



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Laboratoire de Biotechnologie Végétales et Ethnobotanique

THÈSE

Présentée par

Deghima Amirouche

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

Filière : BIOLOGIE

Option : Ingénierie biochimique et biotechnologie

Thème

**Étude de la composition chimique et des activités biologiques d'une
plante Algérienne *Ranunculus macrophyllus***

Soutenue le : 28/03/2021

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme. Bachra KHETTAL	Professeur	Univ. de Béjaïa	Président
Mme. Fatiha BEDJOU	Professeur	Univ. de Béjaïa	Rapporteur
Mme. Amel BOUDJELAL	Professeur	Univ. de M'sila	Examineur
Mme. Widad SOBHI	M.C.A	Univ. de Sétif	Examineur
Mr. Tarek BENMEDDOUR	M.C.A	Univ. de Biskra	Examineur

Année Universitaire : 2020/2021

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma mère, à ma mère et encore à ma mère.

Que son esprit repose en paix.

Remerciements

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au Pr. Bedjou Fatiha qui fut pour moi une directrice de thèse attentive et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'examiner ce travail. Mme Bachra KHETTAL et Mme Widad SOBHI qui m'ont accompagné durant mon parcours magister. Mme Amel BOUDJELAL et Mr Tarek BENMEDDOUR, pour m'avoir donné de leur temps.

Mes remerciements vont également au Pr. Noelia Rosales-Conrado et Pr. María Eugenia León-González, de l'université Complutense de Madrid pour l'analyse HPLC des échantillons, et au Pr. Diana Ansorena, Pr. María Isabel Calvo et Pr. Iciar Astiasarán de l'université de Navarre pour l'étude nutritionnelle et de la bioaccessibilité. Encore une fois je remercie Pr. Amel BOUDJELAL pour l'authentification du matériel végétale.

Mes sincères remerciements au Dr. BENBACHA Faycal, chef du Laboratoire d'Anatomie Pathologique (Bordj Bou Arreridj) pour avoir fourni toutes les facilités pour la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques. Je remercie Baali Faiza pour son aide et sa contribution à la réalisation de ce travail, sans oublier le Pr. Benouadah Ali et Mr. Diafat Abdelouahab qui nous ont donné accès aux laboratoires de recherche de l'université de Bordj Bou Arreridj.

Je remercie le visage toujours souriant du département BPC (Béjaia) M^{elle} Djamila Kheraz, ainsi que Samia et Saida du laboratoire de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mon père, ma sœur Nacira, mon frère Hamza et ma belle-sœur Nabila. Leur intelligence, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Enfin, je remercie ma chère épouse pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général.

A. Deghima

Liste des tableaux

Tableau I : Diversité chimique des différentes espèces radicalaires et non radicalaires.....	5
Tableau II : Activités pharmacologiques des espèces du genre <i>Ranunculus</i>	48
Tableau III : Classification botanique de l'espèce <i>Ranunculus macrophyllus</i> Desf.	51
Tableau IV : Quantification colorimétrique des composés phénoliques et des triterpènes dans les différentes fractions des racines de <i>R. macrophyllus</i> Desf.	72
Tableau V : Activité antiradicalaire et chélation du fer des différentes fractions des racines de <i>R. macrophyllus</i> Desf.	75
Tableau VI : Corrélation de Pearson entre les activités antioxydants et les composés bioactifs	77
Tableau VII : Conditions optimisées pour l'analyse cLC-DAD et LC-MS / MS des polyphénols des racines <i>R. macrophyllus</i> Desf : résultats d'identification et de quantification.	86
Tableau VIII : Estimation colotimétrique de la teneur en métabolites secondaires des différentes fractions de <i>Ranunculus macrophyllus</i> Desf.	90
Tableau IX : Activité antiradicalaire et chélation du fer des différentes fractions des parties aériennes de <i>R. macrophyllus</i> Desf.	91
Tableau X : Etude de corrélation entre les différentes activités des fractions des parties aériennes et les composés bioactifs.....	97
Tableau XI : Polyphénols identifiés et quantifiés dans les différentes fractions de <i>R. macrophyllus</i> Desf. en utilisant cLD-DAD et LC-MS / MS.....	100
Tableau XII : Effet larvicide des fractions RM-EA et RM-B de <i>R. macrophyllus</i> Desf sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	103
Tableau XIII : Effet des fractions d'acétate d'éthyle (RM-EA) et de n-butanol (RM-B) de <i>R. macrophyllus</i> Desf à 2000 mg / kg pc sur les paramètres de la fonction hépatique et rénale des souris	105
Tableau XIV : Contenne phénoliques des fractions RM-EA et RM-B de <i>R. macrophyllus</i> Desf avant et après la digestion gastro-intestinale simulée <i>in vitro</i>	116
Tableau XV : Gain de poids corporel et poids relatif des organes pour les groupes traités, Vit C et témoins.....	124
Tableau XVI : Effet de <i>R. macrophyllus</i> Desf. Fraction butanolique sur les paramètres biochimiques sériques.	125

Liste des figures

Figure 1 : Principales cibles moléculaires et conséquences biologiques du stress oxydant. Cys : cystéine ; Pro : proline ; Thr : thréonine ; Lys : lysine ; Tyr : tyrosine ; AGPI : Acides gras polyinsaturés ; LDL: Lipoprotéines de faible densité; PARP : Poly (ADP-ribose) polymérase (Lugrin et al., 2014).	9
Figure 2 : Dualité d'effet du peroxyde d'hydrogène (Adaptée à partir de Sies, 2017)	12
Figure 3 : Etat eustress et distress oxydants (Sies, 2020).	13
Figure 4 : Mécanismes de défense cellulaires Adaptée à partir de (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).	22
Figure 5 : Processus et voies de déclenchement de la réponse inflammatoire (Chatterjee, 2016).....	23
Figure 6 : Voie inflammatoire de signalisation NF- κ B (Adapté à partir de Liu et al., 2017). IkB: Protéines inhibitrices (inhibitors of NF- κ B). TLR: Toll like receptors; IKK: IkB kinase-kinases; NIK: NF- κ B-inducing kinases. MyD88 : Myeloid differentiating factor 88.	26
Figure 7 : a. Voies inflammatoires aiguës et leur processus d'activation ; b. Classification de l'inflammation par durée et fonctions immunitaires (Arulselvan et al., 2016).	30
Figure 8 : Relation croisée entre le stress oxydant et l'inflammation (Chatterjee, 2016).	33
Figure 9 : Structure de base des composés phénoliques	35
Figure 10 : Variation structurelle des différentes classes des flavonoïdes	36
Figure 11 : Exemple de variation intra-classe des flavonols	37
Figure 12 : Structure de base et variabilité structurelle des acides phénoliques	38
Figure 13 : Structure de base de certains composés phénoliques non- flavonoïdes ; a : Chalcones ; b : Stilbènes ; c : Lignanes ; d : Tannins	40
Figure 14 : Différentes méthodes d'études de la bioaccessibilité et biodisponibilité (Santos et al., 2019)	43
Figure 15 : Différents effets de la digestion gastro-intestinale sur les polyphénols	45
Figure 16 : Photographies de <i>Ranunculus macrophyllus</i> Desf. a : Parties aériennes en pleine floraison ; b : Racines (Deghima Amirouche, 2018, Ras El Oued)	50
Figure 17 : Rendements des différentes fractions de l'extrait méthanolique de <i>R. macrophyllus</i> Desf. HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR : Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction n-butanol ; AR : Fraction aqueuse.	71
Figure 18 : Pouvoir réducteur des différentes fractions des racines de <i>R. macrophyllus</i> Desf., BHA, quercétine, acide gallique et BHT. HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR : Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction n-butanol ; AR : Fraction aqueuse ; BHA : Hydroxyanisole butylé; BHT: Hydroxytoluène butylé; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type des triplicatas, les bars avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$).	79
Figure 19 : Capacité antioxydants totale des différentes fractions des racines de <i>R. macrophyllus</i> Desf., BHA, quercétine, acide gallique et BHT. HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR : Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction n-butanol ; AR : Fraction aqueuse ; BHA : Hydroxyanisole butylé; BHT: Hydroxytoluène butylé; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique . Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type des triplicatas, les bars avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$).	81
Figure 20 : Test de blanchiment du β -carotène des racines <i>R. macrophyllus</i> Desf, (a) Cinétique du blanchiment du β -carotène pour le BHA, le BHT, l'acide gallique et le méthanol (MeOH). (b)	

