

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mohammed Seddik ben Yahia - Jijel

Faculté des Sciences Exactes et Informatique

Département de Chimie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie

Option : Chimie pharmaceutique



THEME

**Etude phytochimique et activités biologiques
d'une plante médicinale**

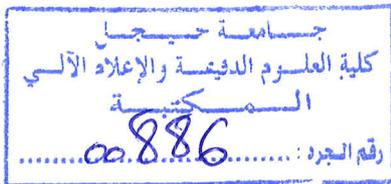
Présenté par :

- ❖ BOUAMRA Larbi
- ❖ BOUROUGAA Lotfi

Devant les membres du jury :

TABTL. N	MAA	Université de Jijel	Présidente
BOUTABET. Kh	MAA	Université de Jijel	Encadreur
BOUDJERDA. Ab	MAB	Université de Jijel	Examineur

Année Universitaire : 2018-2019



chi. Phas 11/19

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministre de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mohammed Seddik ben Yahia - Jijel

Faculté des Sciences Exactes et Informatique

Département de Chimie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie

Option : Chimie pharmaceutique



THEME

**Etude phytochimique et activités biologiques
d'une plante médicinale**

Présenté par :

- ❖ BOUAMRA Larbi
- ❖ BOUROUGAA Lotfi

Devant les membres du jury :

TABTL. N	MAA	Université de Jijel	Présidente
BOUTABET. Kh	MAA	Université de Jijel	Encadreur
BOUDJERDA. Ab	MAB	Université de Jijel	Examineur

Année Universitaire : 2018-2019



Remerciements

Au terme de notre travail, en premier lieu nous tenant à remercier dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage, la patience de réaliser ce modeste travail.

Nos profonds remerciements s'accordent à notre promotrice Melle BOUTABET Kheira, qui à accepter de nous encadrer, pour sa collaboration et son aide nécessaire à la réalisation de notre travail.

Nous adressons nos sincères et remerciements aux membres de jury Mme. TABTI Naouel et Mr. BOUDJERDA Abdelhamid pour l'honneur qu'ils en font en acceptant de jury ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à tous nos enseignants (Département de chimie Université de jijel), qui nous ont transmis leur savoir, ce qui nous a permis d'acquérir les connaissances indispensables pour réaliser ce mémoire.

Nos remerciements vivement à Mr. B.Zidane pour sa disponibilité. Aussi Mr. B. Azzedine pour sa gentillesse et sa contribution générale à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à

Mes parents

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Ma sœur Nassoura.

Mes frères et sœurs.

Mon ami S. Abderrahim.

Et à tous ceux qui me sont chers.

Lotfi

Dédicace

Grâce à dieu tout puissant, qui nous a donné le courage, la volonté, la force pour réaliser ce mémoire, que nul ne peut se faire sans son désir.

Je dédie ce travail à mes très Chers Parents qui aurait été fière de ma réussite (رحمة الله عليهما)

A mes Frères et Sœurs

A toute ma Famille

Ainsi qu'à toutes mes amies

Et à tous ceux qui me sont chers

Larbi

Liste d'abréviation

ABTS : Acide 2,2'-azinobis 3-ethylbenzo-triazoline-6-sulphonate.

ABTS^{•+} : Acide 2,2'-azinobis-3 éthylenzothiazoline-6- sulphonique.

ADN : Acide désoxiribonucléique.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

ARN : Acide ribonucléique.

C : Carbone.

CE : Electrode de travail.

Cr : Chrome.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

EAG : Equivalent acide gallique.

E_{corr} : Potentiel de corrosion.

ECS : Electrode au calomel saturé.

EI : Efficacité inhibitrice.

EQ : Equivalent de la quercétine.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

ET : Electrode de travail.

Fe : Fer.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

FRAP : Ferric reducing antioxidant power.

HCl : Acide chlorhydrique.

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique.

H₃PMo₁₂O₄ : Acide phosphomolybdique.

I_{corr} : La densité du courant de corrosion.

IC₅₀ : Concentration d'inhibition 50%.

Inox : Inoxydable.

K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium.

Mo : Molybdène.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NACE : National association of corrosion engineers.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

NCCLS : National committee for clinical laboratory.

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium.

Ni : Nickel.

NO• : Monoxyde d'azote.

OH• : Radical hydroxyle.

O₂⁻ : Anion superoxyde.

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

ppm : Partie par million.

UV : Ultraviolet.

ROS : Reactive Oxygen Species.

R_p : Résistance de polarisation.

RRL : *Ranunculus repens* L.

Si : Silicium.

SOD : Superoxyde dismutase.

TCA : Acide trichloracétique.

Liste des figures

Figure 1 :	La distribution de <i>RRL</i> en canada.....	04
Figure 2 :	La plante <i>Ramunculus repens</i> L dans son milieu systématique (Texenna, Jijel, Est Algérie).....	05
Figure 3 :	Structure de base des flavonoïdes.....	09
Figure 4 :	Formation des différents types de flavonoïdes à partir des chalcones.	12
Figure 5 :	Déséquilibre de la balance antioxydants et prooxydants.....	13
Figure 6 :	Structure d'une cellule bactérienne.....	15
Figure 7 :	Protocole d'extraction des flavonoïdes de <i>RRL</i>	20
Figure 8 :	Réduction du radical libre DPPH'.....	24
Figure 9 :	Appareillage électrochimique utilisé (potentiostat).....	30
Figure 10 :	Les paramètres électrochimiques à partir des droites de Taffel.....	31
Figure 11 :	Rendement des polyphénols pour chaque extrait.....	32
Figure 12 :	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	34
Figure 13 :	Teneur en polyphénol des extraits.....	35
Figure 14 :	Courbe d'étalonnage de de la quercitrine.....	36
Figure 15 :	Teneur en Flavonoïdes des extraits.....	36
Figure 16 :	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	37
Figure 17 :	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations de l'extrait chloroformiques.....	37
Figure 18 :	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations acétate d'éthyle.....	38
Figure 19 :	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations butanolique.....	38
Figure 20 :	Effet des extraits de <i>RRL</i> sur la réduction du fer (FRAP).....	39
Figure 21 :	Inhibition de radical libre ABTS+ en fonction des concentrations.....	40
Figure 22 :	Effet des trois extraits sur la souche staphylococcus aureus à concentration 4 mg/ml.....	43
Figure 23 :	Effets d'antibiotique sur trois souches bactériennes.....	44

Figure 24 : L'efficacité inhibitrice à différentes concentration des inhibiteurs (extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique).....	45
Figure 25 : Les courbes de la polarisation potentiodynamique de l'acier 316 L de la phase butanolique à différentes concentration	47
Figure 26 : Les courbes de la polarisation potentiodynamique de l'acier 316 L de la phase acétate d'éthyle à différentes concentration.....	47

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Principales classes des composés phénoliques.....	07
Tableau 2 :	Différentes classes de flavonoïdes.....	10
Tableau 3 :	Composition atomique de l'acier inoxydable 316L.....	28
Tableau 4 :	Les extraits testés.....	30
Tableau 5 :	Résultats obtenus pour chaque extrait.....	32
Tableau 6 :	Résultats des tests phytochimiques.....	33
Tableau 7 :	Absorbances adapté avec la gamme de concentration d'acide gallique.....	34
Tableau 8 :	Absorbances adapté avec la gamme de concentration de la quercétine.....	35
Tableau 9 :	Les déférentes phases avec les valeurs d'IC ₅₀ (DPPH').....	38
Tableau 10 :	Les déférentes phases avec les valeurs d'IC ₅₀ (FRAP).....	40
Tableau 11 :	Les déférentes phases avec les valeurs d'IC ₅₀ (ABTS ⁺).....	41
Tableau 12 :	Diamètre de zone d'inhibition des trois phases vis-à-vis des souches bactériennes testées en différentes concentrations.....	42
Tableau 13 :	Effet d'antibiotique (ciproflaxine) sur les trois souches bactériennes.....	43
Tableau 14 :	L'efficacité inhibitrice avec l'absence et la présence des inhibiteurs (les deux phases).....	45
Tableau 15 :	Les paramètres de la polarisation potentiodynamique avec l'absence et la présence des inhibiteurs.....	46

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Etude botanique

I.1. Historique..... 03

I.2 La famille Ranunculacées..... 03

I.3. Le genre *Ranunculus*..... 03

I.4. Distribution géographique 03

I.5. Biologie de *Ranunculus Repens L*..... 04

I.6. Systématique de la plante (*RRL*) 05

I.7. Utilisation traditionnelle de la *Ranunculus repens L*..... 06

Chapitre II : Les composés phénoliques

II.1. Généralité sur les polyphénols 07

II.2. Classification des polyphénols 07

II.3. Les flavonoïdes 08

II.3.1. Historique 08

II.3.2. Classification et structure chimique des flavonoïdes 09

II.3.2.1. Les flavonols 09

II.3.2.2. Les flavones 09

II.3.2.3. Les flavanones 10

II.3.2.4. Les isoflavones 10

II.3.2.5. Les flavanols 10

II.3.2.6. Les anthocyanes 10

II.3.3. Variation de la structure de l'élément centrale en C₃ des flavonoïdes..... 11

II.3.4. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes..... 12

Chapitre III : Les activités biologique

III.1. Activité antioxydante..... 13

III.1.1 Définition du stress..... 13

III.1.2 Définition des Radicaux libres.....	13
III.1.3. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)	13
III.1.4. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)	14
III.1.5. Mécanismes d'action des antioxydants.....	14
III.1.6. Conséquence du stress oxydatif.....	14
III.2. Activités antibactérienne.....	14
III.2.1. Généralité.....	14
III.2.2. Définition des bactéries	15
III.2.3. Les antibiotiques.....	15
III.2.4. Classification des antibiotiques.....	15
III.2.5. Mode d'action des antibiotiques.....	16
III.2.6. L'antibiogramme.....	16
III.3. Autre activité (anticorrosive).	16
III.3.1. Définition de la corrosion.....	16
III.3.2. Les types de corrosion.....	16
III.3.3. Inhibition de la corrosion.....	17
III.3.3.1. Définition.....	17
III.3.4. Propriétés et classes des inhibiteurs	17

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV. Analyse et quantitative.....	19
IV.1. Récolte de la plante	19
IV.2. Extraction des flavonoïdes de <i>Ranunculus repens</i> L.....	19
IV.3. Rendement des extraits <i>Ranunculus repens</i> L.....	21
IV.4. Tests phytochimiques.....	21
IV.5. Dosage des polyphénols totaux.....	23
IV.6. Dosage des flavonoïdes.....	24
IV.7. Activité biologiques.....	24
IV.7.1. Activité antioxydante.....	24
IV.7.1.1. Le test au DPPH.....	24
IV.7.1.2. Pouvoir chélateur du fer (FRAP)	25
IV.7.1.3. Test ABTS.....	26
IV.7.2. Activité antibactérienne.....	27
IV.7.2.1. Souches bactériennes utilisées.....	27

IV.7.2.2. Méthode utilisée.....	27
IV.7.3. Autre activité (anticorrosive)	28
IV.7.3.1. Etude d'activité inhibitrice	28

Chapitre V : Résultats et Interprétation

V.1. Analyse quantitative.....	32
V.1.1. Rendement des extraits (<i>RRL</i>)	32
V.1.2. Tests phytochimiques.....	33
V.1.3 Dosage des polyphénols totaux.....	33
V.1.4. Dosage des flavonoïdes.....	35
V.2. Activités biologique.....	37
V.2.1. Activité antioxydante	37
V.2.1.1. Piégeage du radical DPPH'	37
V.2.1.2. Pouvoir chélateur du fer (FRAP)	39
V.2.1.3. Inhibition de radical ABTS ⁺	40
V.2.2. Activités antibactérienne.....	42
IV.2.3. Autre activité.....	44
V.2.3.1. Activité anticorrosive.....	44

Chapitre VI : Discussion

VI. Discussion.....	49
Conclusion	51

Référence bibliographique

Résumé

introduction

De tous les temps, les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes soit sauvages soit cultivées pour se nourrir, se défendre, se vêtir ou se soigner. Ces utilisations se sont diversifiées au fil des temps pour s'adapter aux besoins. Les plantes médicinales ont connu les mêmes modifications. Elles sont employées parfois de façon sélective grâce à la tradition. Au fil des siècles, une première distinction a pu être faite entre plantes comestibles et toxiques. Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Jusqu'au début du 20^{ème} siècle, presque tous les médicaments étaient à base de plantes [1].

De nos jours, et surtout dans les pays du tiers monde, la phytothérapie occupe encore une place importante. La flore de ces pays reste assurément riche et prometteuse, tant dans la perspective de découvrir de nouvelles espèces botaniques que de trouver de nouvelles molécules ayant une activité thérapeutique, pour la mise au point de nouveaux médicaments. Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement riches, elles contiennent de structures chimiques complexes. Le métabolisme des plantes contient de milliers de différents constituants dont l'effet thérapeutique n'est évidemment pas lié à tous les composés, de même pour ce qui est d'effet nocif ou toxique [2].

L'Algérie est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne. La flore algérienne est potentiellement riche, beaucoup d'espèces endémiques peuvent y être. Nous partageons avec les méditerranéens et les pays du Sahel un large éventail de composés et d'éléments phytochimiques d'un intérêt grandissant d'où la nécessité et l'importance de ce travail de recherche. Ce brassage d'espèces constitue pour notre pays une véritable richesse qui doit être préservée et gérée rationnellement et durablement dans le but de maintenir les équilibres écologiques déjà fragiles et de conserver notre diversité biologique[1].

Notre étude portée sur l'extraction et le dosage des polyphénols et des flavonoïdes, puis l'étude des activités antimicrobienne, antioxydante, anticorrosive d'une plante appartenant à la famille Ranunculaceae, présentées par *Ranunculus repens* L.

Ce travail est divisé en deux parties une partie bibliographique et d'autre expérimentale, la partie bibliographique comprend quatre parties :

- Étude botanique *Ranunculus repens* L.
- Les composés phénoliques.
- Rappels sur les activités étudiées.

La partie expérimentale est consacrée à l'étude de la composition chimique et les activités (antioxydante, antimicrobienne, anticorrosive), des métabolites secondaire.

Cette partie est divisée en deux la présentation du matériel et des méthodes utilisées, et la discussion des résultats, en fin une conclusion qui rappelle les résultats obtenus.

Chapitre 1
Etude botanique

I.1. Historique

Il semble y avoir peu de doute que *Ranunculus repens* L au Canada a été naturalisé d'Europe et s'est rapidement répandu à la suite des pionniers. Rousseau (1968) appelle *RRL* une plante adventice, un colonisateur occasionnel ou occasionnel d'Amérique du Nord. Il a également fait remarquer que la première mention de *RRL* au Québec remonte à 1821 et qu'elle était décrite comme commune dans les environs de Montréal [3]. Godwin (1975) déclare que *RRL* appartient à la catégorie des plantes circumpolaires de Hutten qui se propage de manière très répandue par la culture. Gilkey (1957) a même suggéré que *RRL* aurait pu être introduit comme plante de jardin ou ornementale en raison de sa valeur esthétique. En revanche, Montgomery (1964) a suggéré que *RRL* pourrait être indigène dans certaines régions du Canada, mais il n'a donné aucun lieu ni aucune preuve à l'appui de cette affirmation [4].

