétate d'éthyle (2,77) et n-butanol (2,38), par rapport à l'acide ascorbique (5,55). De plus **Khaldi, (2017)** a confirmé que l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique avec ($ARP= 2,56$) et celle de l'acide ascorbique ($ARP= 15,87$). D'après, **Ais, (2016)** l'extrait acétate d'éthyle de cette plante est doué

d'activité antiradicalaire avec un ARP de 0,58 par rapport à l'ARP de l'acide ascorbique (6,33).

Les études obtenues par **Pille et al., (2016)** confirment que l'extrait méthanolique avec un ARP de 4,81 comparé à l'acide ascorbique avec un ARP de 5. Les valeurs de l'activité antiradicalaire obtenus par ces auteurs sont beaucoup plus supérieur à nos résultats. L'effet de la plante médicinale est attribué à une différence de composition de leurs extraits étudiés, cette différence est la conséquence d'utilisation de solvants de polarité différente (**Oyedeji et al., 2011**).

Selon nos résultats, on constate que cette activité antioxydante des extraits de racines de *R. acaule* dépend probablement de la composition chimique de ces racines en particulier les polyphénols et les flavonoïdes. Selon la bibliographie ces composés sont connus par leur effet antioxydante qui neutralise les radicaux libres en libérant un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle (**Ono et al., 2006 ; Nkhili, 2009**).

D'après les résultats obtenus par notre étude qui inclus les tests phytochimique et le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux on peut déduire que l'activité antioxydante exercée par les extraits de racines de *R. acaule* est liée à leur richesse en polyphénols et flavonoïdes en particulier. Ces composés sont doués d'effet antioxydant important. Grâce à leurs vertus médicinales cette plante est qualifiée comme plante médicinale (**Bruneton, 1993**).

L'activité antiradicalaire de *Rhaponticum acaule* peut la qualifier comme plante médicinale qui peut être utilisée comme plante antioxydante, seulement ses effets thérapeutiques ne se limitent pas à ça, mais incluent également des propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et même anticancéreuses (**Ben Abdelkader et al., 2010**).

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs vertus thérapeutiques et jouent un rôle primordial dans les domaines de l'alimentation, la santé, l'énergie, la construction, l'environnement...etc. Elles constituent un patrimoine précieux et un véritable trésor pour l'humanité.

Au cours de notre étude, nous avons constaté que les extraits organiques sont riches en polyphénols et flavonoïdes par rapport à l'extrait aqueux. Ainsi ces extraits organiques présentent une CI_{50} faible par rapport à l'extrait aqueux ce qui signifie une activité antioxydante plus intéressante qui est probablement liée à leurs compositions chimiques en particulier les polyphénols et les flavonoïdes. Ces derniers sont des antioxydants naturels dont le rôle est le blocage de mécanisme d'action, le fonctionnement, la formation et les effets nocifs des radicaux libres qui sont favorisés habituellement par le stress oxydatif.

De ce fait, il serait souhaitable d'approfondir cette étude en s'intéressant à :

- L'isolement des composés présents dans les extraits par HPLC ou CPL (Chromatographie en Phase Liquide), et leurs identifications.
- Utiliser d'autres techniques de mesure de l'activité antioxydante de ces extraits exemple la méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxydant power), la méthode de molybdate d'ammonium (Total Antioxydant Capacity) et la méthode de ABTS (acide 2,2'-Azino-Bis-3-éthylbenzoThiazoline-6-Sulphonique).
- Chercher d'autres activités biologiques de cette plante (anticancéreuse, antifongique, antibactérienne, antimicrobienne, anticoagulante...etc) en utilisant des techniques adéquates.