Cinétique du blanchiment au β -carotène pour différentes fractions et le méthanol. (c) Inhibition du blanchiment au β -carotène après 24 h pour les fractions, les standards et le méthanol. HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR : Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction n-butanol ; AR : Fraction aqueuse ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; BHT : Hydroxytoluène butylé ; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique . Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ ET des triplicatas. Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes $p < 0,05$	83
Figure 21 : Rendements des différentes fractions de l'extrait méthanolique de <i>Ranunculus macrophyllus</i> Desf. RM-H : Fraction hexane ; RM-CH : Fraction chloroforme ; RM-EA : Fraction acétate d'éthyle ; RM-B : Fraction n-butanol ; RM-Aq : Fraction aqueuse.	88
Figure 22 : Pouvoir réducteur des différentes fractions de <i>R. macrophyllus</i> Desf et des standards. RM-H : Fraction hexane ; RM-CH : Fraction chloroforme ; RM-EA : Fraction acétate éthyle ; RM-B : Fraction butanol ; RM-Aq : Fraction aqueuse ; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique ; BHA : Hydroxyanisole butylé. Les bars avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$).....	93
Figure 23 : Capacité antioxydants totale des différentes fractions de <i>R. macrophyllus</i> Desf et des standards. RM-H : Fraction hexane ; RM-CH : Fraction chloroforme ; RM-EA : Fraction acétate éthyle ; RM-B : Fraction butanol ; RM-Aq : Fraction aqueuse ; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; BHT : Hydroxytoluène butylé. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ ET des triplicatas. Les bars avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)	94
Figure 24 : Test de blanchiment au β -carotène des parties aériennes de <i>R. macrophyllus</i> Desf, (a) Cinétique du blanchiment au β -carotène pour le BHA, le BHT, l'acide gallique (GA) et le méthanol (MeOH). (b) Cinétique du blanchiment au β -carotène pour différentes fractions, le méthanol et l'eau. (c) Inhibition du blanchiment au β -carotène après 24 h pour les fractions, les standards et le méthanol (MeOH). RM-H : fraction hexane ; RM-CH : fraction chloroforme ; RM-EA : fraction acétate éthyle ; RM-B : fraction butanol ; RM-Aq : fraction aqueuse ; GA : acide gallique ; BHA : hydroxyanisole butylé ; BHT : hydroxytoluène butylé. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ ET des triplicatas. Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,05$).	95
Figure 25 : Biplot de l'évaluation simultanée de la relation des différentes fractions et charges (activité antioxydants, triterpénoïdes totaux et polyphénols totaux et polyphénols individuels). TPC (teneur totale en polyphénols), TFC (teneur totale en flavonoïdes), FC (teneur en flavonols), TTC (teneur totale en tanins), CTC (teneur en tanins condensés), TC (teneur en triterpénoïdes), TAC (capacité antioxydants totale), $1 / DPPH\ IC_{50}$ (puissance antiradicalaire).....	101
Figure 26 : Coupes histopathologiques des foies et des reins des groupes traités et du contrôle. Hp : hépatocytes ; Hp alt : hépatocyte altéré ; Hp hpr : hépatocyte hypertrophié ; G : glomérule ; Dt : tubule distale ; CV : congestion vasculaire.....	106
Figure 27 : Activité anti-hémolyse oxydative des fractions RM-EA, RM-B de <i>R. macrophyllus</i> Desf et des différents standards. GA : Acide gallique ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; BHT : Hydroxytoluène butylé. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ ET des triplicatas. Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,05$).	107
Figure 28 : Effet des fractions d'acétate d'éthyle (RM-EA), de la fraction n-butanol (RM-B) de <i>R. macrophyllus</i> Desf et d'aspirine sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges. a: Hémolyse induite par hypotonie; b: Hémolyse induite par la chaleur. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type ($n = 3$). Pour chaque dose l'effet est comparé à l'aspirine. * : Différences statistiquement significatives par rapport à l'aspirine ($p < 0,05$).	110
Figure 29 : Effet de la fraction acétate d'éthyle (RM-EA), de la fraction n-butanol (RM-B) (200, 400, 600 mg / kg p.c) de <i>R. macrophyllus</i> Desf et de la dexaméthasone (Dexa) (1 mg / kg) sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM ($n = 7$). * indiquent des différences significatives par rapport à la dexaméthasone ($p < 0,05$).	112

Figure 30 : Effet de la digestion in vitro sur l'activité antioxydants des fractions RM-EA et RM-B de *R. macrophyllus* Desf. a : DPPH RM-EA ; b : ABTS RM-EA ; c : ORAC RM-EA; d : DPPH RM-B ; e : ABTS RM-B ; f : ORAC RM-B.119

Figure 31 Effet de la fraction butanolique de *R. macrophyllus* (RM-B) (50, 100, 200 mg / kg p.c) et de la vitamine C (100 mg / kg p.c) sur l'état redox hépatique. a: Activité de catalase. b: Taux de glutathion réduit (GSH). c: Taux de malondialdhyde (MDA). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (N = 8). Les barres avec des lettres différentes indiquent des différences significatives ($p < 0,05$).127

Figure 32 : Effet de la fraction butanolique de *R. macrophyllus* (RM-B) (50, 100 et 200 mg / kg p.c) et de la vitamine C (100 mg / kg) sur la capacité antioxydants du plasma. A: Test de piégeage des radicaux DPPH. B: Capacité de réduction ferrique du plasma (FRAP). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (N = 8). Les barres avec des lettres différentes indiquent des différences significatives (valeur $p < 0,05$).129