I.2. La famille Ranunculacées

Les *Ranunculacées* ont une distribution mondiale, bien que de nombreux genres et espèces soient centrés dans les zones tempérées de l'Asie de l'Est. La famille des *Ranunculaceae* est composée d'environ 1500 à 2000 espèces regroupées en une soixantaine de genres [5].

I.3. Le genre *Ranunculus*

Le genre *Ranunculus* (renoncules) représente le plus grand genre au sein des *Ranunculaceae*, près de 600 espèces appartiennent au genre *Ranunculus*. Il est réparti dans l'hémisphère nord. On le trouve aussi dans les régions tempérées du sud dans les tropiques où elles sont habituellement confinées à des altitudes plus élevées, et réparties sur tous les continents. Les membres de ce genre présentent des sépales simples, lobés, fendus ou divisés 3 et 5 non voyants, les pétales sont habituellement jaunes, principalement abovés, étamines et carpelles, de nombreux agrégats d'akènes dans des têtes globuleuses à oblongues, des akènes arrondis ou un peu aplatis [6].

I.4. Distribution géographique

Ranunculus repens L a été introduit aux États-Unis et au Canada où il est distribué dans une large bande s'étendant principalement entre 38° et 50° N. Au Canada, *RRL* est présent dans toutes les provinces, à l'exception des territoires du Yukon et du nord-ouest [7]. L'espèce est plus commune dans les provinces maritimes, au Québec, en Ontario et sur les

côtes de la Colombie britannique (figure 1) [3]. *RRL* est généralement présent en Europe, y compris à l'extrême nord de la Norvège, et s'étend jusqu'aux îles Féroé, en Islande et aux côtes et ouest du Groenland (coles 1977) [3]. Il n'a pas été enregistré en Europe du nord, en Russie, en Grèce ou en Albanie, mais est présent en Roumanie, en Bulgarie et en Yougoslavie. Il a été enregistré dans les montagnes marocaines et algériennes et dans le delta du Nil. Coles (1977) indique qu'il est également présent en Sibérie et au Japon, mais Harper (1957) a suggéré de vérifier ces identifications. Il a été introduit dans une grande partie de l'Amérique centrale et du sud et Nouvelle Zélande et Australie [7].

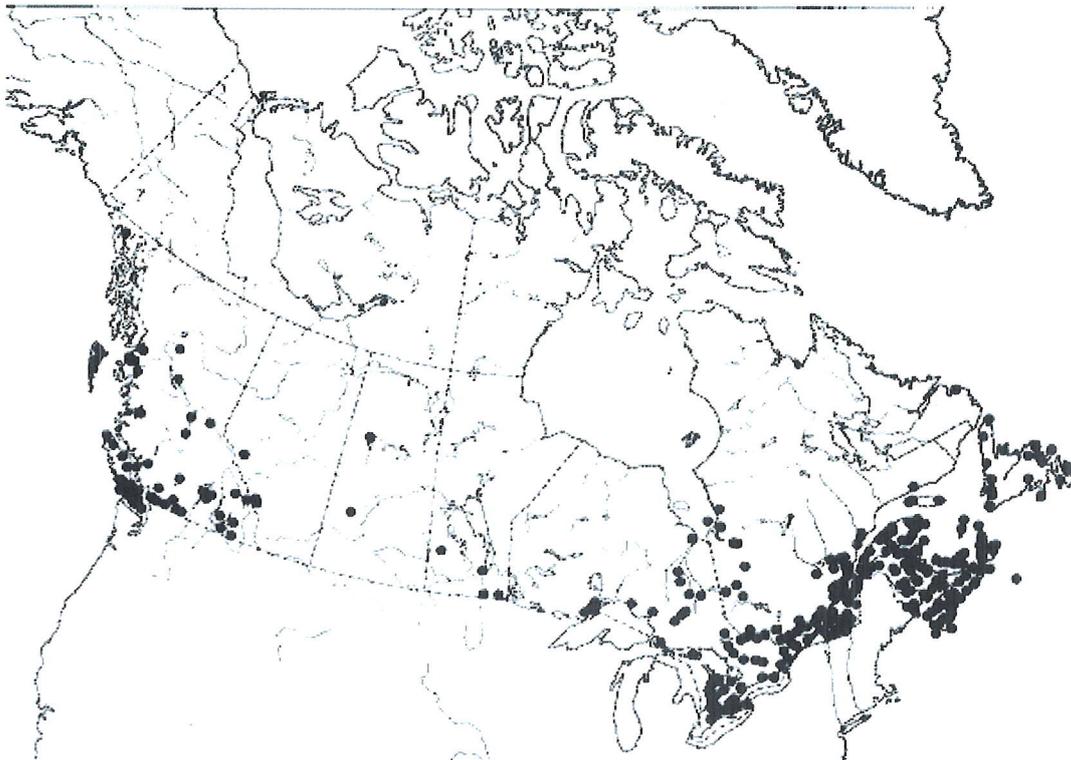


Figure 1 : La distribution de *RRL* en Canada [3].

I.5. Biologie de *Ranunculus Repens* L

La plante *RRL* est une espèce vivace herbacée, généralement duveteuse à longs stolons rampants, les feuilles triangulaires ont trois dentés, celui du milieu étant pétiolé [8]. Les fleurs ont cinq pétales jaunes, cinq sépales dressés et beaucoup d'étamines. Le réceptacle porte de nombreux carpelles qui à maturité, donnent des akènes à bec grêle [9].

La *Ranunculus repens* L est une herbe rampante avec des racines fibreuse, elle est commune dans les pâturages, champs et dans les zones humides aux climats tempérés. Elle produit de nouvelles plantes ou clones qui se développe à travers les stolons qui poussent dans les aisselles des feuilles (figure 2) [10]. Au printemps des stolons latéraux

sont produits dans les feuilles et la production de stolons continue jusqu'à la fin de l'été. Une à deux stolons par plante sont communes mais il y a des plantes qui peuvent avoir jusqu'à cinq ainsi que des branches secondaires [8]. En automne, quand les rameaux sont établis le stolon devient pâle et meurt laissant des rosettes physiologiquement indépendantes se développer et deviennent des fleurs. La saison prochaine pendant que la plante originale pâlit et meurt, la nouvelle plante peut persister durant l'hiver comme une petite rosette. Le court caudex stocke les matières nutritives qui permettent l'accélération de la croissance en printemps (entre Avril et Juin) [11]. Une enquête a révélé que chaque fleur produisait une vingtaine de graines. En général, la saison de fleurs est entre Avril à Juillet Cette floraison est suivie de fruits en deux semaines. La *Ranunculus repens* L est résistante à la gelée et survit à la sécheresse modérée [10].

I.6. Systématique de la plante (*RRL*)

- Famille : Ranunculaceae.
- Ordre : Ranale ou polycarpique.
- Genre : Ranunculus.
- Espèce : Ranunculus repens L.
- Nom Arabe: Mergheris (El-houdane).
- Nom commun : Ranunculus rampante [8 ,12].



Figure 2 : La plante *Ranunculus repens* L dans son milieu systématique (Texenna, Jijel, Est Algérie) [8].

I.7. Utilisation traditionnelle de la *Ranunculus repens* L

Ranunculus repens L est une plante appartient à la famille *Ranunculaceae*, communément appelée EL-Faiha (Berbère). Dans la médecine traditionnelle, les feuilles séchées sont utilisée sous forme d'infusion pour traiter le diabète sucré et la jaunisse en petite Kabylie (Est d'Algérie) [8]. Selon les résultats d'une étude non publiées, cette plante parait riche en composés polyphénoliques et contient une teneur importante en flavonoïdes [10]. La consultation de la littérature scientifique ne montre aucune recherche phytopharmacologique sur cette plante [11].



Chapitre II

Les composés phénoliques

II.1. Généralité sur les polyphénols

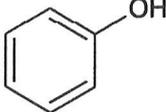
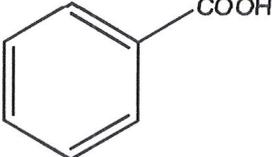
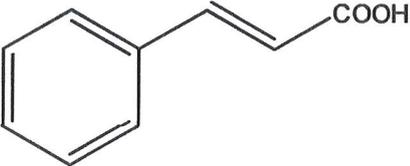
Les composés phénoliques, ou polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales [13].

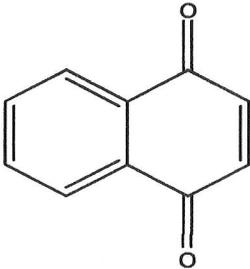
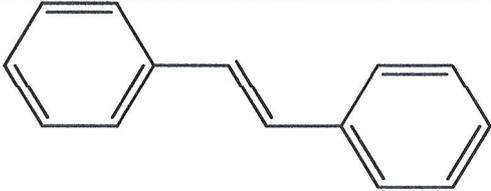
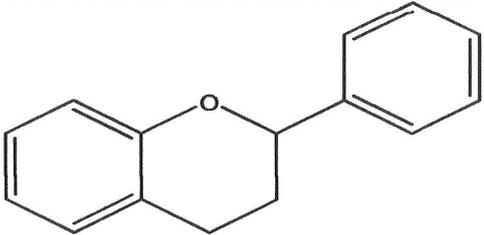
Plus de 8000 structures de composés phénoliques ont été rapportés dans la littérature et elles sont largement dispersées dans les plantes, Ils peuvent être classés en fonction du nombre et de l'agencement de leurs atomes de carbone et sont communément substitués par des sucres et des acides organiques [2].

II.2. Classification des polyphénols

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories: les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables. Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base [14].

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques [13].

Squelette carboné	Classes	Structure de base
C6	Phénols simples	
C6-c1	Acides hydroxybenzoïques	
C6-c3	Acides hydroxycinnamique coumarine	

C6-c4	naphtoquinones	
C6- C2- C6	Stilbénes	
C6- C3- C6	Flavonoïdes	
(C6- C3)2	Lignanes	
(C6- C3)n	Lignines	
(C6- C3- C6)n	Tanins condensés	

II.3. Les flavonoïdes

II.3.1. Historique

Le nom flavonoïde est dérivé du mot « Flavus » en latin, qui signifie jaune. L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi en 1938 [15].

Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïdique. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine

P n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines ; par contre, les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants [8].

II.3.2. Classification et structure chimique des flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents et distribués de manière générale, dans toutes les plantes vasculaires. Leur squelette chimique commun possède 15 atomes de carbones, constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un cycle pyranique central C (figure 3) [16]. Ils diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C. Les flavonoïdes sont répartis en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, et les anthocyanes (tableau 2). Ils sont localisés dans divers organe : fleurs, fruits, feuilles, tiges et racine [17].

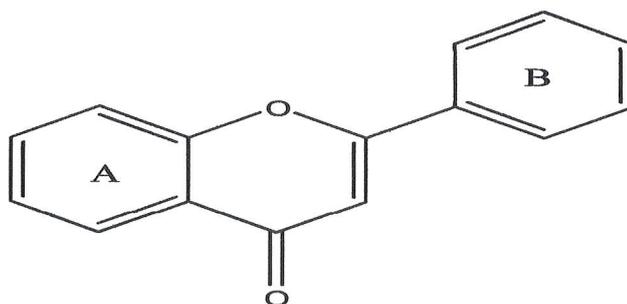


Figure 3 : Structure de base des flavonoïdes [17].

II.3.2.1. Les flavonols

Les flavonols sont les constituants flavoniques les plus abondants des aliments [16]. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine [16]. Ces dernières possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres [17].

II.3.2.2. Les flavones

Les flavones sont abondantes chez les plantes supérieures sous les deux formes aglycones ou glycolyses [18]. Certaines sont responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses et les œillets. Ils ont des activités physiologiques remarquables, notamment des propriétés antimicrobiennes et antivirales [17].

II.3.2.3. Les flavanones

Les flavanones ont une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturation au niveau de l'hétérocycle. Les flavanones sont fréquemment rencontrés chez les Myrtacées [16]. Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents en grandes quantités dans les agrumes [18, 17].

II.3.2.4. Les isoflavones

Les isoflavonoïde sont moins répandus taxonomiquement. Ces composés très actifs se trouvent essentiellement chez les légumineuses. La structure des isoflavones ne diffère des autres flavonoïdes que par la présence du cycle B en position 3 [16,17].

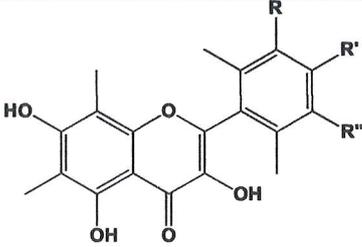
II.3.2.5. Les flavanols

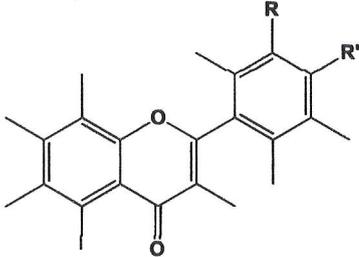
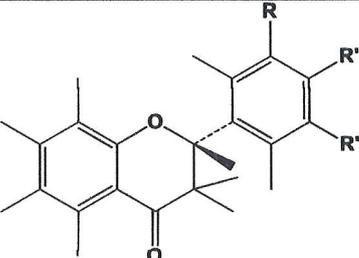
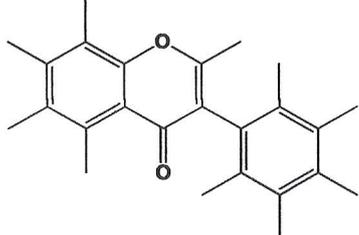
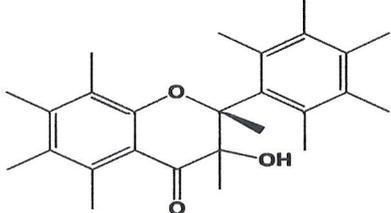
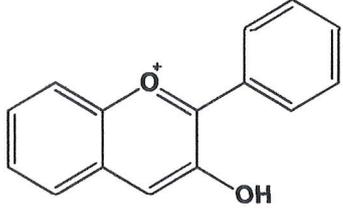
Les flavanols existent sous forme de monomères : l'unité la plus simple est la catéchine, ou polymérique appelés proanthocyanidines [16]. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme [18, 17].

II.3.2.6. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels qui donnent les couleurs à de nombreuses plantes. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin) [16, 14, 17].

Tableau 2 : Différentes classes de flavonoïdes [17].

Flavonoïdes	Squelette de base
Flavanols	

Flavones	
Flavanones	
Isoflavones	
Flavanols	
Anthocyanes	

II.3.3. Variation de la structure de l'élément centrale en C₃ des flavonoïdes

La figure 4 donne le schéma des réactions qui permettant d'interpréter la formation des principaux flavonoïdes à partir des chalcones [19]. La cyclisation de chalcones s'effectue aisément, par isomérisation sous forme de flavanones qui est stabilisée par formation d'une liaison hydrogène entre CO et un groupement OH en position 5. Les

flavonoïdes et plus particulièrement leur produit d'hydroxylation, les flavonols joueraient le rôle d'intermédiaire dans la formation des différents types de flavonoïdes [20].