Références bibliographiques

- Ais, M. (2016).** Contribution à l'étude d'évaluation du pouvoir antioxydant des racines de *Carlina acaulis* (Tafgha) de la région de Tlemcen. Mémoire de master, *Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen.*
- Arteel, G., Marsano, L., Mendez, TC., Bentley., & McClainF, C. J. (2003).** "Advances in alcoholic liver disease". *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17- 625.
- Atta, N. F., El-Kady, M. F., & Galal, A. (2010).** Simultaneous determination of catecholamines, uric acid and ascorbic acid at physiological levels using poly (N-methylpyrrole) /Pd-nanoclusters sensor. *Analytical Biochemistry*, 78-400.
- Bechlaghem, K. (2009).** Screening phytochimique de la *rhapontique*, une plante commune dans toute l'Algérie septentrionale. Mémoire de magister en chimie organique, *Université-Abou Bakr Belkaid. Tlemcen*, p 11,15,88.
- Beckman, K.B., & Ames, N. B. (1998).** The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 78 (3), 547-581.
- Ben Abdelkader, H., Salah, K. BH., Liouane, K., Boussaada, O., & Gafsi, K. (2010).** Antimicrobial activity of *Rhaponticum acaule* and *Scorzonera undulata* growing wild in Tunisia. *African Journal of Microbiology*, 4(19), 1954-1958.
- Benarba, B., Douad, O., Gadoum, C., Belhouala, K., & Mahdjour, S. (2021).** Phytochemical profile, antioxydant and anti-inflammatory activities of *Ephedra alata* Decne growing in south Algeria.
- Bendimerad, F. M., Beghdad, M.C., El Haci, I.A., Soualem, Z., Belarbi, M & Bekkara, F.A. (2018).** Bioactive compounds and antioxydant activity of *Rhaponticum acaule*, 2nd *International congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry*, p 167-193.
- Benghanou, M. (2012).** La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel infirmier de la santé publique. *Institut de formation paramédical Chettia, Alger*, p56.
- Benmmeni, D. (2017).** Contribution à l'évaluation du pouvoir antioxydant par le DPPH de quelques métabolites secondaires (Tanins, flavonoïdes, alcaloïdes...) de la racine de *carlina acaulis* de la région de Tlemcen. Mémoire de master en science des aliments, *Université-Abou Bakr Belkaid. Tlemcen*, p 36, 37, 43.
- Benyelles, B. (2009).** Composition chimique de quelques extraits de la partie aérienne de *Rhaponticum acaule* L. Mémoire de magister en chimie, *Université-Abou Bakr Belkaid. Tlemcen*, p 09, 11, 56.

- Benyelles, B., Allali, H., Dib, M.EA., Djabou, N., Tabti, B., & Costa, J. (2014).** Essential oil from *Rhaponticum acaule* L. roots : comparative study using HS-SPME/GC/GC–MS and hydrodistillation techniques. *J Saudi Chem Soc*, 18(6), 972-976.
- Berger, M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 (3), 48-53.
- Besançon. (2012).** Progrès en dermato-allergologie. Ed. *John Libbey Eurotext. Paris.*
- Bouayyadi, L., El hafian, M., & Zidane, L. (2015).** Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale dans la région du Gharb, Maroc. *Journal of Applied Bio sciences*, 93, 8760 - 8769.
- Bouchriha, A., & Habbar, A. (2009).** Evaluation du pouvoir antioxydant des tanins, des flavonoïdes et des alcaloïdes de *carlina acaulis* (Tafgha) et *mesembryanthemum crystallinum* (Fravh n'da) de la région de Tlemcen. Mémoire d'Ingénieur d'état en Biologie, *Université de Tlemcen*, P 35, 36, 38, 39.
- Bousta, D., & Ennabili, A. (2011).** The contribution of the National Institute of Medicinal and Aromatic Plants to the development of phytotherapy in Morocco. *Phytothérapie*, 9(5), 297-303.
- Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition. Paris, *Lavoisier Techniques & Documentation, Paris Lavoisier*, p 815.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie ; phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. Paris, *Lavoisier Tech & Doc*, p 915.
- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.L., & Sauvaigo, S. (2002).** Recent aspects of oxydative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repairglycosylases. *Biol Chem*, 383 (6), 93-125.
- Carrière, A., Galinier, A., & Fernandez, Y. (2006).** Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Med Sci (Paris)*, 22 (1), 47-53.