Liste des abréviations

AAPH: 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

ABTS: 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

ALP: Phosphatase alcaline

ALT: Alanine aminotransférase

AST: Aspartate amino transférase

BHA: Butyl hydroxyl anisole

BHT: Butyl hydroxy toluene

BSL: Brine shrimp lethality assay

CAT: Catalase

CL₅₀: Concentration létal médiane

CLR: Récepteurs de lectine de type C

COX-2: Cyclooxygénase-2

CRP: Protéine C-réactive

DAMP: Damage associated molecular pattern

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

DTNB: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid

EDTA: Ethylène diamine tétraacétique acide

GPx: Glutathion peroxydase

GRx: Glutathion réductase

GSH₂: glutathion réduit

HMGB1₂: High mobility group box 1

HOCl₂: hypochlorite

ICAM₂: Inter-Cellular Adhesion Molecule

IL-1 β ₂: l'interleukine-1-bêta

LD₅₀: dose létal médiane

LPS₂: lipopolysaccharides

MAP Kinases: Mitogen activated protein kinase

MAPK₂: Mitogen-activated protein kinases

MBP₂: protéine de liaison au mannose

MCV₂: maladies cardiovasculaires

MDA: Malondialdéhyde

MPO: Myéloperoxydase

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B: Nuclear factor kappa-B

NLR: NOD-like receptors

NO $\bullet$: Radical oxide azote

NOS: Oxyde nitrique synthases

NOX4: NADPH oxydase 4

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

O₂ $\cdot^-$: Anion superoxide

OH $\bullet$: Radical hydroxyl

ONOO $\cdot^-$: Peroxynitrit

PAMP: Pathogen associated molecular pattern

PBS: Phosphate buffered saline

PLA2: Phospholipase A2

PMN: Poly morpho nucléaire

PRR: Pattern recognition receptors

RBC: Globules rouges

RLR: RIG-I-like receptors

RONS: Radical oxygen and Nitrogen species

ROS: Reactive oxygen species

SOD: Superoxyde dismutase

TAC: Capacité antioxydants totaux

TBA: Thiobarbituric acid

TCA: Trichloroacetic acid

TEA: Trietanol amine

TFA: Acide trifluoroacétique

TLR: Toll-like receptors

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TXN: Thiorédoxine

VCAM: vascular cell adhesion molecule

XO: Xanthine oxydase

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures	ii
Liste des abréviations.....	iii
Introduction	1
1. Stress oxydant	4
1.1. Radicaux libres.....	4
1.1.1. Radicaux primaires	4
1.1.2. Radicaux secondaires	7
1.1.3. Sources exogènes des radicaux libres.....	8
1.1.4. Cibles moléculaires des radicaux libres	8
1.1.5. Notion de stress oxydant	11
1.1.6. Stress oxydant et physiopathologies humaines	13
1.1.7. Mécanismes de défenses cellulaires.....	14
1.1.7.1. Mécanismes de défense directe.....	14
1.1.7.2. Mécanismes de défense indirecte.....	19
1.1.7.3. Antioxydants exogènes.....	20
1.2. Inflammation.....	22
1.2.1. Définition	22
1.2.2. Mécanismes de l'inflammation.....	23
1.2.3. Classification de l'inflammation	29
1.2.3.1. Inflammation aiguë.....	30
1.2.3.2. Inflammation chronique.....	31
1.2.4. Pathologies inflammatoires	32
1.2.5. Interrelation inflammation-stress oxydant	32
1.3. Polyphénols.....	35
1.3.1. Classification.....	35
1.3.1.1. Flavonoïdes	36
1.3.1.2. Polyphénols non-Flavonoïdes	37
1.3.2. Polyphénols et santé humaine	40
1.3.3. Biodisponibilité et bioaccessibilité des polyphénols	41
1.3.3.1. Biodisponibilité	42
1.3.3.2. Bioaccessibilité	42
1.3.3.3. Modèle statique de digestion <i>in vitro</i>	43

1.3.3.4. Bio accessibilité et la biodisponibilité des composés phénoliques.....	44
1.4. Matériel végétal étudié.....	46
1.4.1. Généralité sur les Ranunculacées.....	46
1.4.2. Le genre <i>Ranunculus</i>	46
1.4.2.1. Généralités.....	46
1.4.2.2. Usage traditionnel des <i>Ranunculus</i>	47
1.4.2.3. Activités pharmacologiques	48
1.4.2.4. Composition chimique.....	49
1.4.3. <i>Ranunculus macrophyllus</i> (Bouton d'or à grande feuille)	49
1.4.3.1. Usage traditionnel de <i>Ranunculus macrophyllus</i> Desf.	50
2. Matériels et méthodes	52
2.1. Matériels.....	52
2.1.1. Matériel végétal.....	52
2.1.2. Animaux	52
2.2. Méthodes	53
2.2.1. Extraction et fractionnement.....	53
2.2.2. Etude phytochimique	53
2.2.2.1. Composés phénoliques totaux (TPC).....	53
2.2.2.2. Flavonoïdes totaux (TFC).....	53
2.2.2.3. Tanins totaux (TTC).....	54
2.2.2.4. Flavonols totaux (FOL)	54
2.2.2.5. Tanins condensés (CTC)	54
2.2.2.6. Triterpinoides totaux (TC).....	55
2.2.2.7. Analyse chromatographique des composés phénoliques	55
2.2.3. Activité antioxydants <i>in vitro</i>	58
2.2.3.1. Inhibition du radical libre DPPH [•]	58
2.2.3.2. Inhibition du radical libre ABTS ^{•+}	58
2.2.3.3. Inhibition du radical peroxyde d'hydrogène	59
2.2.3.4. Pouvoir réducteur.....	59
2.2.3.5. Chélation de fer	60
2.2.3.6. Capacité antioxydants totale.....	60
2.2.3.7. Test de blanchiment du β -carotène.....	61
2.2.3.8. Hémolyse oxydative	61
2.2.4. Etude toxicologique	62
2.2.4.1 Effet larvicide sur <i>Artemia salina</i> (BSL).....	62
2.2.4.2. Toxicité aigue.....	63

2.2.5. Activité anti-inflammatoire.....	64
2.2.5.1. Stabilisation membranaire.....	64
2.2.5.2. Œdème auriculaire induit par le xylène.....	65
2.2.6. Bioaccessibilité gastro-intestinale <i>in vitro</i>	65
2.2.6.1. Digestion gastro-intestinale <i>in vitro</i>	65
2.2.6.2. Capacité d'absorption des radicaux d'oxygène (ORAC).....	67
2.2.7. Innocuité à moyen-terme.....	67
2.2.7.1. Concept expérimental.....	67
2.2.7.2. Inhibition du radical DPPH' <i>in vivo</i>	68
2.2.7.3. Pouvoir réducteur du plasma (FRAP).....	68
2.2.7.4. Estimation de la catalase (CAT).....	69
2.2.7.5. Estimation du glutathion réduit (GSH).....	69
2.2.7.6 Estimation de la peroxydation lipidique (MDA).....	69
2.3. Analyses statistiques.....	70
3. Résultats et discussion.....	71
3.1. Fractionnement bio-guidé des racines.....	71
3.1.1. Rendement d'extraction et de fractionnement des racines.....	71
3.1.3. Activité antioxydants <i>in vitro</i> (Racines).....	74
3.1.3.1. Inhibition des radicaux libres.....	74
3.1.3.2. Chélation du fer.....	78
3.1.3.3 Pouvoir réducteur.....	78
3.1.3.4. Capacité antioxydants totale.....	80
3.1.3.5. Test de blanchiment du β -carotène.....	82
3.1.4. Analyse cLC-DAD et LC-MS / MS des composés phénoliques des racines.....	84
3.2. Fractionnement bio-guidé des parties aériennes.....	88
3.2.1. Rendements d'extraction et de fractionnement.....	88
3.2.2. Colorimétrie des composés bioactifs.....	89
3.2.3. Activité antioxydants <i>in vitro</i>	91
3.2.3.1. Inhibition des radicaux libres.....	91
3.2.3.2. Chélation du fer.....	92
3.2.3.3. Pouvoir réducteur.....	93
3.2.3.4. Capacité antioxydants totale.....	94
3.2.3.5. Test de blanchiment du β -carotène.....	95
3.2.3.6. Etude de Corrélation.....	96
3.2.4. Analyse cLC-DAD et LC-MS / MS des composés phénoliques.....	98
3.2.5. Analyse des composantes principales.....	100