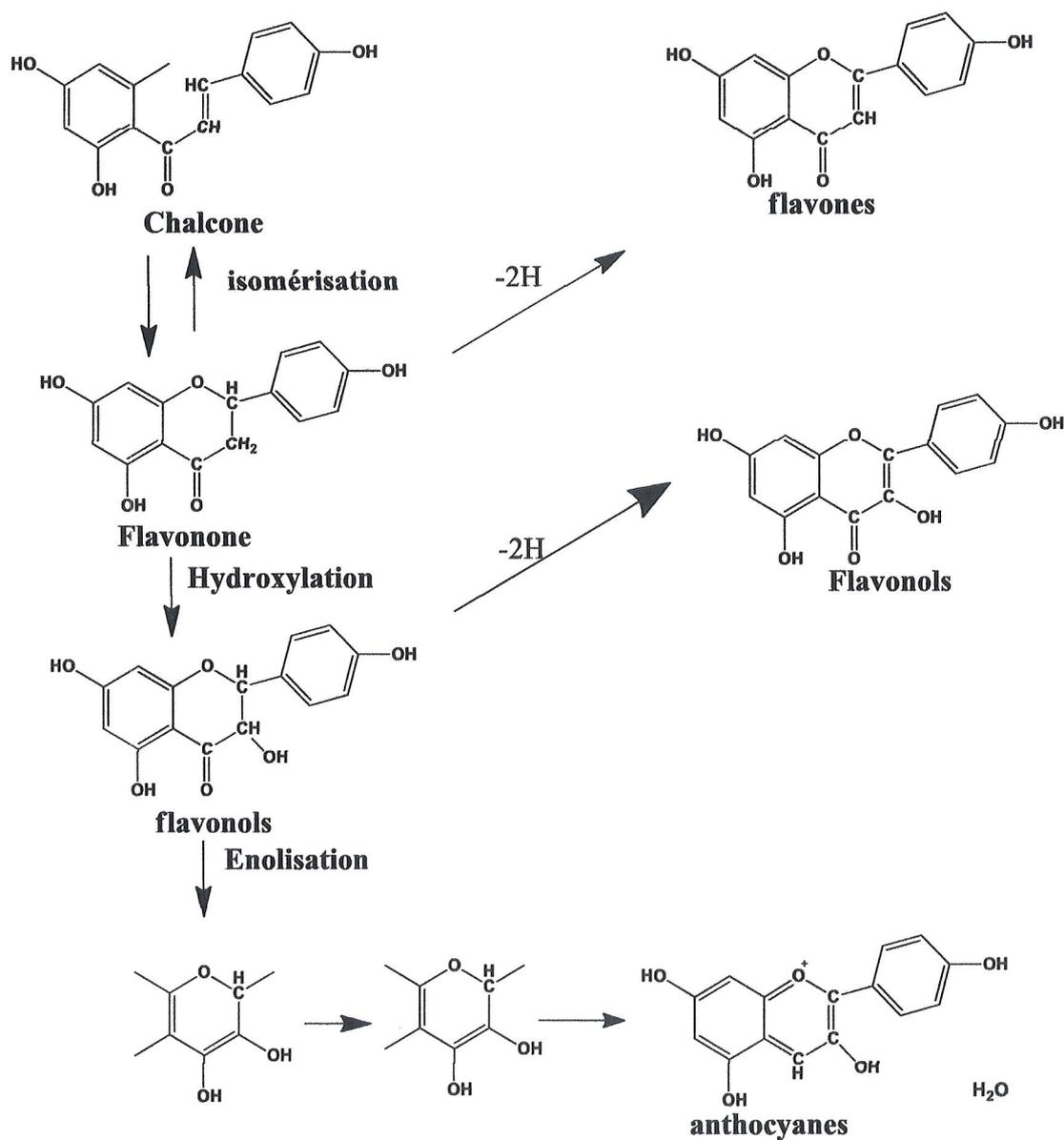


Figure 4 : Formation des différents types de flavonoïdes à partir des chalcones [20].

II.3.4. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées par le domaine médical, où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-radicalaires, anti-allergiques, anti-tumorales, mais aussi anti-inflammatoires et anti-cancéreuses [1].

Chapitre III

Rappel sur Les activités étudiées

III.1. Activité antioxydante

III.1.1 Définition du stress

Des molécules prooxydants appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres (figure 5). Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant [21].

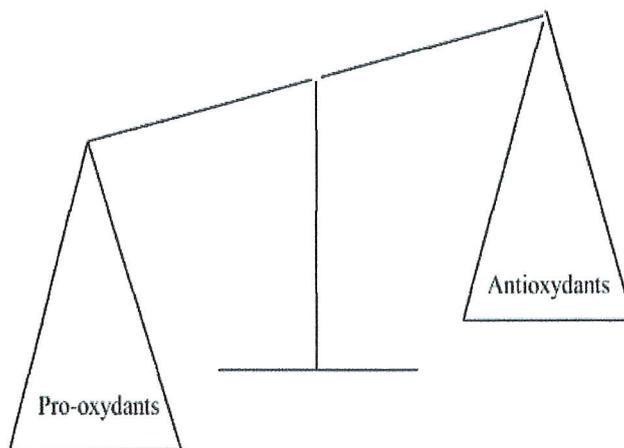


Figure 5 : Déséquilibre de la balance antioxydants et prooxydants [21].

III.1.2. Définition des Radicaux libres

Un radical (souvent appelé radical libre) est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. Il se note par un point. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules, la plupart du temps, une grande instabilité, ce qui signifie qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques [22].

III.1.3. Définition des antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui empêchent l'oxydation de certaines substances chimiques. Ils jouent un rôle de repart protecteur contre les radicaux libres qui peuvent être source de nombreux problèmes de santé s'ils prolifèrent dans l'organisme [22].

III.1.4. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydants (superoxyde dismutase, catalase...) élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge [23].

- La superoxyde dismutase (SOD)

Accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) [24].

- La catalase

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire [24].

III.1.4. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [25].

III.1.5. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition [26].

III.1.6. Conséquence du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN, les lipides (peroxydation), les protéines...etc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...) et la dégradation des cellules et des tissus [27].

III.2. Activité antibactérienne

III.2.1. Généralité

Un microbe, ou micro-organisme, fait partie d'un groupe large et extrêmement divers d'organismes. Ces organismes sont regroupés sur la base d'une seule propriété: ils sont si petits qu'ils ne peuvent être visualisés sans l'aide d'un microscope. Les microbes sont largement utilisés dans les laboratoires de recherche pour étudier les processus cellulaires [28].

III.2.2. Définition des bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea) [29].

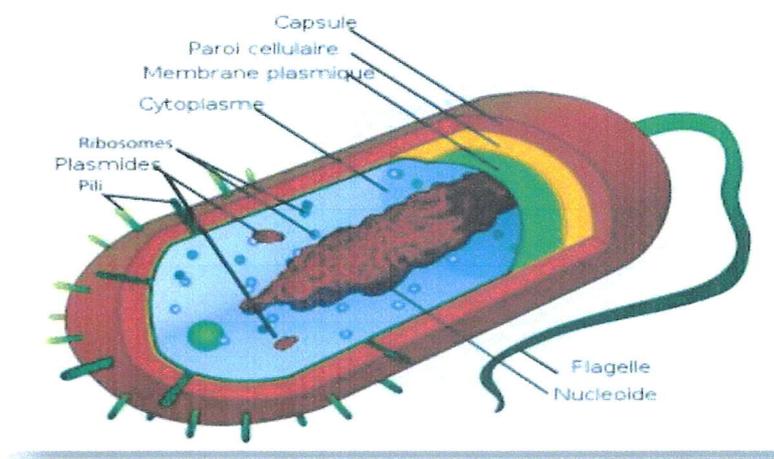


Figure 6 : Structure d'une cellule bactérienne [30].

III.2.3. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances organiques produits par des microorganismes ou issue de la synthèse et exercent à faible dose une action envers d'autres micro-organismes [31].

III.2.4. Classification des antibiotiques

Il existe plusieurs modalités de classification des antibiotiques d'utilité variable :

- La structure chimique de base : bêtalactamines, aminoglycosides, quinolones, cyclines, ...
- La cible au niveau des bactéries : ribosomes, paroi, ...
- Le mécanisme d'action : inhibition de la synthèse protéique, inhibition de la synthèse du peptidoglycane, ...
- Le spectre d'activité : groupes bactériens ou espèces sensibles [32].

III.2.5. Mode d'action des antibiotiques

Les principales cibles des antibiotiques sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens. D'autres cibles sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métabolites, à savoir l'inhibition de la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN) et l'interférence avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN. Des interactions spécifiques avec les cibles bactériennes des antibiotiques sont également régies par la complexité des motifs structuraux et la grande variabilité des groupements fonctionnels. Cette spécificité se trouve engagée dans les processus de la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques [33].

III.2.6. L'antibiogramme

Le but de réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne et à l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles [32].

III.3. Autre activité (anticorrosive)

III.3.1. Définition de la corrosion

Selon NACE, la référence mondiale en matière de corrosion, NACE (National Association of Corrosion Engineers), définit la corrosion comme la détérioration d'un matériau, généralement métallique, qui résulte d'une réaction avec son environnement. C'est à dire soit un environnement gazeux (oxygène de l'air par exemple), soit un environnement liquide (eau de mer par exemple), soit un environnement de contraintes dans de tels milieux,

soit même en milieu biologique (bactéries se déposant dans les tuyères industrielles - chimique ou pétrochimique - ou d'extraction pétrolière) [34].

III.3.2. Les type de corrosion

La corrosion peut se développer suivant différents processus qui caractérisent chacun un type de corrosion [35].

- **Corrosion chimique**

Il s'agit d'une réaction purement chimique entre la surface d'un matériau et un gaz ou un liquide non électrolyte. Par exemple, l'oxydation d'un acier ordinaire à haute température par l'oxygène de l'air est une corrosion chimique [36].

- **Corrosion biochimique**

C'est l'attaque bactérienne des matériaux métalliques, en particulier dans les canalisations enterrées ou posées sous les réservoirs de stockage, etc. En effet, le métabolisme du développement de certaines bactéries provoque la formation d'acide sulfurique qui attaque le métal [37].

- **Corrosion électrochimique**

C'est une réaction électrochimique entre la surface d'un matériau et un électrolyte. Cette réaction est accompagnée de la formation des piles qui sont le siège de circulation de courant électrique. Par exemple des alliages de fer dans les milieux acide (chlorhydrique ou sulfurique) [38].

III.3.3. Inhibition de la corrosion

Pour lutter contre la corrosion, il ne suffit pas de choisir un matériau qui résiste bien à un certain milieu. Alors il faut également, mettre en évidence des méthodes de protection présentant de bonne inhibition avec faible cout et qui ne sont pas toxique. Parmi ces méthodes, les inhibiteurs de corrosion sont les plus préconisés [39].

III.3.3.1. Définition

La définition d'un inhibiteur de corrosion n'est pas unique. Celle retenue par la "National Association of Corrosion Engineers (NACE)" est la suivante : "un inhibiteur est une substance qui retarde la corrosion lorsqu'elle est ajoutée à un environnement en faible concentration " [34].

III.3.4. Propriétés et classes des inhibiteurs

D'une manière générale un inhibiteur doit :

- Abaisser la vitesse de corrosion d'un métal, sans en affecter les caractéristiques physicochimiques, en particulier la résistance mécanique (par exemple, risque de fragilisation par l'hydrogène en milieu acide) :
- Être stable en présence des autres constituants du milieu, en particulier vis-à-vis des oxydants.
- Être stable aux températures d'utilisation.
- Être efficace à faible concentration.
- Être compatible avec les normes de non-toxicité [40].

Chapitre IV

Matériels et méthodes

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de chimie à l'université Mohamed Seddik Ben Yahia de Jijel. Il est consacré à l'étude phytochimique de *Ranunculus repens* L.

IV. Analyse et quantitative

IV.1. Récolte de la plante

Les parties aériennes de *Ranunculus repens* L, ont été récoltées au mois de mars 2019 de la région de Texenna (wilaya de Jijel, l'Est Algérie). Les parties aériennes ont été nettoyées et séchées à température ambiante dans un endroit aéré à l'ombre pour mieux conserver les molécules sensibles à la chaleur et à la lumière. Elles ont été ensuite pesées, broyées grossièrement et récupérées dans des sacs propres.

IV.2. Extraction des flavonoïdes de *Ranunculus repens* L

L'extraction des substances bioactives de *Ranunculus repens* L, est Réalisée selon le protocole décrit par lebreto [8].

La poudre de matériel végétal (300g) est mise à macérer à température ambiante dans un mélange éthanol/eau (70-30 v/v) pendant 24 heures, ce procédé est répétée 3 fois pour épuiser le substrat de tous ses composants phénoliques. Le macérât est ensuite filtré sur coton puis soumis à une évaporation à 38 °c en utilisant un évaporateur rotatif. Le résidu est repris par 300 ml d'eau chaud et laissée à décanter à froid pour débarrasser les cires et les graisses.

L'extraction est poursuivie par passage dans trois solvants différents : chloroforme, acétate d'éthyle et le n-butanol afin d'extraire les flavonoïdes en fractions aglycones, mono glycosides et di et tri glycosides. Pour cela la phase aqueuse est épuisée par le chloroforme solvant préférentiel des composants plus polaires. Après agitation et repos dans une ampoule à décanter, deux phases sont obtenues, une phase organique et une phase aqueuse. Cette dernière est subit à son tour trois extractions avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer certains flavonoïdes aglycones et mono glycosides, puis par le n-butanol pour récupérer les flavonoïdes di et tri glycosides. Les différentes fractions récoltées sont ensuite évaporer à sec à 38°c dans l'évaporateur avec la pesé des extraits.

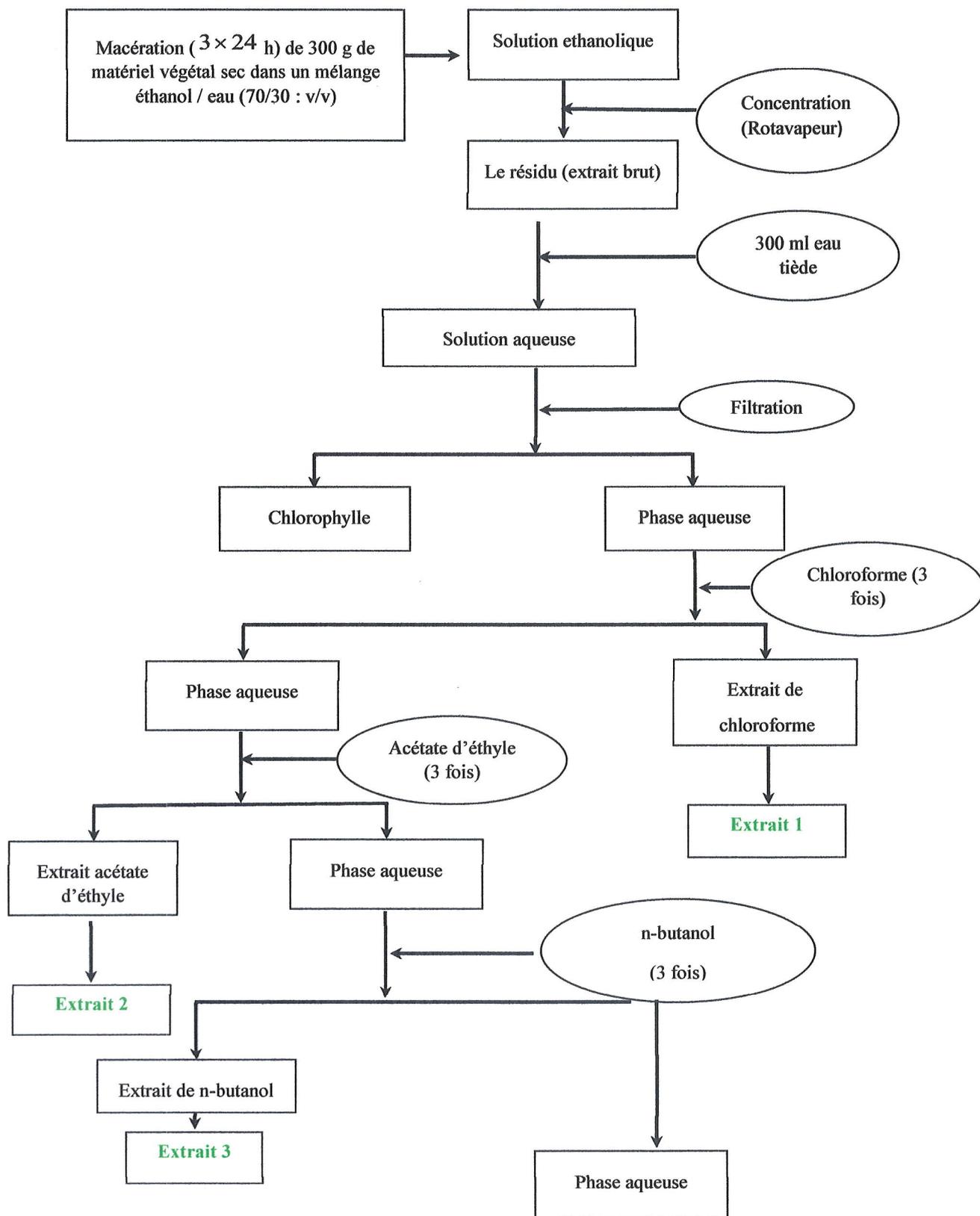


Figure 7 : Protocole d'extraction des flavonoïdes de RRL [8].