- Chalchat, J.C., Garry, R. Ph., & Muhayimana, A. (1999).** Essential oil of tagetes minuta from Rwanda and France : Chemical composition according to harvesting location, growth stage and part of plant extracted. *J. Essent. Oil. R*, 7, 375-386.
- Cleur, C., & Carrilon, A.C. (2012).** La plante médicinale. Notion de totum-implication en phytothérapie. Clinique intégrative. Ph., *Société internationale de médecine endobiogénique et de physiologie intégrative*.
- Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2011).** Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology*, 7(8), 504-511.
- Djefel, H. (2017).** Contribution à l'étude phytochimique de quelques métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes) du *carlina acaulis* de la région de Tlemcen. Mémoire de master en Sciences des aliments, *Université Abou bekr Belkaid. Tlemcen*, P 29, 30, 36, 38, 39.
- Dröge, W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95.
- Eddhima, Z. (2019).** Les radicaux libres : effets, mecanismes et approches therapeutiques (Doctoraldissertation).
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 270, 108-115.
- Favier, A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Françaises*, 64, 390-396.
- Fifra, F. (2017).** Contribution à l'évaluation du pouvoir antioxydant du DPPH de quelques métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes et alcaloïdes) de *carlina acaulis* (tafgha) de la région de Tlemcen. Mémoire de Master, *Université de Tlemcen*, P 31, 32.
- Garnier, G., Bézanger, B. L., & Debraux, G. (1961).** Ressources médicinales de la flore française Tome 1. *Vigot Frères*, 2 (37), 134-139.
- Goudable, J. & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraaigne, J. O., Charlier, C. & Chapelle, J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de liège*, 62 (10), 628-638.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004).** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : How should you do it and what do the results mean ? *Br. J. Pharmacol*, 142, 231-255.

- Hamma, S.A., Nouri, N., Fergani, I., Lekhal, A., Cheriet, S., Abadi, N., Lezzar, A., & Benlatreche, C. (2015).** Biologie des espèces réactives et stress oxydant. *Journal Algérien de Médecine*, XXIII (2), 48-53.
- Harborne, J.B., & Swain, T. (1969).** Perspectives In Phytochemistry, *Academic Press*. London, New York.
- Harman, D. (1981).** The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11), 7124-7128.
- Heilerova, L., Buckova, M., Tarapcik, P., Silhar, S., & Labuda, J. (2003).** Comparison of antioxydative activity data for aqueous extract of lemon balm (*Melissa officinalis* L), oregano (*Oreganum vulgare* L), thyme (*Thymus vulgaris* L) and agrimony (*Agrimonia eupatoria* L) obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor. *Czech J. Food Sci*, 21(2), 78-84.
- Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., Zha, E., De la Roque, R., De la Roque, O., Vican, P., Deesalle –Féat, T., Biaujeaud, M., Ringuet, J., Bloth, J., & Botrel, A. (2001).** Larousse des plantes médicinales : Identification, Préparation, Soins. *Ed Larousse*, p 10-12.
- Jung, T., Bder, N., & Grune, T. (2007).** Oxidized proteins : intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462, 231-237.
- Khalidi, S. (2017).** Evaluation de l'activité biologique de *Rhaponticum acaule*. Mémoire de master en analyse et contrôle de qualité, *Université Kasdi Marbah Ouargla*, p 35, 37.
- Khennaoui, H., & Ghiti, F. (2022).** Evaluation des activités antioxydantes, anticholinestérasiques, antidiabétiques et antimoisissures *in vitro* des extraits de deux plantes *Ambrosia artemisiifolia* et *Erodium montanum*. Mémoire de master en biochimie appliquée, *Université Frères Mentouri Constantine*.
- Lacoste, S. (2014).** Ma bible de la phytothérapie. *Édition quotidien MALIN. Paris, France*, p 648.
- Ladoh, yemeda C-F., Dibong, S.D., Nyegue, M.A., Djembissi Talla, R.P., Lenta Ndjakou, B., Mpondo Mpondo, E., Yinyang, J., & Wansi, J.D. (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of applied Biosciences*, 84, 7636-7643.
- Lahsissene, H., Kahouadji, A., Tijane, M., & Hseini, S. (2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Revue de botanique Lejeunia, Nouvelle série*, 8-186.