3.3. Etudes toxicologiques.....	102
3.3.1 Effet larvicide.....	102
3.3.2. Toxicité aigue.....	103
3.4. Hémolyse oxydative.....	107
3.5. Activité anti-inflammatoire.....	109
3.5.1. Stabilisation membranaire.....	109
3.5.2. Œdème de l'oreille induit par le xylène	111
3.6. Bioaccessibilité des Fractions RM-EA et RM-B.....	114
3.6.1. Teneur en polyphénols	114
3.6.2. Activité antioxydants.....	118
3.7. Innocuité de la fraction RM-B.....	122
3.7.1. Observations <i>in vivo</i>	123
3.7.2. Pathologie clinique	124
3.7.3. État redox hépatique	126
3.7.4. Capacité antioxydants du plasma	128

Introduction

Introduction

La prise de conscience des consommateurs de l'effet des aliments sur la santé humaine a conduit à un intérêt accru pour l'aspect santé des aliments, en plus de leurs propriétés nutritionnelles et sensorielles de base **(Tomas-Barberán and Osorio, 2019)**. Les régimes riches en fruits et légumes peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine **(Carregosa et al., 2020)**, l'adhésion à de tels régimes peut prévenir entre 10% et 70% des décès par cancer **(Mojzer et al., 2016)**. Les légumes non-cultivés sont une ressource vitale pour les humains dans le monde entier, ils gagnent en popularité en tant qu'alternative aux légumes cultivés comme source importante de nouvelles saveurs et textures **(Harumi Iyda et al., 2019)**. Leur consommation devient à la mode principalement pour leurs bienfaits pour la santé humaine **(Spínola et al., 2019)**. On estime que plus d'un milliard de personnes dans le monde ont déjà incorporé des légumes non-cultivés dans leur alimentation quotidienne **(Shaheen et al., 2017)**. Les effets bénéfiques pour la santé de ces légumes sont principalement liés à la présence de polyphénols et à leurs bioactivités associées telles que les effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-carcinogènes, antimicrobiens, antiviraux et cardioprotecteurs **(Barros and Junior, 2019)**. En plus de la prévention des maladies, les polyphénols affectent également la propagation et la progression des maladies et contribuent même au processus de guérison **(Mojzer et al., 2016)**. Cependant, la manifestation de ces activités nécessite un apport quotidien régulier et une bonne bioaccessibilité des polyphénols **(Mrduljaš et al., 2017)**. Ainsi, la bioaccessibilité des composés bioactifs doit être étudiée afin de démontrer leur effet bénéfique pour la santé lorsqu'une plante est consommée **(Barak et al., 2019)**. Avec leurs constituants nutritionnels et bioactifs, les plantes « sauvages » comestibles offrent de grandes opportunités pour développer de nouveaux aliments fonctionnels, contribuant ainsi à la croissance du marché des aliments fonctionnels, qui

devrait atteindre plus de 200 milliards de dollars US d'ici 2025 (**Tomas-Barberán and Osorio, 2019**).

Ranunculus est un très grand genre de la famille des Ranunculaceae, avec plus de 600 espèces (**Aslam et al., 2012**) qu'on trouve dans le monde entier et en particulier dans les régions tempérées Méditerranéennes. De nombreuses espèces de ce genre ont une importance économique vue leur utilisation comme aliments traditionnels dans les régions Méditerranéennes (*Ranunculus repens* et *Ranunculus ficaria*) (**Guarrera and Savo, 2016**). Cependant, l'utilisation principale des espèces *Ranunculus* reste pour leurs propriétés médicinales, qui comprennent des activités antioxydants, antidiabétiques, anti-inflammatoires, hépato protectrices et anticancéreuses (**Aslam, 2012**). Plusieurs études ont lié ces activités aux composés phénoliques produits par ces espèces tels que l'acide caféique, le kaempférol, la myricétine, la rutine et la quercétine (**Kaya et al., 2010; Bhatti et al., 2015**).

L'une des espèces du genre *Ranunculus* les moins étudiées est *Ranunculus macrophyllus* Desf. Les racines de cette plante sont une source riche de composés phénoliques bioactifs, elles sont couramment disponibles sur les marchés d'Afrique du Nord (Algérie, Maroc et Tunisie) comme remède contre l'infertilité féminine et pour le gain du poids (**Ouarghidi et al., 2013**). En revanche, les parties vertes (feuilles et tiges), sont traditionnellement utilisées pour leurs propriétés médicinales pour traiter certaines maladies de la peau (**Rai et al., 2011**), et comme aliment traditionnel dans les régions Méditerranéennes (**Rivera et al., 2006**). Malgré la disponibilité et l'utilisation largement répandue des racines, l'utilisation des parties vertes de *R. macrophyllus* Desf. reste très limitée et la plupart sont simplement gaspillés. Fournir des données scientifiques sur leur profil phénolique et leurs bioactivités conduira à leur valorisation et encouragera leur application dans les industries pharmaceutiques, médicinales et nutraceutiques sous forme de nouveaux produits fonctionnels.

Dans ce contexte, s'inscrit le but de notre travail qui vise à valoriser la plante *R. macrophyllus* Desf. (Racine et partie aériennes) à la fois sur le plan pharmacologique et écologique. Trois grands axes ont été abordés au cours de la réalisation de ce travail :

- Dans une première partie, un fractionnement bio-guidé a été réalisé sur différentes extraits obtenus des racines et des parties aériennes de *R. macrophyllus* Desf.
- Dans une deuxième partie, une étude a été menée pour déterminer la toxicité ainsi que les activités biologiques des fractions sélectionnées.
- Dans la troisième partie, une étude de l'innocuité à moyen terme et la capacité des fractions à améliorer le pouvoir antioxydants du plasma et des hépatocytes a été étudiée à l'aide de modèle *in vivo*.

Chapitre I :

Rappels Bibliographiques

1. Stress oxydant

1.1. Radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être définis comme toutes molécules possédant un électron non apparié sur leur orbitale externe, cette propriété leur confère une haute réactivité vis-à-vis des autres molécules dans l'organisme. Ils peuvent les oxyder en leur arrachant un électron ou dans certains cas, les réduire en leur cédant leur propre électron (**Adwas et al., 2019**). Ils possèdent une demi-vie très courte (10^{-6} sec). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives du nitrogène (RNS) décrivent les espèces radicalaires et non-radicalaires dérivant de l'oxygène et du nitrogène, respectivement, l'ensemble est décrit comme (RONS). Les radicaux libres peuvent être classés selon l'ordre dans lequel ils sont générés et selon leur réactivité en radicaux primaires et secondaires (**Kruk et al., 2019**). Les différents types d'espèces réactives et leurs diversités chimiques sont représentés dans le **tableau I**.

1.1.1. Radicaux primaires

Les radicaux primaires sont générés à partir des processus physiologiques comme la respiration, leurs concentrations sont maintenues sous contrôle et ils sont sélectivement réactifs. Dans les conditions physiologiques ils jouent entre autres un rôle très important dans la signalisation cellulaire en tant que seconds messagers. Cette catégorie inclue l'anion superoxyde, l'oxyde nitrique et le peroxyde d'hydrogène. Dans une cellule, la mitochondrie est la principale source de radicaux libres. Ces derniers sont générés durant le transport d'oxygène dans la chaîne respiratoire qui consomme près de 90 % de l'oxygène d'une cellule (**Tan et al., 2018**).