IV.3. Rendement des extraits de *Ranunculus repens* L

Le rendement de chaque extrait a été déterminé selon la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

- **R** : Rendement exprimé en %.
- **M** : Masse en gramme de l'extrait sec récupéré.
- **M₀** : Masse en gramme du matériel végétal sec.

IV.4. Tests phytochimiques

- **Test des alcaloïdes**

Dans des tubes à essai on introduit 15 ml d'extrait (aqueux, éthanolique) de chaque poudre aux quels sont additionnés 2 ml de NH₄OH 10% chaque solution est ensuite divisé en deux des tubes à essai, quelque gouttes du réactif de Mayer sont ajouté à l'un et des gouttes du réactif de Wagner à l'autre. La formation d'un précipité blanc ou un trouble blanc pour le premier réactif et brun pour le second indique la présence d'alcaloïdes [41].

- **Test des saponines**

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse. Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait (aqueux, Ethanolique) après l'agitation, le mélange est reposé pendant 20 minutes, et la teneur en saponosides est évaluée [41].

Pas de mousse = test négatif, mousse moins de 1cm = test faiblement positif.

Mousse de 1-2 cm = test positif, mousse plus de 2 cm = test très positif.

- **Test des tanins**

Pour confirmer la présence de tanins mise en évidence, en ajoutant à 1 ml de l'extrait (aqueux, éthanolique) 1 ml d'eau et 2 gouttes de solution de FeCl₃ (1%) diluée 10 fois.

L'apparition d'une coloration ou bien un précipité vert foncé ou bleu-vert indique la présence des tanins [42].



- **Test des flavonoïdes**

On verse 3 ml d'extrait (aqueux, éthanolique) de chaque sorte de poudre dans des tubes à essai, on ajoute 1 ml d'ammoniaque dilué (10%), puis 1 ml d'acide concentré H₂SO₄. Le virage de la couleur vers le jaune indique la présence de flavonoïdes [43].

- **Test des mucilages**

On a introduit 1 ml de chaque extrait (aqueux, éthanolique) dans deux tubes à essai respectivement on a ajouté 5 ml d'alcool absolu (éthanol absolu), attendre 10 min. l'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages [44].

- **Test des coumarines**

3 ml d'hydroxyde de sodium (10%) est ajouté à l'extrait (aqueux, éthanolique) de différentes parties de la plantes (feuilles, fleurs). La formation d'une couleur jaune indique la présence de coumarines [45].

- **Test des stérols et des terpenoïdes**

Nous avons pris 1 ml de chaque extrait (aqueux, éthanolique) avec 1 ml d'acide acétique glacial puis on a ajouté 2 ml d'acide sulfurique concentré de côté sans perturber la solution. L'apparition d'un anneau violet à la jonction de deux couches indique la présence de terpènes. Une couche verte sur le haut de la solution indique la présence de terpènes [41].

- **Test des glycosides cardiaque**

0.5 ml d'extrait (aqueux, éthanolique) est dilué avec 5 ml d'eau distillé. On ajoute à cette solution 2 ml d'acide acétique glacial contenant quelque goutte de chlorure de fer FeCl₃, puis on verse 0.5 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparence d'un anneau brun à l'interface indique la présence de glycosides cardiaque [46].

- **Test des carbohydrates**

On mit 2 ml d'extrait (aqueux, éthanolique) dans des tubes à essai avec 20 gouttes de liqueur de Fehling (A et B). Les tubes sont ensuite chauffés pendant 15 à 30 minutes. L'apparition d'un précipité de couleur rouge brique indique la présence de carbohydrates [43].

- **Test des polyphénols**

2 ml de chaque extrait (aqueux, éthanolique) est mélangé avec une goutte de la solution alcoolique de chlorure ferrique à 1%. L'apparition d'un précipité bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols [47].

- **Recherche des acides organiques**

Mettre quelques goutte de bleu de bromothymol dans un tube à essai contenant les extraits (aqueux, éthanolique), si la couleur change au jaune canari, l'extrait contient des acides organiques [48].

IV.5. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de la plante étudiée, est effectué selon la méthode de Folin Ciocalteu [49].

Le réactif utilisé est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_4$) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, qui entraîne la formation d'un nouveau complexe d'oxydes métalliques de tungstène et de molybdène de couleur bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [50].

Le protocole du dosage est effectué comme suit : 1 ml de réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois) est ajouté à 200 μ l de chaque extrait ou standard avec dilutions convenables. Après 4 min d'incubation à température ambiante, 800 μ l de Na_2CO_3 (75g/l) sont additionnés au mélange. L'ensemble préalablement agité est incubé à l'abri de la lumière pendant 2 heures. L'absorbance est ensuite lue à 765 nm par un spectrophotomètre UV/visible.

La concentration des polyphénols totaux pour chaque échantillon est calculée à partir de l'équation de régression d'une gamme d'étalonnage en milieu aqueux (0.718 à 50 μ g/ml), établie avec l'acide gallique dans les mêmes conditions opératoires que les extraits. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (mg EAG/mg d'extrait).

IV.6. Dosage des flavonoïdes

La méthode au trichlorure d'aluminium [51]. Cette méthode utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits. 1ml de chaque échantillon ou du standard (quercétine), dilués dans le méthanol, est ajouté à 1ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 30 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm par un spectrophotomètre UV-visible (Uviline 9400).

Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir d'une gamme d'étalonnage (1.562-100 $\mu\text{g/ml}$), établie avec la quercétine, et sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (mg EQ/mg d'extrait).

IV.7. Activité biologique

IV.7.1. Activité antioxydante

IV.7.1.1. Le test au DPPH

Pour étudier l'activité antioxydante des extraits, nous avons retenu la méthode qui utilise le DPPH (diphényle picryl-hydrazyl) comme un radical libre, selon le protocole décrit par Takao et al [52].

Principe

Cette méthode est basée sur la réduction d'un radical libre très stable : le 2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en présence d'un antioxydant donneur. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène. La réduction du radical libre (DPPH $^{\bullet}$) par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence d'un donneur d'hydrogène [53].

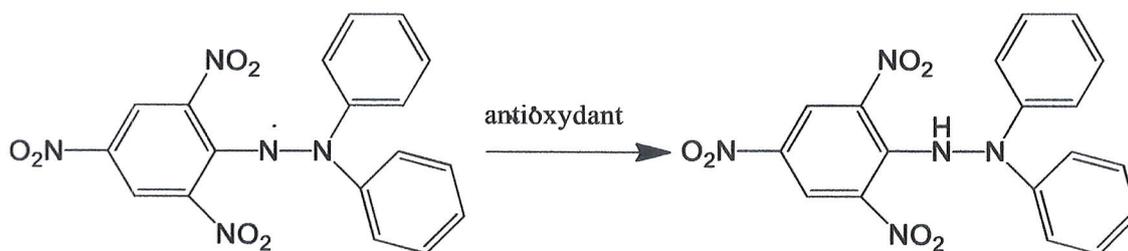


Figure 8 : Réduction du radical libre DPPH $^{\bullet}$ [53].

Mise en œuvre pratique

La solution mère de l'extrait est préparée dans le méthanol à une concentration de 100 µg/ml. Des dilutions sont réalisées de façon à avoir des concentrations qui varient entre 100 et 10 µg/ml. 50 µl de l'extrait en solution sont ajoutés à 1250 µL de solution au DPPH (100µM). La lecture de l'absorbance est faite à 517 nm après 30 mn d'incubation dans l'obscurité. Un blanc constitué de 50 µl de méthanol et 1250 µl de la solution au DPPH. La vitamine C (acide ascorbique) est utilisée comme control positif [52].

Le pourcentage d'inhibition est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs échantillon}) \times 100}{\text{Abs control}}$$

% Inhibition : Pourcentage inhibition du radical DPPH.

Abs control : Absorbance du tube control.

Abs échantillon : Absorbance de l'échantillon.

Il faut savoir aussi que l'IC50 est la concentration nécessaire pour éliminer 50% des radicaux libres, c'est le paramètre utilisé pour mesurer l'activité de l'extrait à piéger le radical libre [52].

IV.7.1.2. Pouvoir chélateur du fer (FRAP)

Le fer est un élément essentiel pour le bon fonctionnement physiologique, mais l'excès de cet élément peut causer des dommages à la cellule. En raison de sa forte réactivité, le fer est connu pour son grand rôle pro-oxydant vis-à-vis de l'oxydation des lipides [54].

Principe

Les substances ayant un potentiel de réduction, réagissent avec le ferricyanure de potassium pour former le ferrocyanure de potassium, qui réagit à son tour avec le chlorure ferrique pour donner lieu à un complexe qui a une absorption maximale à 700 nm [55].

Mise en œuvre pratique

Un volume égal à 1ml de l'extrait à différentes concentrations (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est

incubé au bain-marie à 50°C pendant 30 min. Ensuite 2,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 0,1%. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales [56].

IV.7.1.3. Le test à l'ABTS

Principe

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration vert bleu en le transformant en ABTS incolore. Le radical préformé ABTS^{•+} est généré en présence des ions persulfates.



En présence d'un antioxydant, le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration vert bleu intense qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 734 nm [57].

Mise en œuvre pratique

Le potentiel antioxydant radicalaire des dérivés de benzothiadiazine a été mesuré en utilisant le test de décoloration par cation radicalaire ABTS comme décrit par Re et al [58]. Avec des modifications mineures. Le radical cation ABTS^{•+} a été produit par la réaction entre ABTS (7 mM) dans l'eau et (2,45 mM) de persulfate de potassium (1: 1), conservée dans l'obscurité à la température ambiante pendant 12 à 16 h avant utilisation. La solution ABTS^{•+} a ensuite été diluée avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance de 0,700 à 734 nm. Après addition de 100 µl d'échantillon ou (acide ascorbique comme contrôle positif) à différentes concentrations jusqu'à 900 µl de solution ABTS^{•+} diluée, l'absorbance a été mesurée après 10 min d'incubation à température ambiante (20 ± 2 ° C). La capacité à piéger le radical ABTS^{•+} a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

Activité de piégeage de radical ABTS (%) = [1 - (Absorbance de l'échantillon à 734 nm / Absorbance du contrôle à 734 nm)] x100.

IV.7.2. Activité antibactérienne

Ce test est réalisé au niveau du laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie à université de Jijel. Nous avons choisi DMSO comme un solvant par ce qu'il ne possède pas une activité antimicrobienne, aussi nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé pour tester la sensibilité des souches bactériennes [59].

IV.7.2.1. Souches bactériennes utilisées

Trois souches bactériennes ont été utilisées :

- *Staphylococcus aureus*. ATCC43300.
- *Escherichia coli*. ACTCC25922.
- *Pseudomonas aeruginos*. ATCC27853.

IV.7.2.2. Méthode utilisée

Repiquage des souches bactériennes

Les souches bactériennes à tester ont été repiquées par la méthode des stries dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive, puis incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées.

Préparation de l'inoculum

Des colonies bien séparées des souches bactériennes étudiées ont été prélevées à l'aide de l'anse de platine et homogénéisées dans 9 ml d'eau distillé stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de 0.5 McFarland.

Préparation des milieux de culture

La gélose mueller hinton est coulée et répartie dans des boîtes de pétri stérile de 9 cm de diamètre. Ces dernières sont séchées pendant 30 min à température ambiante avant de leur emploi.

Préparation des puits

Des puits sont chargés de l'extrait à tester 25 μ l, et imprégnés de DMSO sont également utilisés qui vont servir de témoin négative.

Ensemencement

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage en stries serrées. En tournant la boîte d'environnant 60 °C, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries sur les boîtes.

A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant le produit à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37°C.

L'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne a classé le diamètre des zones d'inhibitions D de la croissance bactérienne comme suit :

Non sensible (-) : $D \leq 8$ mm.

Sensible (+) : $9 \leq D \leq 14$ mm.

Très Sensible (++) : $15 \leq D \leq 19$ mm.

Excrément sensible (+++) : $D \leq 20$ mm.

IV.7.3. Autre activité (Activité anticorrosive)

IV.7.3.1. Etude d'activité inhibitrice

L'objectif de notre travail est d'examiner le pouvoir inhibiteur de la corrosion des extraits dans un milieu acide.

Matériau

Le matériau testé dans cette étude est un acier 316 L, dont la composition chimique est donnée dans le tableau 3 [60].

Tableau 3 : composition atomique de l'acier inoxydable 316L [60].

Composition (%)	Fe	Cr	Ni	Mo	Si	C
Acier Inox	69.01	19.49	8.94	1.35	1.2	0.55

Ce dernier a été découpé en plaque de dimension 1cm x 1 cm. Chaque plaque subit un polissage de la surface au papier abrasif de granulométrie de plus en plus fine :

2000/1200/1000/400, et avant d'être trempée dans la solution corrosive, elle est rincée à l'eau distillé, dégraissée dans l'acétone et enfin séchée à l'air pulsé.

Milieu corrosif

Le milieu corrosif est une solution acide (1M), préparé par dilution avec l'eau distillé d'une solution d'acide chlorhydrique concentrée de masse molaire 36.46 g/mol, de densité 1.19 et de pourcentage massique 38%.

Dispositif

L'étude électrochimique a été réalisée à l'aide d'un potentiostat de type solartron 1260 relié à un micro-ordinateur (avec un logiciel CorrWare) permettant de déterminer les paramètres électrochimique. Toutes les expériences ont été effectuées dans Une cellule en verre Pyrex à double paroi d'une capacité de 100 ml, avant chaque expérience la cellule a été nettoyée avec l'éthanol, rincée à l'eau distillée et puis séchée sous air. Cette cellule comporte trois électrodes :

- **Une contre électrode (électrode auxiliaire) (CE)**

En platine de 1 mm de diamètre maintenue en parallèle avec l'électrode de travail utilisée pour assurer le passage du courant.