- Larousse, A. (1981).** (Larousse, Ed.) Paris.
- Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., & Post, M. (2001).** Oxydative stress and human disease. Current Knowledge and perspectives for prevention. *Presse Medicale* (1983), 30, 1076-1081.
- Levine, R.L. (2002).** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*, 32(9), 790-796.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxydants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4(8), 118-126.
- Majidi, M. R., Khoshkdaman, T., & Nazarpur, M. (2010).** Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Uric Acid in Blood Serum Using an Overoxidized Polypyrrole FilModified Glassy Carbon Electrode. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 15 (6), 351.
- Massoudi, S. (2005).** Plantes médicinales .1ère édition *par elfikre Tunis*, p 160.
- Mercan, D. (2010).** Le Stress Oxydatif A.R.L. *Unilabs A.R.L Lausanne*, p 3-15.
- Migdal, C. & Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Medecine/ sciences*, 27(4), 405-412.
- Monique, G.A., Dominique, B. R., Zohreh, A., & Daniel, J. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, P 91.
- Morel, J. M. (2020).** Dans la phyto-Aromathérapie. *Cairn. Info*, 124-125.
- Murphy, R.C. (1996).** Free radical-induced oxidation of glycerophosphocholine lipids and formation of biologically active products. *Adv Exp Med Biol*, 416, 51-8.
- Nacoulma-Ouédraogo, O. (1996).** Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au (Burkina-Faso) du Plateau central. *Revue cirad Bois et Forêts des Tropique*, 345(345), 605.
- Négre, R. (1962).** Petite Flore des Régions Arides du Maroc Occidentale. Tome II. *Edition du centre National de la recherche Scientifique. Paris VII*, p. 330.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., & Snader, K.M. (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Product*, 66(7), 1022-1037.
- Nkhili, E.Z. (2009).** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments. *Université Cadi Ayyad, Marrakech. Maroc*, p 327.

- Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi, T. & Tanaka, Y. (2006).** Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 103, 11075-11080.
- Oyediji, O., Olutiola, P.O., Owolabi, K., & Adejo, K.A. (2011).** Multiresistant faecal indicator bacteria in stream and well waters of Ile-Ife city, South western Nigeria : Public health implications. *J. Public Health Epidemio*, 3(8), 371-381.
- Paul, S., & Ferdinand. (2006).** Guide des plantes médicinales. Paris : Delachaux et Niestl.
- Pille, L., Roth, K., Sporer, F., & Michael, W. (2016).** *Carlina acaulis* Exhibits Antioxidant Activity and Counteracts AB Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Institute of Pharmacy and Molecular Biology*, 21(7), 871.
- Popovici, C., Saykova, I. & Tylkowski, B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 4(3), 25-39.
- Ramdani, L. & Zaouani, S. (2022).** Evaluation des activités biologiques des extraits des plantes médicinales locales : *Inula viscosa L* et *Carthamus caeruleus L*. Mémoire de master en Génie de l'environnement, *Université A. M. OULHADJ - Bouira*.
- Rolta, R., Kumar, V., Sourirajan, A., Upadhyay, N., & Dev, K. (2020).** Phytochemicals of three medicinal plants (*Juniperus communis*, *Urtica dioica* and *coleus forskohlii*) of North west Himalayas increases the potency of antibacterial and antifungal antibiotics. *Plant Archives*, 481-489.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., & Saura-Calixto, F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric*, 76, 270-276.
- Schieber, M and Chandel, N.S. (2014).** ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 453-462.
- Semmler, FW. (1889).** Vincent Van Gogh's A Cornfield, with Cypresses, John Leighton, Anthony Reeve, Ashok Roy and Raymond White. *National Gallery Technical Bulletin*, 11, 42-59.
- Singleton, V.L., Ortofer, R., & Lamyela-Raventos, R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. In : *Packer L. (Ed). Methods in Enzymology. Orlando Academic Press*, p 152-178.
- Snyder, L, Kirk, I.J. (1979).** Introduction to modern liquid chromatography. *Ed Wiley. New York*, p 81.