Tableau I : Diversité chimique des différentes espèces radicalaires et non radicalaires (Sies, 2017).

Radicaux libres	Espèces non radicalaires
Espèces réactives de l'oxygène	
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$)	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
Radicaux hydroxyles ($OH^{\cdot}$)	Hydroperoxyde organique ($ROOH$)
Radicaux peroxyde ($ROO^{\cdot}$)	Oxygène moléculaire singulet (O_2)
Radicaux alcoxyde ($RO^{\cdot}$)	Ozone (O_3)
Espèces réactives du chlore / brome	
Chlore atomique ($Cl^{\cdot}$)	Hypochlorite (OCl^-)
Brome atomique ($Br^{\cdot}$)	Chloramines ($RNHCl$)
Espèces réactives de l'azote	
Dioxyde d'azote ($NO_2^{\cdot}$)	Anion nitroxyde (NO^-)
Oxyde nitrique = monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$)	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
Espèces réactives du soufre	
Radical thiyle ($RS^{\cdot}$)	Thiol (RSH), thiolate (RS^-) [par exemple, glutathion (GSH), thiorédoxine (Trx)] Disulfure ($RSSR$) [par exemple, $GSSG$, disulfure mixte (protéine SSG)]

a. Anion superoxyde

Le radical anion superoxyde est un radical primaire qui constitue la forme la plus répandue des ROS, entre 0.1 et 0.5 % de l'oxygène inhalé est converti en anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) dans les conditions physiologiques. Il peut être formé par processus enzymatique, réaction d'auto-oxydation ou par des réactions de transfert d'électrons non enzymatiques dans lesquels un

électron est transféré à l'oxygène moléculaire. Il est principalement produit dans les mitochondries et sa réactivité avec les biomolécules est faible. Parmi les enzymes qui peuvent le produire on trouve : la xanthine oxydase, la lipoxygénase, la cyclooxygénase et les oxydases NADPH dépendante. Plusieurs molécules telles que les nucléotides flavines, l'adrénaline, les composés thiol, le glucose, etc. peuvent être oxydées en présence d'oxygène pour générer du superoxyde et ces réactions sont fortement accélérées par la présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre. De plus, les cellules phagocytaires lors de l'explosion respiratoire (Respiratory burst) peuvent aussi générer du superoxyde (Phaniendra et al., 2015).

b. Oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO[•]) est produit à partir de la l-arginine par trois principales isoformes de l'oxyde nitrique synthase (NOS) : NOS épithéliales, liées à la vasodilatation et à la régulation vasculaire, NOS neuronales, liées à la signalisation intracellulaire, et NOS inducibles, activées en réponse à divers signaux d'endotoxines ou de cytokines (Liguori et al., 2018). Les actions de ce radical dépendent de sa concentration dans le milieu, il peut à la fois endommager l'ADN ou le protéger contre la dégradation, inhiber la prolifération des cellules endothéliales humaines ou la stimuler, il peut induire la mort cellulaire ou supprimer l'apoptose (Kruk et al., 2019).

c. Peroxyde d'hydrogène

Les mitochondries ont été identifiées comme la source majeure du H₂O₂, principalement via la dismutation du radical anion superoxyde. Plus de 30 enzymes cellulaires productrices de H₂O₂ ont été identifiées (Sies, 2019). Bien qu'il ne soit pas un radical libre, le H₂O₂ peut toujours endommager la cellule à une concentration relativement faible (10 µM), mais à des niveaux plus élevés, les enzymes productrices d'énergie cellulaire telles que la

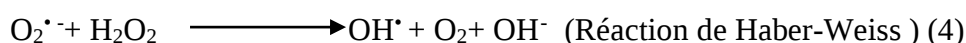
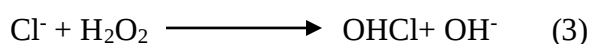
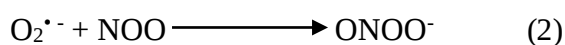
glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase sont inactivées. Il peut facilement pénétrer les membranes biologiques (**Phaniendra et al., 2015**).

1.1.2. Radicaux secondaires

Ces radicaux sont produits par plusieurs réactions qui impliquent les radicaux primaires et les métaux de transitions, comme la réaction de Fenton. Ce groupe inclue le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) (Equation 1, Equation 4), le radical peroxynitrite (ONOO^-) (Equation 2) et le radical Hypochlorite (HOCl) (Equation 3). Ils sont considérés comme plus dangereux que les radicaux primaires, car caractérisés par une réactivité plus élevée et non sélective envers les biomolécules avoisinantes (**Kruk et al., 2019**).



Ou « Me » peut être du fer ou du cuivre (**Réaction 2 Figure 4**)



Le radical hydroxyle peut fortement réagir avec les molécules organiques et inorganiques, y compris l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides et causer de graves dommages aux cellules plus que tout autre ROS. L'espèce ONOO^- provoque des dommages oxydatifs à l'ADN par nitration de ses bases, jouant un rôle clé dans l'inflammation chronique. L'acide hypochlorique (HOCl) est un oxydant majeur produit par les neutrophiles activés sur le site de l'inflammation, c'est une espèce fortement réactive impliquée dans l'oxydation et réactions de chloration. Il peut oxyder les thiols et d'autres molécules biologiques, notamment l'ascorbate, l'urate et le tryptophane (**Ozcan and Ogun, 2015**).

1.1.3. Sources exogènes des radicaux libres

La totalité des influences extérieures est désigné comme l'exposome, il comprend un large éventail de défis oxydatifs. Ceux-ci peuvent être des oxydants directs tels que la fumée de cigarette ou la pollution de l'environnement ou les rayonnements ionisants ou solaires (UV, visible, IRA-A), les médicaments et leurs métabolites (cyclosporine, tacrolimus, gentamycine et bléomycine), les solvants chimiques, les métaux lourds (Cd, Hg, Pb, Fe et As) ou par une exposition plus subtile comme en nutrition (viande fumée, huile usagée, la graisse et l'alcool). Lorsque ces composés exogènes pénètrent dans le corps, ils sont dégradés ou métabolisés et les radicaux libres sont générés comme produits secondaires (**Pizzino et al., 2017 ; Sies, 2019**).

1.1.4. Cibles moléculaires des radicaux libres

a. Lipides

Toutes les membranes cellulaires sont généralement vulnérables aux dommages oxydatifs car elles sont très riches en acides gras insaturés. Les dommages lipidiques dus aux ROS, communément appelés peroxydation lipidique, se produisent en trois étapes. L'initiation, implique l'attaque d'un ROS capable d'extraire un atome d'hydrogène d'un groupe méthylène dans un lipide. Dans la propagation, la réaction en chaîne commence et le radical acide gras réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxy ($\text{ROO}^{\bullet}$), capable lui-même d'attaquer un autre acide gras voisin (**Engwa, 2018**). Le réarrangement moléculaire de ce dernier mène à la formation du malondialdéhyde (MDA) (Marqueur détectable de l'oxydation lipidique) et de composés diènes conjugués, qui sont connus pour être cytotoxiques et mutagènes (**Pizzino et al., 2017**). La peroxydation lipidique endommage ainsi les membranes cellulaires et les lipoprotéines entraînant la perte de la fonction membranaire, par exemple, diminution de la fluidité, inactivation des enzymes et des récepteurs membranaires (**Phaniendra et al., 2015**).