- **Une électrode de référence**

Toutes les valeurs de potentiel sont mesurées par rapport à une électrode au calomel saturée Hg/Hg₂Cl₂/KCl (ECS).

- **Une électrode de travail (ET)**

L'électrode de travail subit, avant chaque manipulation, un prétraitement qui consiste en un polissage de la surface de l'électrode au papier abrasif de granulométrie de 400 à 2000 suivi d'un rinçage à l'eau distillée dans l'éthanol dans l'ultrason et séchés avant utilisation.



Figure 9 : Appareillage électrochimique utilisé (potentiostat).

Préparation de polarisation (intensité-potentiel)

La solution agressive qui constitue le milieu d'étude est une solution d'acide chlorhydrique 1M, cette solution a été choisie comme solution agressive à cause de ses capacités d'attaques élevées et ses propriétés de dissolution des inhibiteurs synthétisés.

Dans le but d'examiner l'influence de la concentration, les inhibiteurs sont ajoutés sous différentes concentrations.

Le tableau suivant regroupe nos extraits testés, avec une gamme de concentration de 100 à 500 ppm.

Tableau 4 : Les extraits testés.

Phase 1	n-butanol
Phase 2	Acétate d'éthyle

Les courbes de polarisation (intensité- potentiel)

Cette méthode permet de déterminer d'une façon précise les paramètres électrochimiques d'un métal au contact d'un électrolyte à savoir : la vitesse instantanée de corrosion (I_{corr}), le potentiel de corrosion (E_{corr}), les pentes de Taffel, la résistance de polarisation (R_p), les courants limitent de diffusion [61].

Nous intéressons sur un paramètre (I_{corr}), pour calculer l'efficacité inhibitrice de nos extraits à partir l'équation suivante :

$$\eta_i(\%) = \frac{(I_{blanc} - I_{inhi})}{I_{blanc}} \times 100$$

$\eta_i(\%)$: L'efficacité inhibitrice.

I_{corr} , $I_{corr(i)}$: La densité de courant de corrosion en absence et en présent de l'inhibiteur [62].

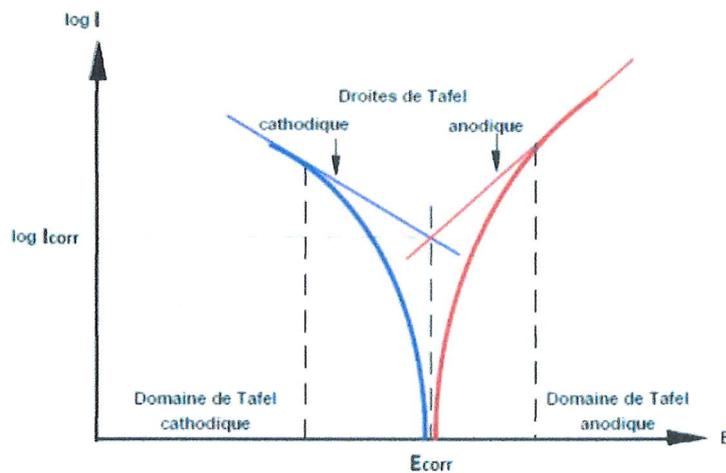


Figure 10 : Les paramètres électrochimiques à partir des droites de Tafel [61].

Chapitre V

Résultat et interprétation

V.1. Analyse quantitatives

V.1.1. Rendement des extraits de (RRL)

La masse en gramme du matériel végétal à traiter ($m= 300g$). Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Résultats obtenus pour chaque extrait.

Extrait	Masse (g)	Rendement (%)	Aspect	Couleurs
Chloroforme	3.001	1	Pâte	Vert foncé
Acétate d'éthyle	5.107	1.70	Pâte	Vert foncé
n-butanol	9.540	3.18	Pâte	marron foncé

L'isolement des métabolites majoritaires de *Ramunculus repens* L par la méthode d'affrontement par les solvants organiques à partir des parties aériennes, montre que l'extrait butanolique représente un rendement plus élevé (3.18%), suivi de l'extrait acétate d'éthyle (1.70%), et enfin l'extrait chloroformée avec un rendement plus faible (1%) (figure 11). Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

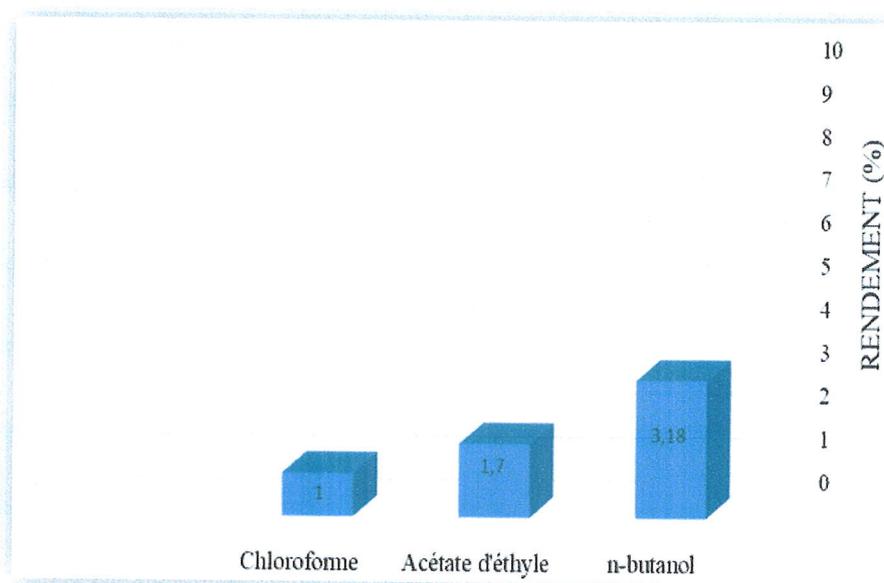


Figure11 : Rendement des polyphénols pour chaque extrait.

V.1.2. Test phytochimique

Ce sont des tests qualitatifs qui ont été effectués pour la plante *RRL*, et qui nous renseignent sur la composition chimique de deux phases (aqueuse et éthanolique) de la partie aérienne de la plante. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-après.

Tableau 6 : Résultats des tests phytochimiques.

Classe de composé	Phase aqueuse	Phase éthanolique
Alcaloïde	Wagner -	Wagner -
	Mayer -	Mayer -
Tanin	++	+
Flavonoïde	++	++
Mucilage	-	-
Coumarine	-	-
Terpénoïdes	+	+
Polyphénol	+	+
Glucoside cardiaque	-	-
Carbohydate	+	+
Acide organique	-	-
Saponine	-	-

Significations des symboles : « + » : Présence faible ; « ++ » : Présence modérée ;

« - » : Absence.

Les résultats de caractérisation des groupes chimiques présents dans les deux phases de la plante *RRL*, ont mis en évidence la présence des polyphénols, des tanins, flavonoïde, des terpénoïdes et des carbohydate.

V.1.3 Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées parce qu'elles sont réputées pour leurs excellentes propriétés antioxydante et antimicrobiennes. Pour ces raisons, un dosage de ces composés a été effectué pour les trois extraits. Par la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-Ciocalteu. En utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

La gamme de concentrations d'acide gallique utilisée pour le dosage des polyphénols et les absorbances respectives mesurées à 765 nm sont représentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Absorbances adapté avec la gamme de concentration d'acide gallique.

Acide gallique ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance
0.781	0.035
1.562	0.047
3.125	0.117
6.25	0.305
12.5	0.658
25	1.268
50	2.783

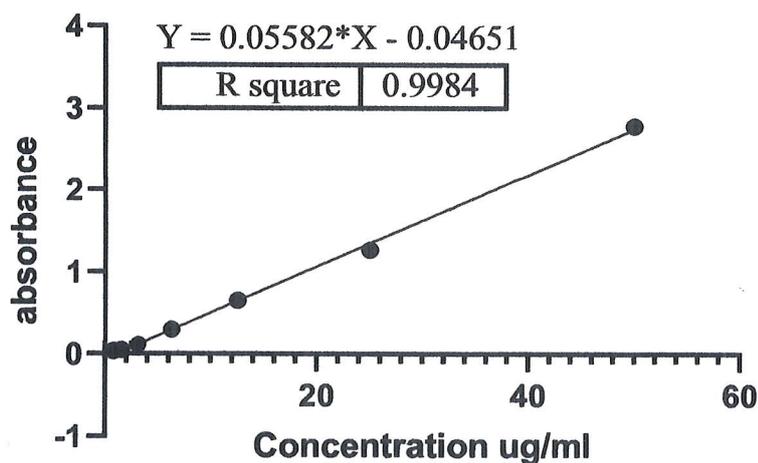


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les teneurs obtenues sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (mg EAG/ mg d'extrait). Les résultats de dosage des polyphénols révèlent que les extraits, acétate d'éthyle et n-butanol contiennent respectivement 0.730 et 0.518 mg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait. Par contre l'extrait chloroformé contient 0.140 mg équivalent d'acide gallique/ mg d'extrait. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 13.

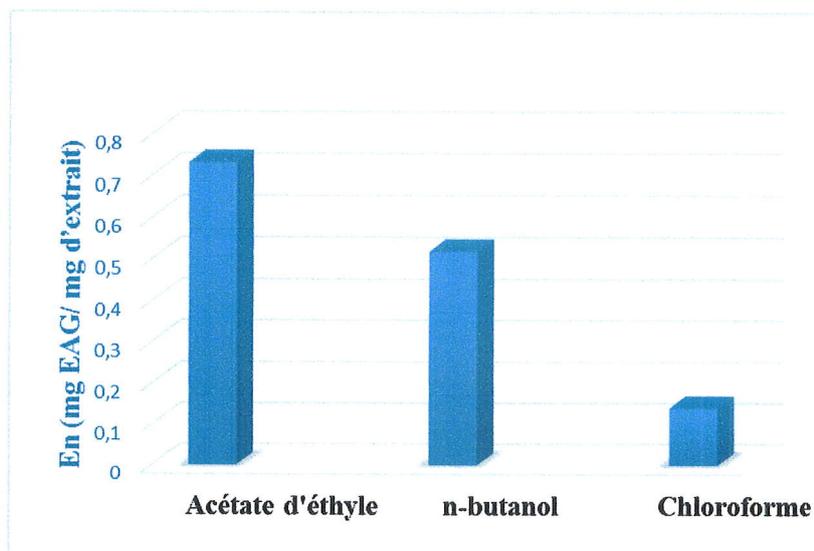


Figure 13 : Teneur en polyphénol des extraits.

V.1.4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 8 : Absorbances adapté avec la gamme de concentration de la quercétine.

Quercétine ($\mu g/ml$)	Absorbance
1.562	0.014
3.125	0.017
6.25	0.047
12.5	0.103
25	0.205
50	0.425
100	0.792

La quantification des flavonoïdes a été déterminée en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire (l'équation de la régression linéaire), réalisée à partir d'une solution étalon de quercétine à différentes concentrations.

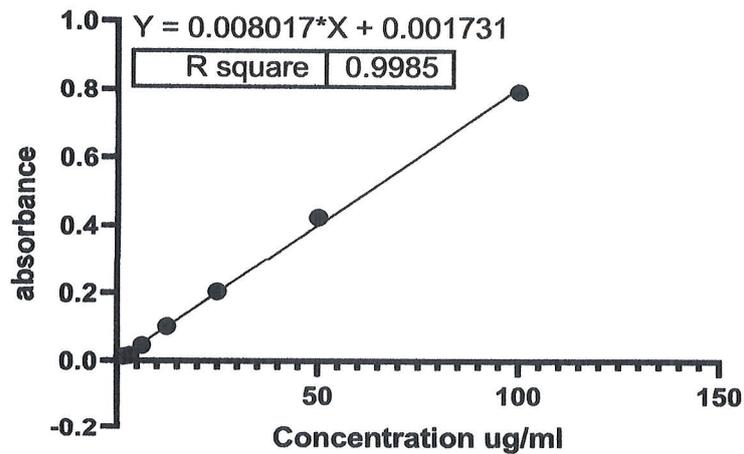


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de de la quercétine.

Le calcul de la teneur en flavonoïdes dans le différent extrait est donc exprimé en mg EQ/mg d'extrait.

Ce qui concerne le teneur en flavonoïdes de nos extraits on remarque que l'extrait acétate d'éthyle est plus riche en flavonoïdes 5.980 mg EQ/mg d'extrait, suivi par l'extrait butanolique 3.209 mg EQ/mg d'extrait, et enfin l'extrait chloroformée avec une teneur 0.996 mg EQ/mg d'extrait.

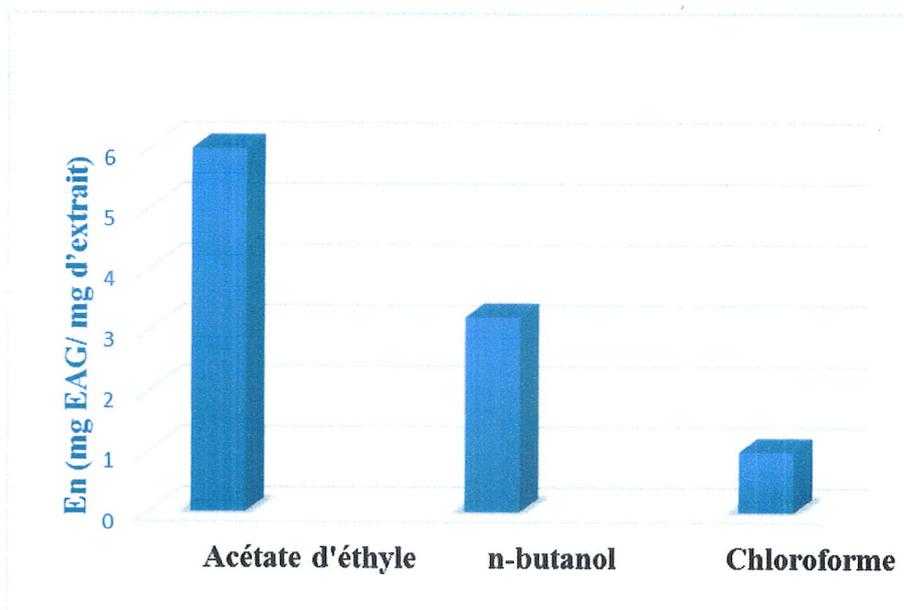


Figure 15 : Teneur en Flavonoïdes des extraits.

V.2. Activités biologiques

V.2.1. Activité antioxydante

V.2.1.1. Piégeage du radical DPPH^{*}

Le radical libre DPPH^{*} a permis l'estimation de l'activité antioxydante des composés isolés et identifiés. C'est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les composés antioxydants testés. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule testée.

Les figures 16, 17, 18, et 19 illustrent l'efficacité des extraits, chloroformée, acétate d'éthyle, butanolique à piéger le radical DPPH^{*}. D'après les résultats obtenues, l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation des concentrations des extraits dans le milieu réactionnel.