- Sohal, R.S., Mockett, R.J., & Orr, W.C. (2002).** Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol Med*, 33, 575-586.
- Strang, C. (2006).** Larousse médical. Ed. *Larousse. Paris*, p 1219.
- Torres, R. (2006).** Antioxydant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius*. Ed : ELSEVIER. *Phytochemistry*, 67, 984-987.
- Trease, E., & Evans, W.C. (1987).** Antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 35 (8), 3101-3113.
- Tucakov, J. (1971).** Lecenje Biljem. Fitoterapija. Izdavacko preduzecé Rad : Beograd, Jugoslavija. *Wichtl Cambridge University Press, Cambridge_ New York_Melbourne*, 402, 535-537.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*, 39, 44-84.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006).** Isolation and identification of phenolic Compounds. A pratical guide. Phenolic compound biochemistry. *Biochemistry published by springer*, 151-196.
- Wichtl, M. (2002).** Teedrogenund Phytopharmaca. Wissenschaftliche Verlagsgesell schaft mbH, Stuttgart, Germany, 114-115.
- Zeghad, N. (2009).** Etude du contenir polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus Vulgaris, Rosmarinus Officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Thèse de magister, *Université de Constantine*, p 96.
- Zhang, Y.H., Cheng, J.K., Yang, L., & Cheng, D.L. (2002).** Triterpenoids from *Rhaponticum uniflorum*. *J.Chin. Chem. Soc*, 49, 117-124.
- Zhao, H. X., Zhang, H. S., & Yang, S. F. (2014).** Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. *Food Science and Human Wellness*, 3 (3-4), 183-190.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoïds contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-559.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نشاط مضادات الأوكسدة في المختبر للمستخلصات العضوية والمائية لجذور نبات *Rhaponticum acaule* بطريقة DPPH. أظهر الفحص الكيميائي النباتي لهذه المستخلصات غنى هذا النبات بالقلويدات والفلافونويدات والكينونات الحرة والصابونين والتربينويدات والعفص والمركبات المرجعة. وبالمثل لوحظ الغياب التام للأنثراكينونات في جميع المستخلصات. تكشف نتائج الاختبار أن المستخلصات العضوية، الماء-الميثانول، وأسيئات الإيثيل، والبيوتانول تحتوي على كمية مكافئة عالية تبلغ 166.94 ميكروغرام معادل حمض القالبك ملغ؛ 396.87 ميكروغرام معادل حمض القالبك ملغ؛ 241.59 ميكروغرام معادل حمض القالبك ملغ على التوالي للبوليفينول و 194.5 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ؛ 351.51 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ؛ 223.64 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ على التوالي للفلافونويدات. بينما يعبر المستخلص المائي عن قيم منخفضة نسبياً تبلغ 138.80 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ في البوليفينول و 84.82 ميكروغرام معادل كاتيشين ملغ في الفلافونويدات. فيما يتعلق بنشاط مضادات الأوكسدة، فإن المستخلصات العضوية مثل الماء/ الميثانول وأسيئات الإيثيل والبيوتانول تقلل من مفعول الجذور الحرة DPPH مع انخفاض IC_{50} مقارنة بالمستخلص المائي (5.98 ملغ / مل؛ 9.30 ملغ / مل؛ 7.98 ملغ / مل و 11.88 ملغ / مل على التوالي). وتبقى هذه القيم أقل من تلك التي يحصل عليها حمض الأسكوربيك (0.18 ملغ/مل). ومن المحتمل أن التأثير المضاد للأوكسدة لهذه المستخلصات يرتبط بغناها بالمستقلبات الثانوية، وخاصة البوليفينول والفلافونويدات، مما يسمح بتصنيف هذا النبات ضمن النباتات الطبية.