La dernière étape, la terminaison de la chaîne, survient à la suite de l'interaction d'un $\text{ROO}^\bullet$ avec un autre radical ou des antioxydants (**Figure 1**) (Engwa, 2018).

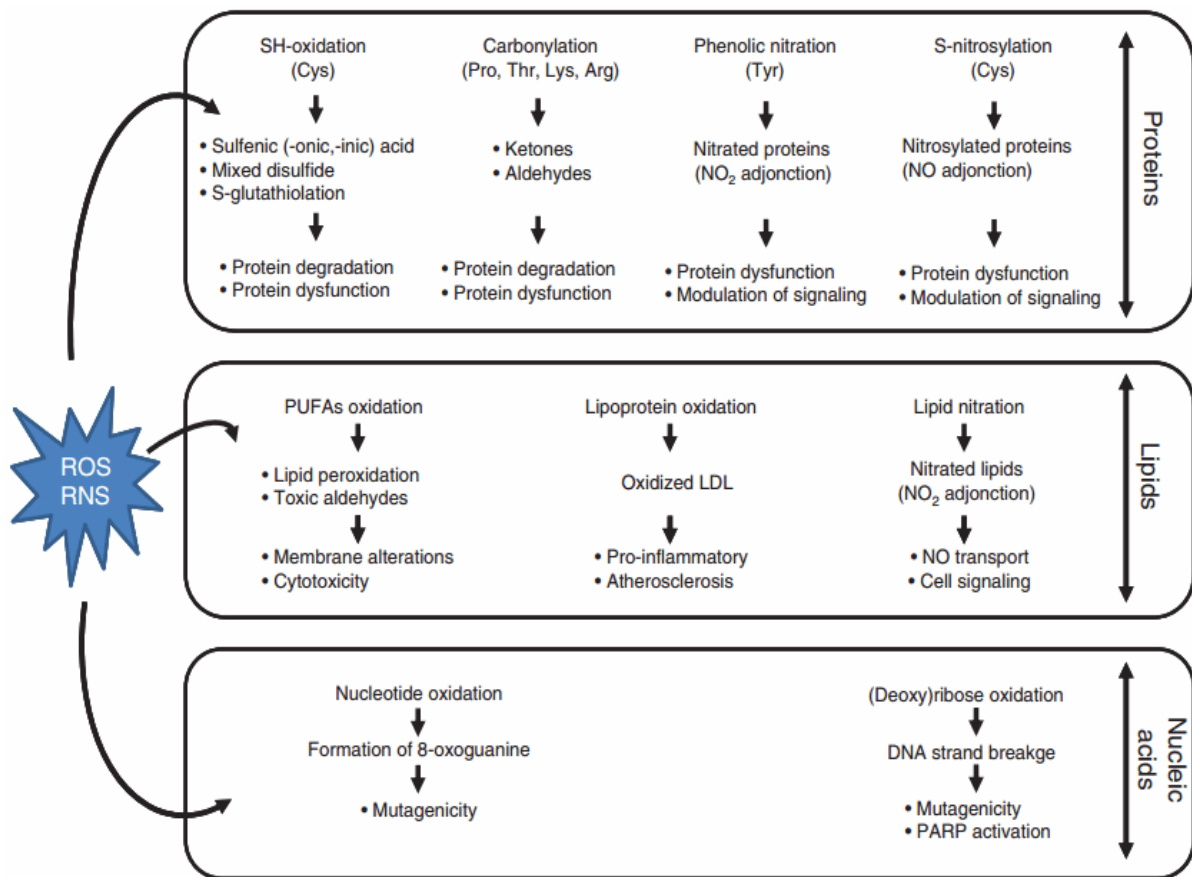


Figure 1 : Principales cibles moléculaires et conséquences biologiques du stress oxydant. Cys : cystéine ; Pro : proline ; Thr : thréonine ; Lys : lysine ; Tyr : tyrosine ; AGPI : Acides gras polyinsaturés ; LDL: Lipoprotéines de faible densité; PARP : Poly (ADP-ribose) polymérase (Lugrin et al., 2014).

b. Protéines

Les protéines sont des cibles majeures pour l'attaque des ROS, principalement par les radicaux $\text{OH}^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$ et les espèces réactives d'azote. Les radicaux peroxydes d'hydrogène et superoxyde ont de faibles effets sur les protéines, sauf pour les protéines contenant des groupes SH. Les conséquences des dommages aux protéines comprennent la perte de l'activité enzymatique et des fonctions cellulaires altérées (Liguori et al., 2018). L'oxydation de la tyrosine par $\text{ONOO}^\bullet$ et d'autres radicaux réactifs du nitrogène conduit à la formation de 3-nitrotyrosine qui est un marqueur détectable de l'oxydation des protéines. L'oxydation de la

proline et du glutamate par les radicaux $\text{OH}^\bullet$ conduit généralement à la formation d'hydroxyproline et de glutamyl semi-aldéhyde. Après l'oxydation, les protéines sont sensibles à de nombreux changements dans leur fonction, notamment l'inactivation, la fragmentation chimique et une dégradation protéolytique accrue (**Gebicki, 2016 ; Engwa, 2018**). Les lipoprotéines (LDL) sont les principaux transporteurs du cholestérol vers les tissus corporels. L'oxydation des LDL est un processus complexe au cours duquel les protéines et les lipides subissent des changements oxydatifs qui peuvent provoquer une accumulation de cholestérol (**Figure 1**) (**Liguori et al., 2018**).

c. Acides nucléiques

Bien que l'ADN soit une molécule stable, les ROS peuvent interagir avec elle pour causer plusieurs types de dégâts, notamment des ruptures d'ADN double et simple brin, la modification des bases d'ADN, la perte de purines (sites apuriques), dommages au sucre désoxyribose et dommages au système de réparation de l'ADN (**Sies et al., 2017**). Le radical hydroxyle est le ROS le plus dévastateur qui affecte les acides nucléiques. Ce radical peut attaquer la guanine et l'adénine pour donner des produits d'oxydation, 8 - hydroxydeoxyguanosine et hydroxyadénine, respectivement. En outre, les radicaux hydroxyles peuvent attaquer les pyrimidines conduisant à la formation de peroxyde de thymine, de glycols de thymine, de 5- (hydroxyméthyl) uracyle et d'autres produits similaires (**Phaniendra et al., 2015**). Ces modifications des bases ont été directement liées à plusieurs états pathologiques tels que des mutations génétiques, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer et le processus de vieillissement (**Moussa et al., 2019**). Les ROS tels que $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 n'ont pas d'interaction directe avec l'ADN et n'entraînent donc pas de dommages à leurs concentrations physiologiques. Les métaux de transition tels que le fer qui ont une affinité de liaison élevée pour les sites d'ADN peuvent catalyser la production d' $\text{OH}^\bullet$ qui à son tour attaque l'ADN (**Figure 1**) (**Engwa, 2018**).

L'ARN peut aussi subir l'oxydation, avec des implications dans plusieurs processus pathologiques. Les micro ARN sont des ARN non codants, d'environ 18 à 25 nucléotides de longueur, qui se lient aux ARNm cibles et affectent la dégradation de l'ARNm ou inhibent la traduction des protéines. L'attaque radicalaire sur ces micro ARN peut conduire à l'apoptose ou à l'altération de la production de superoxyde mitochondrial (**Sies et al., 2017**).