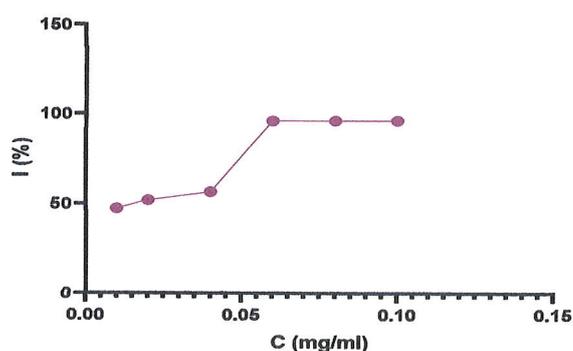


Figure 16 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH^{*} en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

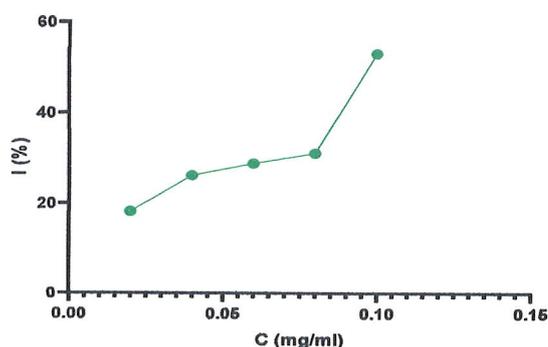


Figure 17 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH^{*} en fonction des différentes concentrations de l'extrait chloroformique.

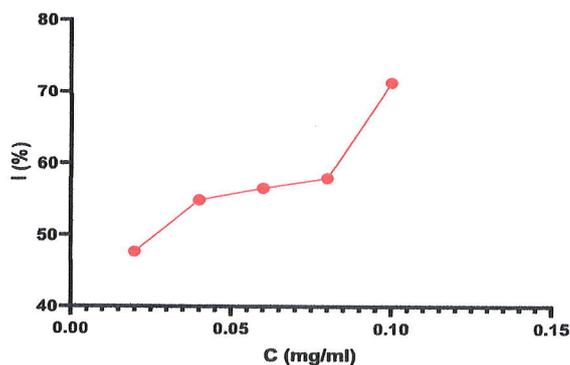


Figure 18 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations acétate d'éthyle.

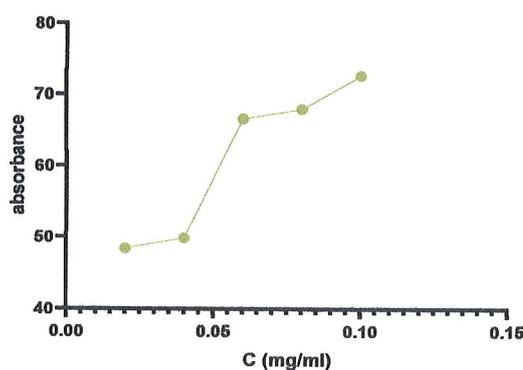


Figure 19 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations butanolique.

La valeur d'IC₅₀ de chaque phase est représentée dans tableau 9.

Tableau 9 : Les différentes phases avec les valeurs d'IC₅₀ (DPPH').

La phase	IC ₅₀ (mg/ml)
Acide ascorbique	0.0158
Acétate d'éthyle	0.0253
n-butanol	0.0410
Chloroforme	0.0981

Le premier constat extrait de ces figures est que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH' augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits de la plante étudiée.

A travers les résultats obtenus, on a déduit que nos extraits ont exercé une bonne activité vis-à-vis du radical DPPH'. Ce constat s'est confirmé par les valeurs d'IC₅₀ car

on a enregistré 0.0253 mg/ml pour l'extrait acétate d'éthyle suivi par celle de n-butanol avec IC_{50} de l'ordre 0.0410 mg/ml et enfin l'extrait chloroformée avec IC_{50} de l'ordre 0.0981 mg/ml.

A savoir que l' IC_{50} déterminé de notre référence (acide ascorbique) est de l'ordre 0.0158 mg/ml. Nous avons vu que l' IC_{50} de l'extrait d'acétate d'éthyle est très proche à IC_{50} de référence que les deux autres extraits.

V.2.1.2. Pouvoir chélateur du fer (FRAP)

Une autre étude est faite sur le pouvoir chélateur du fer des trois extraits de la partie arienne de RRL.

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir réducteur de différent extrait augmente en fonction de la concentration. Les résultats obtenus lors du test au FRAP sont représentés dans la figure 20.

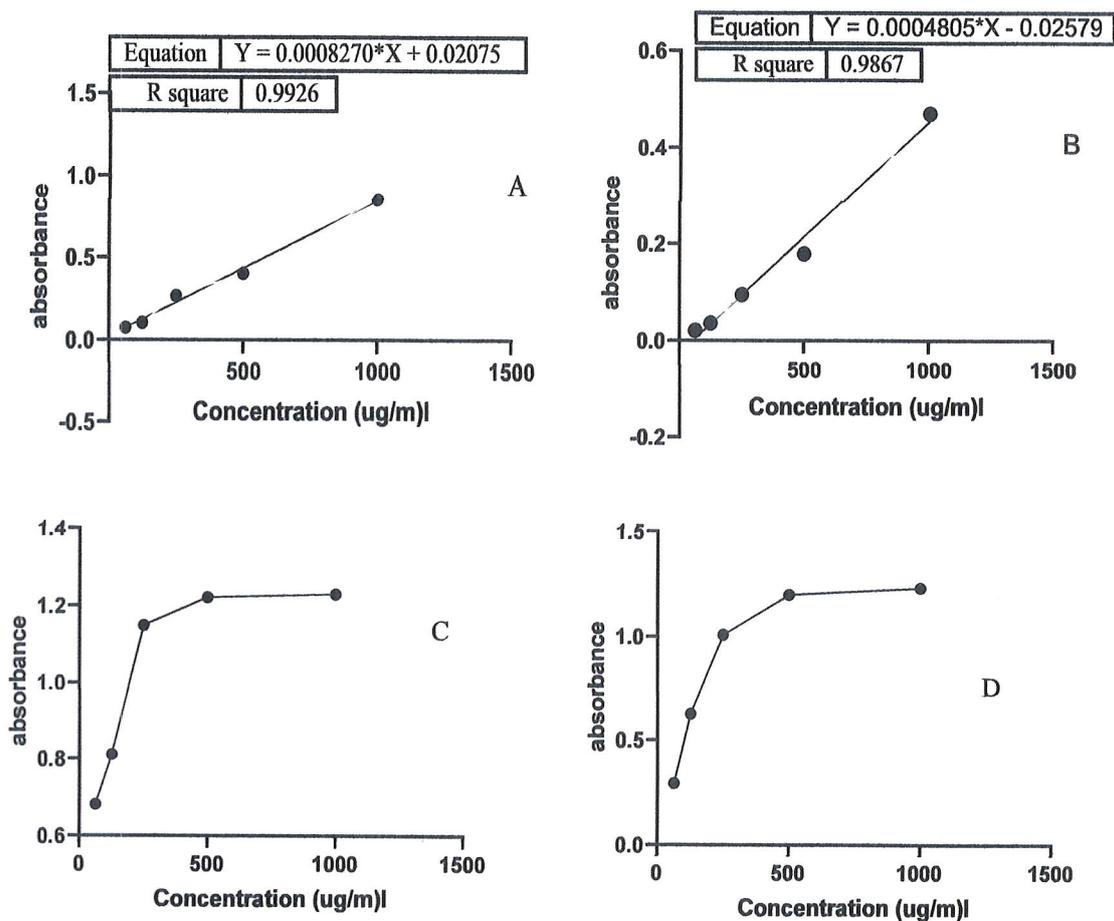


Figure 20 : Effet des extraits de RRL sur la réduction du fer (FRAP).

(A) : Extraits butanolique. (B) : Extraits chloroformique.

(C) : référence (acide ascorbique). (D) : Extrait d'acétate d'éthyle.

La valeur IC_{50} de chaque phase a été calculée et les résultats traduits dans le tableau suivant.

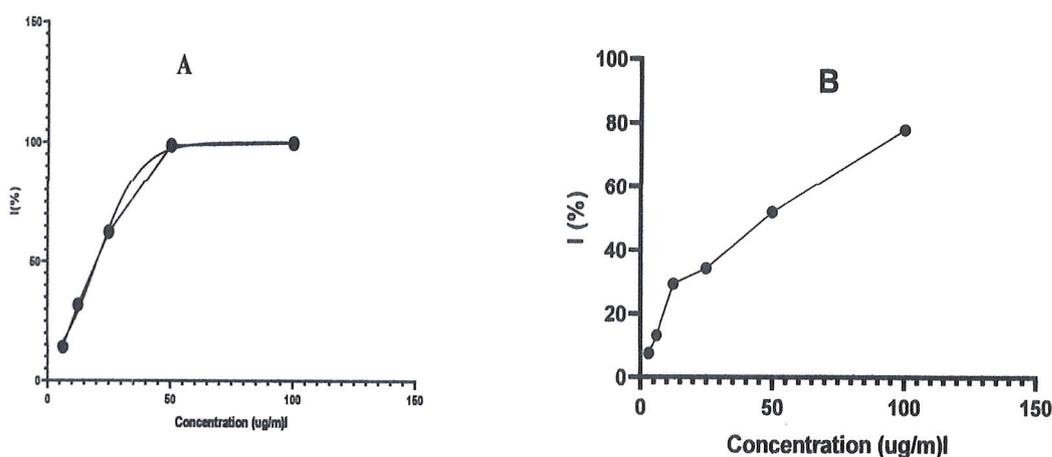
Tableau 10 : Les différentes phases avec les valeurs d' IC_{50} (FRAP).

La phase	IC_{50} (mg/ml)
Acide ascorbique	0.0470
Acétate d'éthyle	0,1251
n-butanol	0.4918
Chloroforme	0.5437

Les figures suivantes montrent que l'extrait acétate d'éthyle donne un pouvoir réducteur important avec IC_{50} de l'ordre de 0,1251 mg/ml contre 0.0470 mg/ml pour la référence. Par contre les extraits, butanolique et chloroformique donnent un faible pouvoir réducteur avec 0.4918 et 0.5437 mg/ml respectivement.

V.2.1.3. Inhibition de radical ABTS⁺

Les résultats obtenus dans la figure 21 montrent que l'inhibition de radical ABTS⁺ augmente en fonction de concentration.



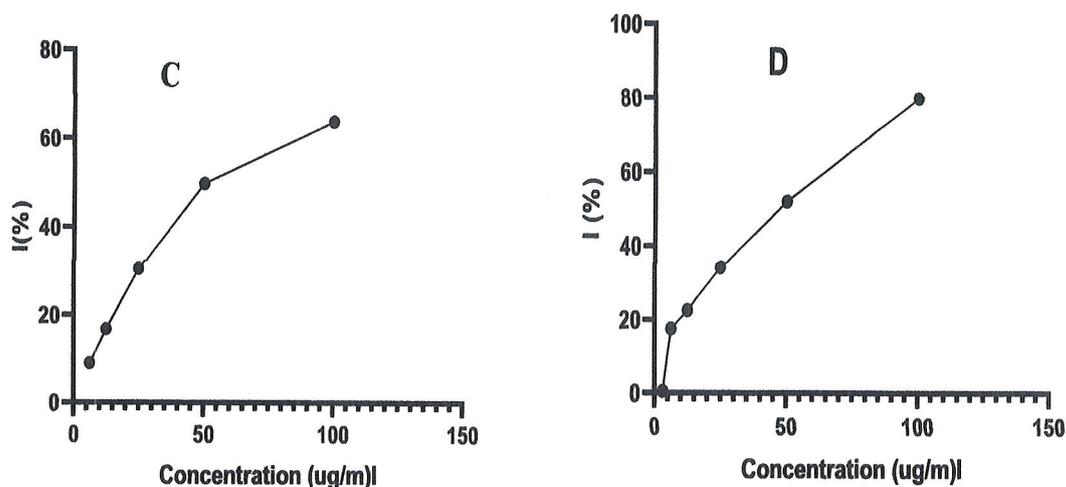


Figure 21 : Inhibition de radical libre ABTS⁺ en fonction des concentrations.

(A) ; Référence (acide ascorbique). (B) ; Extraits butanolique.

(C) ; Extrait chloroformique. (D) ; Extrait d'acétate d'éthyle.

Les valeurs IC₅₀ des phases et d'acide ascorbique, sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Les différentes phases avec les valeurs d'IC₅₀ (ABTS⁺).

La phase	IC ₅₀ (mg/ml)
Acide ascorbique	0.0181
Acétate d'éthyle	0.0479
n-butanol	0.0473
Chloroforme	0.0509

Les résultats d'évaluation de l'activité antioxydante par le test d'inhibition de radical ABTS⁺ montre que l'extrait butanolique et l'extrait acétate d'éthyle, ont des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 0.0473 et 0.0479 mg/ml respectivement.

L'activité antioxydante de l'extrait chloroformique est faible par rapport à celle de référence.

V.2.2. Activité antibactérienne

Le test de sensibilité des bactéries aux différentes fractions des extraits est réalisé in vitro par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Pour évaluer le potentiel antibactérien de nos extraits, nous avons préféré de les tester contre trois souches bactériennes. Le diamètre de zone d'inhibition des 3 extraits vis-à-vis des souches bactériennes testées sont représentés dans le tableau et les figures ci-dessous.

Tableau 12 : Diamètre de zone d'inhibition des trois phases vis-à-vis des souches bactériennes testées en différentes concentrations.

	Diamètre des zones inhibition (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> .ATCC43300	<i>Escherichia coli</i> .ACTCC25922	<i>Pseudomonas aeruginos</i> . ATCC27853
C (mg/ml)	La phase acétate d'éthyle		
0.0625	0 (-)	0 (-)	0 (-)
0.125	0 (-)	0 (-)	0 (-)
0.25	0 (-)	0 (-)	0 (-)
0.5	0 (-)	0 (-)	0 (-)
1	0 (-)	0 (-)	0 (-)
2	0 (-)	0 (-)	0 (-)
4	21 mm (+++)	0 (-)	0 (-)
	La phase butanolique		
0.0625	0 (-)	0 (-)	0 (-)
0.125	0 (-)	0 (-)	0 (-)
0.25	0 (-)	0 (-)	0 (-)
0.5	0 (-)	0 (-)	0 (-)
1	0 (-)	0 (-)	0 (-)
2	0 (-)	0 (-)	0 (-)
4	15 mm (++)	0 (-)	0 (-)
	La phase chloroformique		
0.0625	0 (-)	0 (-)	0 (-)

0.125	0 (-)	0 (-)	0 (-)
0.25	0 (-)	0 (-)	0 (-)
0.5	0 (-)	0 (-)	0 (-)
1	0 (-)	0 (-)	0 (-)
2	0 (-)	0 (-)	0 (-)
4	6.25 (-)	0 (-)	0 (-)

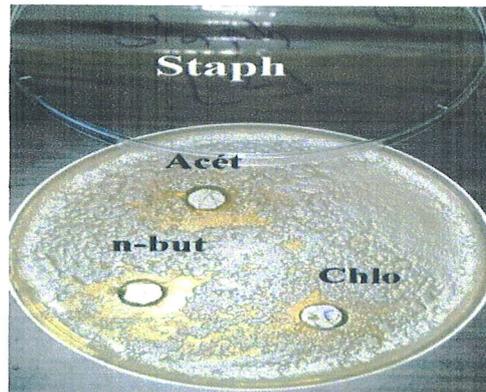


Figure 22 : Effet de trois extraits sur la souche *Staphylococcus aureus* (ATCC43300) à concentration 4mg/ml.