الكلمات المفتاحية: *Rhaponticum acaule*، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للأوكسدة، DPPH، الإجهاد التأكسدي

Abstract

The objective of this study is the evaluation of the in vitro antioxidant activity of organic and aqueous extracts of the roots of *Rhaponticum acaule* by the DPPH method.

The phytochemical screening of these extracts revealed the richness of this plant in alkaloids, flavonoids, free quinones, saponins, terpenoids, tannins and reducing compounds. Likewise a total absence of anthraquinones in all the extracts was observed.

The content results reveal that the organic extracts water-methanol, ethyl acetate and n-Butanol contain a high equivalent amount of 166.94 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$, 396.87 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$ and 241.59 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$, respectively for polyphenols and 194.5 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$, 351.51 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$, 223.64 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$, respectively for flavonoids. While the aqueous extract expresses relatively low values of 138.80 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$ in polyphenols and 84.82 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$ in flavonoids.

Concerning the antioxidant activity, the organic extracts water-methanol, ethyl acetate and n-Butanol reduced DPPH with lower IC_{50} than the aqueous extract (5.98 mg/ml ; 9.30 mg/ml ; 7.98 mg/ml and 11.88 mg/ml respectively). These values remain lower than that obtained by ascorbic acid (0.18 mg/ml).

The antioxidant effect of these extracts is probably linked to their richness in secondary metabolites, in particular polyphenols and flavonoids, which allows this plant to be classified among medicinal plants.

Key words : *Rhaponticum acaule*, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, DPPH, oxidative stress.

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydant *in vitro* des extraits organiques et aqueux des racines de *Rhaponticum acaule* par la méthode de DPPH.

Le screening phytochimique de ces extraits a révélé la richesse de cette plante en alcaloïdes, flavonoïdes, quinones libres, saponines, terpenoïdes, tanins et composés réducteurs. De même une absence totale des anthraquinones dans tous les extraits a été observée.

Les résultats de dosage révèlent que les extraits organiques eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-Butanol contient une quantité élevée équivalente de 166,94 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$, 396,87 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$ et 241,59 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$, respectivement pour les polyphénols et 194,5 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$, 351,51 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$, 223,64 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$, respectivement pour les flavonoïdes. Tandis que l'extrait aqueux exprime des valeurs relativement faible 138,80 $\mu\text{g Eq AG/mg Ext}$ en polyphénols et 84,82 $\mu\text{g Eq C/mg Ext}$ en flavonoïdes.

Concernant l'activité antioxydante, les extraits organiques eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-Butanol ont réduit le DPPH avec des IC_{50} inférieurs à celle de l'extrait aqueux (5,98 mg/ml ; 9,30 mg/ml ; 7,98 mg/ml et 11,88 mg/ml respectivement). Ces valeurs restent inférieures à celle obtenu par l'acide ascorbique (0,18 mg/ml).

L'effet antioxydant de ces extraits est probablement lié à leur richesse en métabolites secondaires en particulier les polyphénols et les flavonoïdes ce qui confère à cette plante d'être classée parmi les plantes médicinales.

Mots clés : *Rhaponticum acaule*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydant, DPPH, stress oxydant.