1.1.5. Notion de stress oxydant

Le maintien de l'équilibre redox est essentiel pour la viabilité cellulaire, l'activation, la prolifération et la fonction des organes. Les organismes aérobies ont des systèmes antioxydants intégrés qui assurent le contrôle étroit des concentrations des RONS (**Briben et al., 2012**). La surproduction des radicaux libres et/ou l'incapacité du système de défense cellulaire à contrôler la concentration des radicaux libres induit un état de stress oxydatif, défini pour longtemps comme étant un déséquilibre entre les RONS (oxydants) et le système de défense cellulaire (antioxydants) en faveur des oxydants (**Sies, 1985**). Les effets des radicaux libres dans une cellule dépendent principalement de leurs concentrations. De faibles concentrations induisent une forme modérée de stress oxydant menant à l'oxydation de protéines clé impliquées dans la signalisation cellulaire, alors que de plus fortes concentrations provoquent des dommages cellulaires (**Mailloux, 2019**), un exemple de cette dualité d'effet est donné dans la **figure 2**.

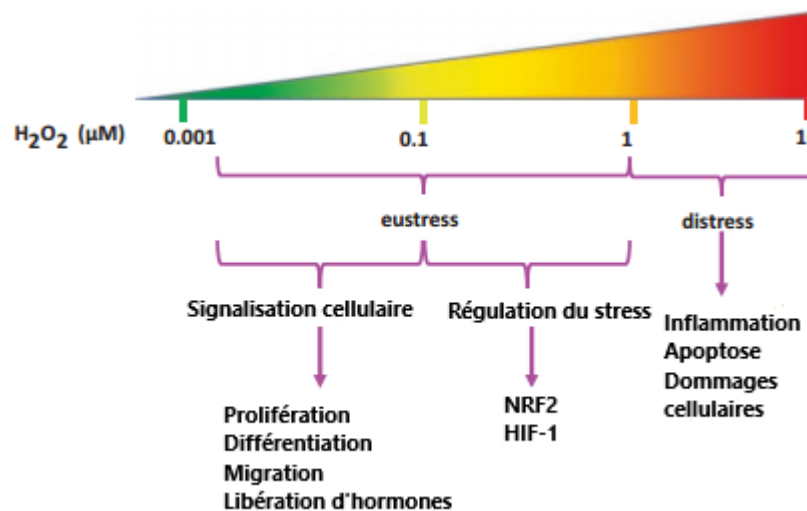


Figure 2 : Dualité d’effet du peroxyde d’hydrogène (Adaptée à partir de Sies, 2017)

Cette dualité d’effet a mené à une redéfinition du terme stress oxydatif comme étant le déséquilibre entre oxydants et antioxydants en faveur des oxydants, entraînant une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et / ou dommages moléculaires (Sies, 2020). Dans ce contexte, il faut faire la différence entre deux types de stress oxydant. Un état de eustress oxydant où la cellule maintient un niveau physiologique (faible) d’oxydants qui est essentiel pour gouverner les processus vitaux par signalisation redox ; et un état distress oxydant caractérisé par un niveau excessif d’oxydants menant aux dommages cellulaires (Sies, 2017) (Figure 3).

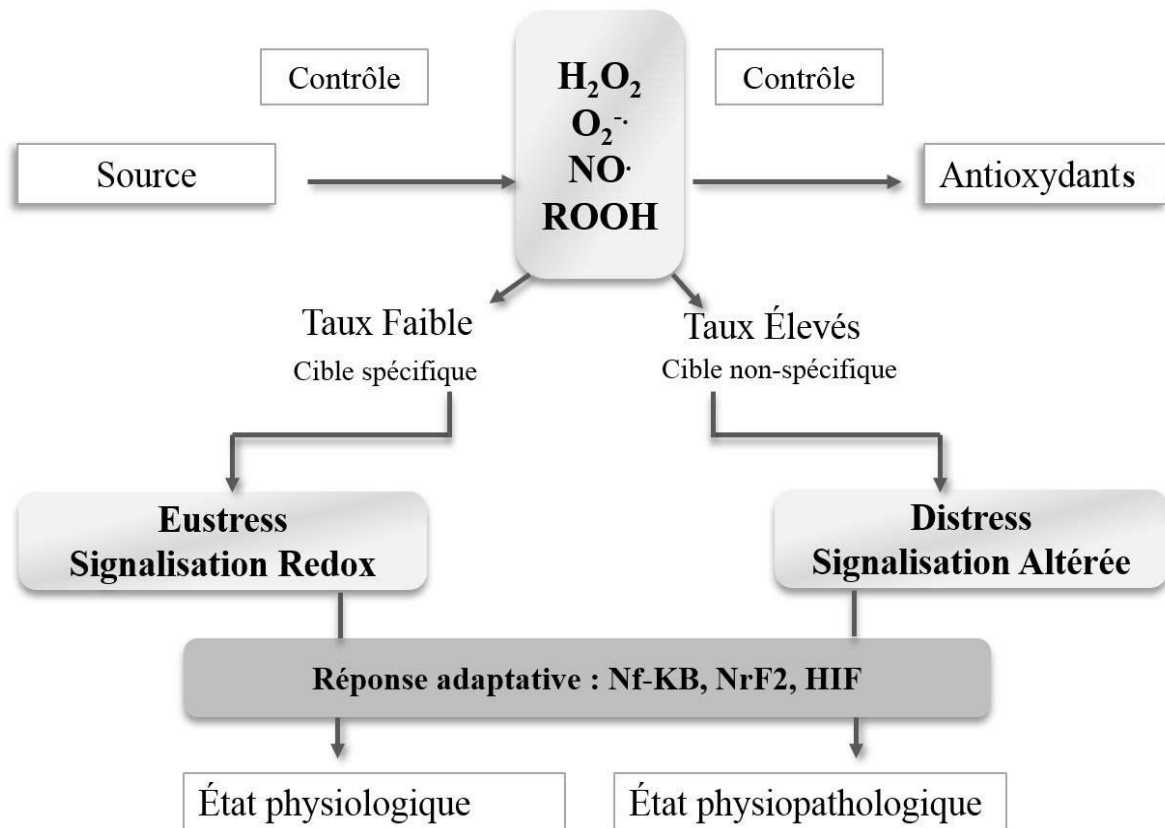


Figure 3 : Etat eustress et distress oxydants (Sies, 2020).

1.1.6. Stress oxydant et physiopathologies humaines

Lors d'un état de distress oxydant les taux élevés de RONS infligent des dégâts aux différents constituants cellulaires, ce qui se reflète sur le fonctionnement cellulaire, tissulaire et celui des organes induisant comme résultats plusieurs maladies (Kruk et al., 2019). Le distress oxydant est impliqué dans plusieurs maladies, dont l'athérosclérose, le cancer, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de fatigue chronique et les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington (Liguori et al., 2018). La surveillance des bio marqueurs tel que le MDA et 3-nitrotyrosine ainsi que les niveaux d'antioxydants cellulaires, prouve l'implication du distress dans la pathogenèse de ces maladies. Des taux élevés de bio marqueurs tels que le 4-hydroxy-2,3-nonéal (HNE), l'acroléine, le malondialdéhyde (MDA) et les isoprostanes F2 ont été observés dans la maladie d'Alzheimer (Santos-Sánchez et al., 2019). Le stress oxydatif contribue également

aux lésions tissulaires consécutives à l'hyperoxie et à l'irradiation, il joue aussi un rôle important dans la pathogenèse et le développement des troubles liés au syndromes métaboliques tels que l'obésité, l'hypertension, le diabète, la dyslipidémie, ainsi que dans les maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde, sténose aortique, angine de poitrine, athérosclérose et insuffisance cardiaque **(Di meo et al., 2016 ; Santos-Sánchez et al., 2019 ; Sies, 2019)**.