La référence utilisé c'est un antibiotique (ciprofloxacine) à concentration d'ordre 0.05 mg/ml. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 13 et les figures ci-dessous.

Tableau 13 : Effet d'antibiotique (ciprofloxacine) sur les trois souches bactériennes.

Les souches	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	<i>Escherichia coli</i> ACTCC25922	<i>Pseudomonas aeruginos.</i> ATCC27853
Ciprofloxacine	37 mm (+++)	25 mm (+++)	31 mm (+++)

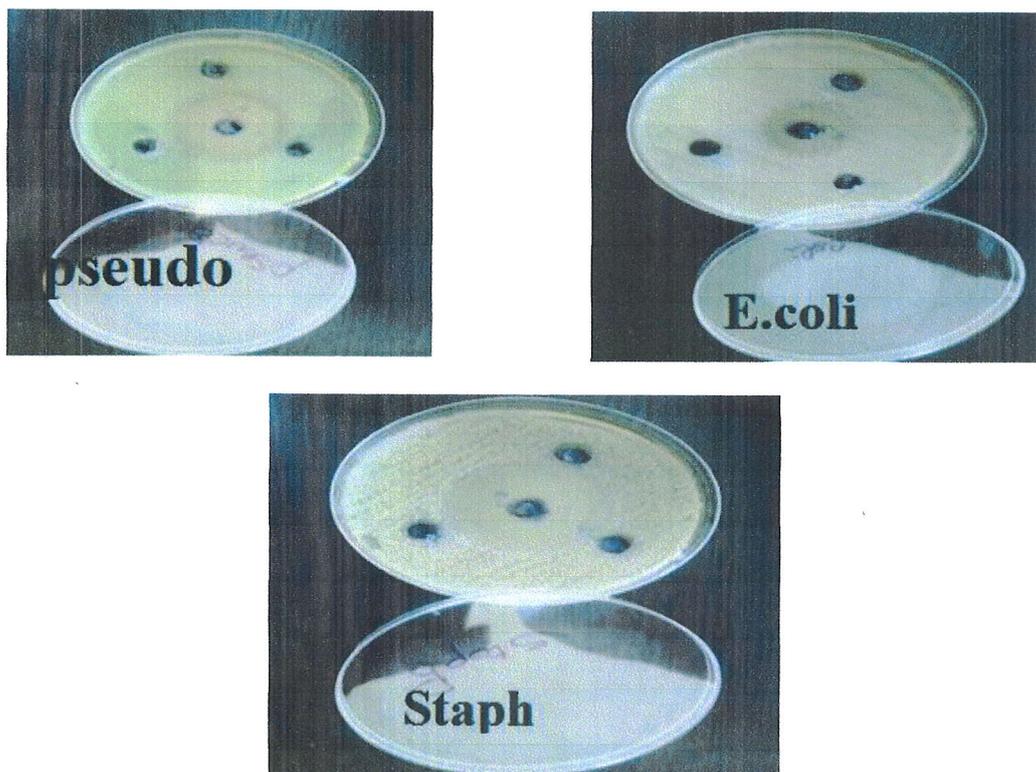


Figure 23 : Effets d'antibiotique sur les trois souches bactériennes.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique possèdent une bonne activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* à la concentration 4 mg/ml, avec une zone d'inhibition de 21 mm et 15 mm respectivement. Par contre aucune activité remarquée pour l'extrait chloroformée.

IV.2.3. Autre activité

V.2.3.1. Activité anticorrosive

La mesure de perte de masse

Cette opération a été faite par immersion des coupons de l'acier 316 L dont la surface de 1 cm², préalablement polies avec le papier abrasif de granulométrie, et lavées avec de l'eau et de l'acétone dans le milieu corrosif dans lequel a été additionnée l'inhibiteur à différentes concentration, l'immersion durera 72 h pour chaque opération.

L'efficacité inhibitrice a été calculée en absence et en présence d'inhibiteur selon l'expression suivante :

$$EI (\%) = (W_0 - W_i / W_0) \times 100$$

W_0 : la perte de la masse en absence de l'inhibiteur.

W_i : la perte de la masse en présence de l'inhibiteur.

Les résultats du test sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 14 : L'efficacité inhibitrice avec l'absence et la présence des inhibiteurs (les deux phases).

C inhibiteur en ppm	La perte de la masse (/cm ²)	EI (%)
La phase butanolique		
0	0.006	/
100	0.0003	95
200	0.0008	86.66
300	0.0010	83.33
400	0.0015	75
500	0.0019	68.33
La phase acétate d'éthyle		
100	0.0011	81.66
200	0.0004	93.33
300	0.0007	88.33
400	0.0015	75
500	0.0019	68.33

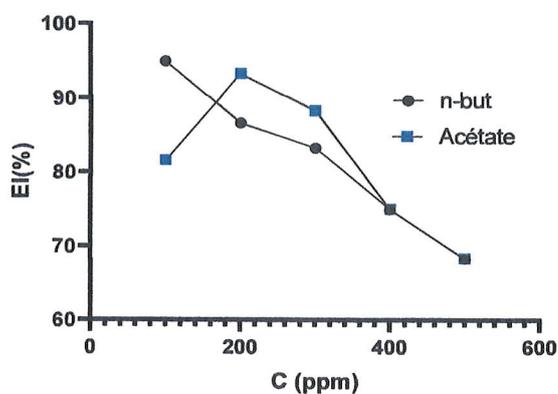


Figure 24 : L'efficacité inhibitrice à différentes concentration des inhibiteurs (extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique).

D'après les résultats de cette méthode on peut constater que la concentration de l'inhibiteur (phase acétate d'éthyle et phase butanolique) joue un rôle primordial pour l'évolution de l'efficacité inhibitrice.

On a noté une efficacité meilleure à 100 ppm de l'ordre de 95% pour la phase butanolique aussi, à 200 ppm une efficacité remarquable de l'ordre de 93.33% pour la phase acétate d'éthyle.

La polarisation potentiodynamique

Les mesures électrochimiques sont réalisées à l'aide d'un montage constituant d'un Potentiostat Solartron 1260 avec un logiciel CorrWare. Le potentiel appliqué à l'échantillon varie de -0.6 mV à 0.8 mV. Le tableau ci-dessous regroupe les résultats obtenus.

Tableau 15 : Les paramètres de la polarisation potentiodynamique avec l'absence et la présence des inhibiteurs.

Concentration (ppm)	-E _{corr} (mV)	I _{corr} (mA.cm ²)	η (%)
La phase butanolique			
0	0,2523	0,00165	/
100	0,3352	0,000043279	97,377
200	0,3323	0,000062845	96,1912
300	0,3461	0,0001227	92,5636
400	0,3476	0,00013391	91,8842
500	0,3635	0,00013833	91,6164
La phase acétate d'éthyle			
100	0,3202	0,00006744	95,9127
200	0,3288	0,000047139	97,143114
300	0,3237	0,00005901	96,4236
400	0,3213	0,00006894	95,8218
500	0,2299	0,000083307	94,9511

Les courbes de polarisation obtenues pour l'acier 316 L avec les deux phases à différentes concentrations, sont présentées dans les figures suivantes.

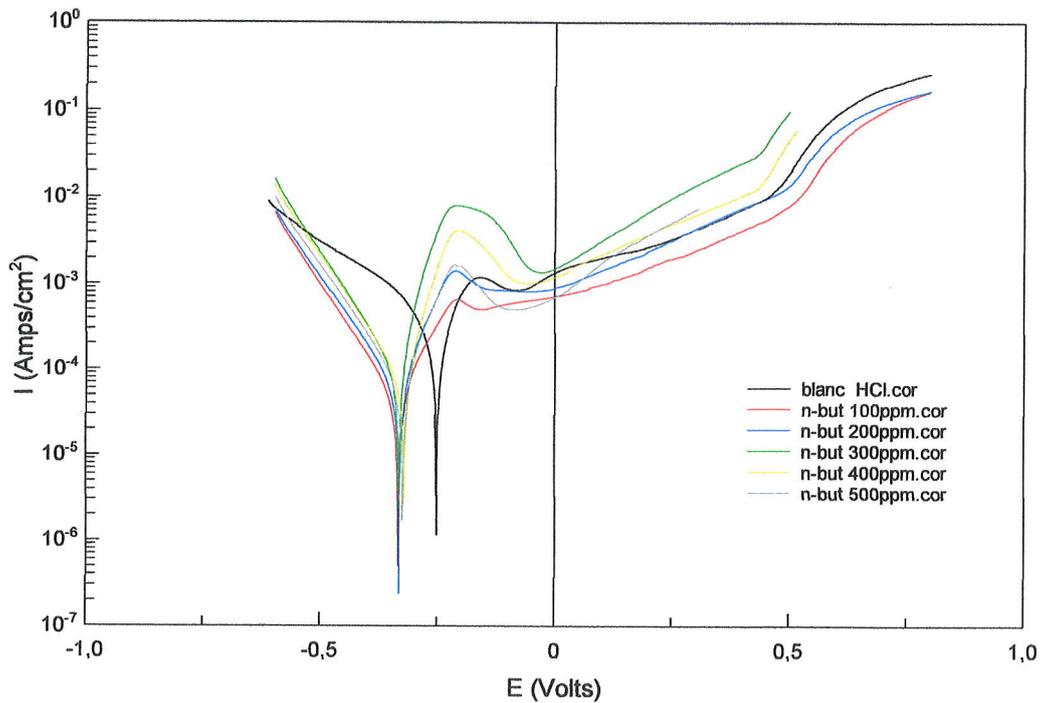


Figure 25 : Les courbes de la polarisation potentiodynamique de l'acier 316 L de la phase butanolique à différentes concentrations.

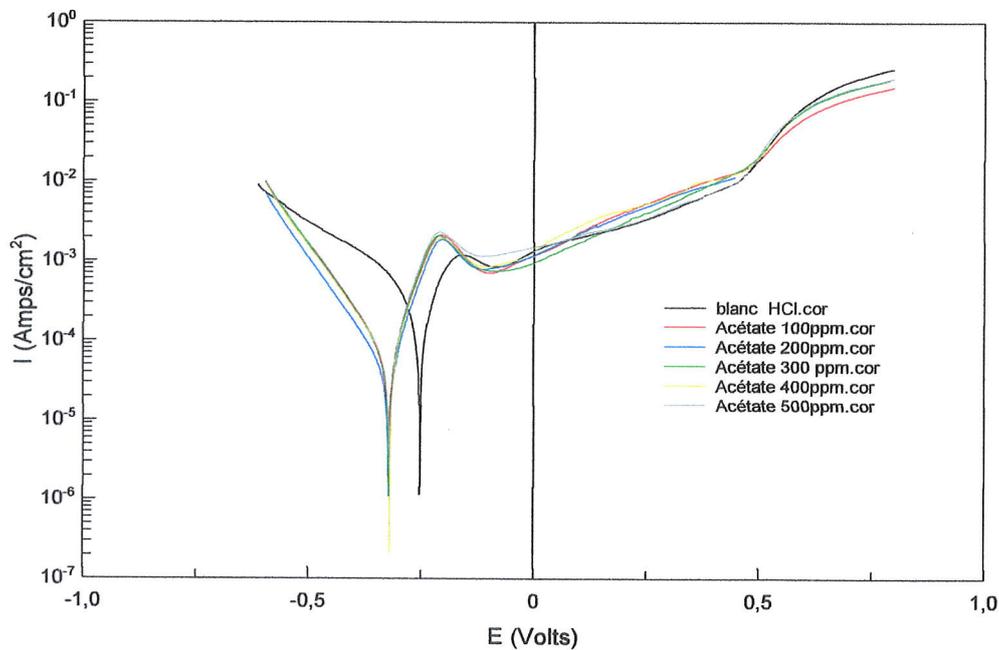


Figure 26 : Les courbes de la polarisation potentiodynamique de l'acier 316 L de la phase acétate d'éthyle à différentes concentrations.

D'après les résultats obtenus dans le tableau 15. On constate que nos inhibiteurs présentent des résultats très encourageants pour les deux phases.

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que :

L'ajout de l'extrait acétate d'éthyle au milieu corrosif provoque une diminution d' I_{corr} , et nous donne une efficacité 97.14% à 200 ppm.

Aussi L'ajout de l'extrait butanolique au milieu corrosif provoque une diminution de la densité du courant de corrosion, et donne une meilleure efficacité 97,377% à 100 ppm.

Pour les deux phases on a enregistré une diminution de la densité de courant de corrosion (500 à 100 ppm) donc une augmentation de l'efficacité inhibitrice.

Chapitre VI

Discussion

La source principale des flavonoïdes que nous avons utilisée dans notre travail a été la plante *Ranunculus repens* L de la région de Texenna (Jijel). Les analyses qualitatives et quantitatives effectuées, ont permis d'avoir une idée sur la nature de ses principes actifs responsables de l'activité biologique. Il s'agit des composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes. En addition à ces composés la plante *RRL* contient aussi des terpenoïdes et des tanins. De plus les analyses quantitatives réalisées, dosage des polyphénols ainsi que le dosage des flavonoïdes montrent que les différents extraits de *RRL* sont riches en flavonoïdes et en polyphénols. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Dr Kebieche [8]. Réalisés sur *RRL* de la région de Chekfa (Jijel), indiquant qu'elle est contenue une quantité très importante en polyphénols et en flavonoïdes.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à étudier le rôle potentiel antiradicalaire de nos extraits en adaptant la méthode ou DPPH'. Nos résultats ont montré que l'extrait acétate d'éthyle présente un effet antiradicalaire très puissant sur ce radical, avec IC_{50} 25.3 $\mu\text{g/ml}$, contre 15.8 $\mu\text{g/ml}$ de l'acide ascorbique l'antioxydant de référence. Aussi nous avons noté que l'extrait butanolique et chloroformé présentent une capacité antiradicalaire moyenne par rapport à l'extrait acétate d'éthyle, avec IC_{50} 41.0 $\mu\text{g/ml}$ et 98.1 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

La capacité de réduction du fer (FRAP) est l'une des méthodes utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante. Les résultats obtenus montrent que l'extrait acétate d'éthyle présente une meilleure activité réductrice du fer avec IC_{50} de l'ordre 125.1 $\mu\text{g/ml}$ contre 47 $\mu\text{g/ml}$ pour la référence.

Pour la méthode d'ABTS, la valeur IC_{50} de l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique est égale 47.9 $\mu\text{g/ml}$, 47.3 $\mu\text{g/ml}$ contre 18,1 $\mu\text{g/ml}$ de l'acide ascorbique.

L'activité antibactérienne des extraits de *RRL* sur les souches tester, pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants phénoliques, notamment les flavonoïdes. Dans notre étude réalisée sur trois souches bactériennes, nous avons trouvé une activité inhibitrice contre *staphylococcus aureus* pour l'extrait acétate d'éthyle, et l'extrait butanolique, avec une zone d'inhibition de 21 mm, 15 mm, respectivement. Par contre, aucune activité enregistrée pour l'extrait chloroformé. Aussi aucune activité enregistrée pour les trois extraits sur les autres souches.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Kaya [62]. Réalisés sur *R. marginatus* et *R. sprunerianus* montrent que les différents extraits de ces plantes présentent une activité contre *staphylococcus aureus*.

Aussi notre résultats sont en accord avec les travaux de Ahlem et all [63], réalisé sur *R. arvenisiz* L. montrent que les différents extraits de ces plantes présentent une activité contre *staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus ont confirmé l'existence de composés antimicrobiens dans l'extraits d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique, et ont validé l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle contre les maladies infectieuses.

L'évaluation du pouvoir inhibiteur de corrosion de l'extrait acétate d'éthyle et l'extraits butanolique de *RRL*, a été réalisée en utilisant deux différentes méthodes : La perte de la masse et la polarisation potentiodynamique. L'ajout de l'extrait Acétate d'éthyle ou l'extrait butanolique au milieu corrosif provoque une diminution de densité de courant de corrosion, à cause de la variation de la composition chimique de *RRL*.

Conclusion

Actuellement, le concept d'une thérapie à l'aide d'antioxydant naturel représente un but thérapeutique important et est d'intérêt scientifique et public. Parmi les antioxydants naturels les plus étudiés on cite les flavonoïdes de *Ranunculus repens* L. ces derniers sont considérés comme un outil pharmaceutique important pour prévenir la pathologie associée aux radicaux libres.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'étude phytochimique de *RRL*, les résultats obtenus montrent que les extraits de *RRL* présentent un taux important en polyphénols et en flavonoïdes.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés plus précisément à étudier l'effet antiradicalaire par trois méthodes (DPPH, FRAP, ABTS) ainsi que l'activité antibactérienne et anticorrosive de *RRL*. Les résultats obtenus montrent clairement que :

- L'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique, présentent un effet antiradicalaire très puissant.
- L'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique, possèdent une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*.

En fin nous avons examiné dans ce travail, l'inhibition de la corrosion d'un acier Inox 316 L en milieu acide en présence de l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique. L'efficacité inhibitrice atteint la valeur maximale, 97.33 % pour une concentration 100 ppm (la phase butanolique), et 97.14% pour une concentration 200 ppm (la phase acétate d'éthyle) à température ambiante.

Ces résultats sont avantageux, ils ouvrent une piste dans la compréhension du rôle joué par les flavonoïdes. Cependant, cela nécessite des travaux complémentaires, dans ce cadre nous proposons :

- Poursuivre l'étude chimique de la plante afin d'identifier les composés responsables de ces activités.
- Tester l'effet antioxydant des flavonoïdes de *RRL* in vivo.
- Etudier l'effet de persistance sur l'acier et étendre l'étude sur d'autres matériaux.

Référence bibliographie

- [1] Messai. L., 2011. Etude phytochimiques d'une plante médicinale de l'est algérien (*artemisia herba alba*). Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.P1.
- [2] Meratate. F., 2013. Etude phytochimiques et pouvoir biologique des métabolites secondaires de la plante *Zizyphora hispanica* L. de la région de m'sila. Thèse de magistère Université de m'sila.P1.
- [3] Lovett-doust, J. Lovett-doust, L. and Groth, A. T. 1990. The biology of Canada weeds.95. *Ranunculus repens* can. J. plant sci. 70: 1123-1141.
- [4] Gilkey, H. H. 1957. Weeds of the Pacific North-west. Oregon State College, Oregon. P. 185.
- [5] Baladehi., M et all. 2013. Pollen morphology of Iranian species of Anemone L. & Pulsatilla Mill. (*Ranunculaceae*) and its implications, Acta Botanica Gallica: Botany Letters, Vol. 160. No. 1. pp. 19–26.
- [6] Radford Harry E., Ahles C., Ritchie Bell.1968. Manual of the Vascular Flora of congress catalog card N° 68, P 28, 62, 64.
- [7] Harper, J. L, 1977. Population biology of plants. Academic Press, London, U.K. P. 892.
- [8] Kebieche. M., 2009. Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.P26.
- [9] Gerard D., Camille T., 2003. Les plantes bio-indicatrices : guide de diagnostic des sols, édition promoteur, Paris, P. 200.
- [10] Holm L., Doll J., Holm E., Pancho J. H., 1997. World weeds – Natural Histories and description. John Wiley and sons, Inc. Toronto. Canada. P.58-87.
- [11] Sarukhan J., 1976. On relative pressures and energy allocation in population of *Ranunculus repens*, *R.bulbosus* and *R. acris*, Ann. Missouri Bot. Garden 62: 7-20.
- [12] Pierre L., 2000. Le savoir des plantes, Ellipses édition. Marketing, Paris cedex 15, P. 44.



- [13] Bouchouka. E., 2016. Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse de doctorat. Université badji mokhtar –Annaba. P20-21.
- [14] Ghnimi. W., 2015. Etude phytochimique des extraits de deux *Euphorbiacées* : *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase. Thèse de doctorat. Université de lorraine (France) et Université de Carthage (Tunisie). P27.
- [15] Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. La Voisier, Paris. 5ème édition. P250.
- [16] Kone. K., Patrick Franck Olivier.2018. Application des techniques de chromatographie et de spectroscopie dans l'identification des métabolites secondaires de trois plantes antidiabétiques et antihypertensives de la pharmacopée ivoirienne. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique. P19.
- [17] Saffidine. K., 2015. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif. P5-7.
- [18] Abderrahim. E., 2011. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. P6.
- [19] Harkati. B., 2011. Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille *asteraceae*: *scorzonera undulata*. Thèse de Doctorat. Université Mentouri- Constantine. P 23-24.
- [20] Heller W., and Forkmann G. 1993: Biosynthesis of Flavonoids. In The Flavonoids: Advances in research since 1986. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall.
- [21] Christophe, P. & Christophe S. 2011. Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. Edition Springer, P84.
- [22] Hadjila. A., 2016, Etude de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'extrait de *Salvia officinalis* (*Sauge*). Thèse de doctorat .Université de Tlemcen. P18.
- [23] Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S., 2004. Possible functions of extracellular

peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species.

Phytochem. Rev. 3 :173-193.

[24] Piquet M., et Hébuterne X., 2007. Nutrition en pathologie digestive ; Ed : doin ; P16,20.

[25] Koechlin-Ramonatxo C., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition clinique et métabolisme. 20 : 165–177.

[26] Favier A., 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr. 64: 390-396.

[27] Boubekri. C., 2014. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider – Biskra. P47.

[28] Labiod. R., 2015-2016. Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de doctorat. Université badji mokhtar –Annaba. P29-30.

[29] Bounihi. A., 2016. Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (*Lamiacées*). Thèse de doctorat. Université Mohammed v rabat. P72.

[30]OMS, Santé publique France mars 2017.

[31] Breche P.,Gaillard J., Simonet M. 1989.Bactériologie. Les bactéries des infections humaines. 1ere éd. éd. Flammarion. Paris.

[32] Hnich. H., 2017. La résistance bactérienne : mécanismes et méthodes de détection au laboratoire. Doctorat en médecine. Faculté de médecine et pharmacie royaume du Maroc. P16.

[33] Sahli. R., 2017. Etude phytochimique de quelques plantes Extremophiles Tunisiennes et exploitation de leurs activités biologiques. Thèse de doctorat. Université Lille 2, P25.

[34]N. E. Hammer, 1965. NACE Glossary of Corrosion Terms, Mat. Pro, vol. 4, no. 1, pp. 79.

[35]D. Landolt, Traité des matériaux, 1993. Corrosion et chimie de surfaces des métaux, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, vol. 12, pp. 553.

- [36]P. K., 1996. Whitcraft, Fundamentals of metallic corrosion, Corrosion technology-New York and Basel, vol. 11, pp. 1-22.
- [37]M. Pourbaix., 2012.Lectures on electrochemical corrosion, pp. 336: Springer Science & Business Media.
- [38]D. D. N. Singh, R. S. Chaudhary, B. Prakash et al.1979. Inhibitive efficiency of some substituted thioureas for the corrosion of aluminium in nitric acid, *Br. Corros. J.*, vol. 14, no. 4, pp. 235-239.
- [39]J. Berer, A. Michel, J. Philibert et all. 1984 *Métallurgie générale*, 2ème édition, Ed, masson, 1984, Paris. PP. 389.
- [40] Fiaud, C., lemaitre, C., et pebere, N. 2002. Inhibiteurs de corrosion. Techniques de l'ingénieur, P14.
- [41] Bruneton J., 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales. Lavoisier Technique & Documentation, 4ème édition. Paris.
- [42] sabri. F., et all. 2012. Phytochemical screening and identification of some compounds from Mallow, *Scholars Research Library*, 2(4) : 512-516.
- [43] Sudha J., et all. 2013. secondary metabolite variation i, some species of sencio L. from nepal himalaya. *The pharma innovation-journal*, , 2277-769.
- [44] Fatine. B., et all. 2017. screening phytochimique d'Arbutus unedo L. ; 5(3): 237-245. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*.
- [45] N. Savithamma, M. Linga Rao et D. , 2011. Suhrulatha, Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites, *Middle-East Journal of Scientific Research* 8 (3): 579-584.
- [46] Akharaiyi F., C., B., 2010.Antibacterial and Phytochemical Evaluation of Three Medicinal Plants, *Journal of Natural Products*, Vol. 3(2010):27-34.
- [47] N'guessan. K., et all., 2009 ; Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou , *Sciences & Nature* Vol. 6 N°1 : 1 – 15.
- [48] Senhaji O et all. 2005. Etude de l'activité antifongique de divers extraits de gingembre .*J. Mycologie Med.* 220-229.

[49] Li Hua-Bin, et all., 2007 ; Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae, *Food Chemistry*, 771-776.

[50] Ribéreau-Gayon P. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod Paris, P254.

[51] Quettier-deleu, C., 2000. Phenolic compound and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.* 72, 35-42.

[52] Takao T., Kitatani F., et all., 1994. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosc, Biotech, Biochem.* 58(10): 1780-1783.

[53] Burits M., Bucar F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research.* 14: 323-328. Evaluation of Three Medicinal Plants, *Journal of Natural Products*, Vol. 3(2010):27-34.

[54] Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol*, 86:345-391.

[55] Jayanthi, P. et Lalitha, P. 2011. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhorniacrassipes* (Mart.) Solms. *Int J Pharm Pharm Sci.* 3 (3): 126-128.

[56] Oyaizu, M., 1986. Studies on of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315.

[57] Chen, J. H., et Ho, C. T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acids and its related hydrocinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2374-2378.

[58] Re, R., pellegrini, N., et all., 1999 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation de colorization assay. *Free radical bio Med c* 26:1231-1237.

[59] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1997. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test, VIth ed. Wayne, PA: Approved Standard, M2-A6.

[60] Pacquentin.W. 2011. Contribution à l'étude des propriétés physico-chimique de la surface modifiée par traitement laser. Application à l'amélioration de la résistance à la corrosion localisée des aciers inoxydables. Thèse de doctorat. Université de bourgogne. P8.

[61] Lefahal. M., 2014. Etude phytochimique, biologique et activité anticorrosion de trois plantes médicinales algériennes appartenant aux familles *plumbaginaceae*, *tamaricaceae* et *apiaceae*. Thèse de doctorat. Université de Constantine 1. P118.

[62] Lebrini, M., 2005. Synthèses et études physicochimiques de nouveaux thiadiazoles inhibiteurs de corrosion de l'acier en milieu acide. Thèse de doctorat. Université de Lille 1.

[63] Kaya et al., 2010. Antioxidant and antibacterial activities of *ranunculus marginatus* var. *Turk J Biol.* 34,139-146.

[64] Hachelaf. A., 2015. Antioxidant and antibacterial activities of oil extracted from *ranunculus arvensis* L. *Der pharmaceutica* 7(9) ; 170-173.

RESUME

Dans notre recherche sur les composés antioxydants naturels, antibactérienne, et anticorrosion, notre étude a été axée sur l'activité biologique des flavonoïdes de *Ranunculus repens* L., en déterminant leur efficacité contre les radicaux libres, la croissance bactérienne et la corrosion. Le dosage de trois extraits de RRL : acétate d'éthyle, n-butanol et chloroforme, la teneur des flavonoïdes et de polyphénols totaux. Les résultats obtenus montrent que l'extrait acétate d'éthyle contient la quantité la plus élevées en flavonoïdes et en polyphénols 5.98046 mg EQ/mg d'extrait et de 0.73002 mg EAG/mg d'extrait respectivement. Aussi, notre étude effectuée sur les souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, a montré l'effet antibactérien de deux extraits sur la souche *Staphylococcus aureus*. Ces extraits n'ont montré aucune activité contre l'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les trois extraits montrent un effet antioxydant et antiradicalaire très important, aussi une activité anticorrosive importante (l'ajout de l'extrait d'acétate d'éthyle ou butanolique au un milieu corrosive provoque une diminution de la densité du courant de corrosion. **Mots clés :** Antioxydants, antibactérienne, corrosion, flavonoïdes, polyphénols, radicaux libres.

ABSTRACT

In our research on natural antioxidant compounds, anti-bacterial and anti-corrosion activity, our study was centered on the biological activity of *Ranunculus ripens* L flavonoids, while determining their effectiveness against free radicals, bacterial growth and corrosion. The dosing of three extracts of RRL: ethyl acetate, n-butanol and chloroform us enabled to identify the content of flavonoids and total polyphenols. The results obtained show that the ethyl acetate extract contains the highest amount of flavonoids and polyphenols 5.980 mg E Q /mg extract and 0.730 mg EAG /mg extract respectively. In addition, our study performed on the bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, showed the antibacterial effect of two extracts on the strain *Staphylococcus aureus*. These extracts showed no activity against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The three extracts show a very important antioxidant and antiradical effect a significant anticorrosive activity (the addition of the ethyl acetate or butanol extract to a corrosive medium causes a decrease in the density of the corrosion current.

Key words: antioxidant, antibacterial, corrosion, flavonoids, polyphenols, free radicals.

ملخص

في بحثنا عن المركبات الطبيعية المضادة للأكسدة للمضادة للبكتيريا وكذلك المضادة للتآكل تمحورت دراستنا على تقييم النشاط البيولوجي لفلافونويدات نبات زحف الحوذان بتحديد فعاليتها ضد النمو البكتيري وأسر الجذور الحرة. ونشاطها ضد التآكل. معايرة المستخلصات الثلاثة لزحف الحوذان أسيتات الإيثيل وبيتا نول وكذلك الكلوروفورم مكننا من تحديد كمية الفلافونويدات والفينولات الكلية. النتائج المتحصل تبين ان مستخلص أسيتات الإيثيل يحتوي على أكبر كمية من البولي فينول والفلافونويد والتي تقدر ب 0.730 مل غرام مكافئة لحمض الغاليك / مغ من المستخلص و5.980 مل غرام مكافئة للكارسنين / مغ من المستخلص.

دراستنا المنجزة أيضا على السلالات البكتيرية *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* تبين تأثير المستخلصين أسيتات الإيثيل وبيتا نول على السلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus* ولم يتم تسجيل أي تأثير اخر لكل من المستخلصات الثلاثة على بقية السلالات البكتيرية الأخرى. تظهر دراسة كل من المستخلصات الثلاثة تأثيرا مهم جدا ضد الأكسدة وضد البكتيريا وأيضا نشاط مهم ضد التآكل (إضافة أسيتات الإيثيل او مستخلص البيتا نول الى وسط متآكل يسبب انخفاضا في كثافة تيار التآكل.

الكلمات المفتاحية: المضادة للأكسدة - المضادة للبكتيريا - التآكل - الفلافونويدات - بولي فينول - جذور حرة.