Le cancer est une autre maladie associée aux RONS qui stimulent des oncogènes dont la surexpression est directement associée au cancer du poumon **(Phaniendra et al., 2015)**. En outre, le développement d'un cancer gastrique est dû à l'augmentation de la production de RONS par une infection à *Helicobacter pylori* dans l'estomac humain. L'excès des RONS dans les reins peut entraîner une lithiase urinaire. Les ROS endommageraient aussi les composants cellulaires du cartilage conduisant à l'arthrose. Plus encore, l'hyperglycémie déclenche la production des RONS dans les cellules tubulaires et mésangiales du rein, entraînant des changements fonctionnels et structurels dans les glomérules provoquant une néphropathie diabétique **(Engwa, 2018)**.

1.1.7. Mécanismes de défenses cellulaires

Les cellules sont équipées d'un système de défense intégré pour maintenir les concentrations des RONS sous contrôle et éviter les dégâts occasionnés par ces derniers en cas de distress oxydatif. Ces mécanismes de défenses peuvent être directs ou indirects.

1.1.7.1.Mécanismes de défense directe

Les molécules de défense directe sont la première ligne de défense, elles entrent en contact direct avec les RONS afin de les neutraliser. Ces molécules peuvent être de nature enzymatique ou non enzymatique.

a. Antioxydants enzymatiques

Les organismes aérobies possèdent un arsenal d'enzymes antioxydants, dont les principales sont : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). La SOD est responsable de la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 , qui est ultérieurement converti en H_2O et O_2 , par la catalase ou par la GPx.

Superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxyde dismutases (SOD) sont un groupe d'enzymes clés fonctionnant comme la première ligne de défense antioxydants grâce à la capacité de convertir les radicaux superoxydes hautement réactifs (dismutation) en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (**Réaction 1 Figure 4**). Le superoxyde étant le principal ROS produit à partir de plusieurs sources, sa dismutation par la SOD est de première importance pour chaque cellule. La SOD est une métalloenzyme et nécessite donc un métal comme cofacteur pour son activité (**Aguilar et al., 2016**). Selon le type d'ion métallique requis comme cofacteur par la SOD, il existe plusieurs formes de SOD. Trois isozymes de superoxyde dismutase sont identifiées : (i) SOD1 localisée dans le cytosol de la cellule et liant les ions cuivre et zinc, (ii) SOD2, localisée dans les mitochondries et associée aux ions manganèse ou fer, (iii) SOD3, située à l'extérieur de la cellule et également associée au cuivre et au zinc (**Santos-Sánchez et al., 2019**).

Catalase

La catalase utilise du fer ou du manganèse comme cofacteur et catalyse la dégradation ou la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour produire de l'eau et de l'oxygène moléculaire, complétant ainsi le processus de détoxification initié par la SOD (**Réaction 1 Figure 4**). La catalase est très efficace pour décomposer des millions de molécules de H_2O_2 en une seconde (**Engwa, 2018**).

La conversion de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire a lieu en deux étapes :

Catalase-Fe (III) + H₂O₂ → composé I

Composé I + H₂O₂ → Catalase - Fe (III) + 2 H₂O + O₂

Composé I = Fer complexé avec un atome d'oxygène

La CAT se trouve principalement dans les peroxysomes, et sa fonction principale est d'éliminer le H₂O₂ généré lors de l'oxydation des acides gras. La présence de NADPH lié à chaque sous-unité peut aider à protéger l'enzyme contre l'inactivation par H₂O₂. L'activité la plus élevée de cette enzyme semble se situer dans le foie et les érythrocytes. La catalase et d'autres enzymes antioxydants ont été considérées comme bio marqueurs du stress oxydatif dans divers organes ; par exemple, chez les rats diabétiques et dont la maladie est induite par la streptozotocine, les niveaux hépatiques de ces enzymes sont considérablement réduits, bien que le traitement avec diverses plantes peut inverser cet effet (**Briben et al., 2012**).

Glutathion peroxydase (GPx)

La Glutathion peroxydase catalyse la réduction du H₂O₂ en eau et la réduction du peroxyde organique (ROOH) en alcool correspondant ; ce processus se produit en présence du glutathion réduit (GSH), qui est converti en glutathion oxydé (GSSG) au cours de cette réaction (**Réaction 4 figure 4**). La réaction a une importance particulière dans la protection des acides gras polyinsaturés situés dans les membranes cellulaires où l'enzyme fait partie du système de défense antioxydants au sein de la cellule (**Aguilar et al., 2016**). Cette enzyme peut exister sous deux formes : dépendante du sélénium et indépendante du sélénium, chacune avec différentes sous-unités et différents sites actifs. Il existe quatre isoformes chez l'homme, cytosolique et mitochondriale (GPx1), cytosolique (GPx2), extracellulaire (GPx3) et le phospholipide hydro-peroxydase (GPx4). Le rein et le foie sont les organes qui contiennent le plus de GPx (**Engwa, 2018**).

b. Les antioxydants non-enzymatiques

La deuxième ligne de défense contre les RONS inclue des antioxydants non-enzymatiques caractérisés par leurs capacités à rapidement inactiver les radicaux et les oxydants (**Aguilar et al., 2016**). Cette catégorie comprend les protéines liant les métaux (PLMs), glutathion réduit (GSH), acide urique (AU), mélatonine (MEL), bilirubine (BIL), et polyamines (PAs). Vue leurs localisations, ces protéines et molécules à faible poids moléculaire procurent des mécanismes de défense intra et extracellulaires très efficaces contre les RONS (**Mironczuk-Chodakowska et al., 2018**).

Protéines liant les métaux (PLMs)

Les premiers antioxydants endogènes décrits étaient les protéines liant les métaux (PLMs), c'est-à-dire les protéines extra et intracellulaires, comme l'albumine (ALB), la céruloplasmine (CP), les métallothionéines (MT), la ferritine (FER), la myoglobine (MB), la transferrine (TF) et lactoferrine (LTF). Les PLMs sont les principaux contributeurs à la capacité antioxydants du plasma. Leurs propriétés antioxydants sont dues à leur capacité à se lier aux ions métalliques. Ces ions de métaux de transition (Cu^{2+} et Fe^{2+}) peuvent être extrêmement pro-oxydants, ce qui signifie qu'ils peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène et catalyser la formation d'espèces réactives secondaires ($\text{OH}^{\bullet}$) par la réaction de Fenton. Certaines de ces protéines peuvent en outre agir comme de véritables piègeurs d'espèces réactives par exemple, les groupes sulfhydryles libres de cystéine dans les ALB et les MT sont capables de piéger les radicaux hydroxyles. Des PLMs tels que la transferrine (TF), la ferritine (FER) et la lactoferrine (LTF) sont des chélateurs du fer (Fe^{2+}), qui peuvent être des inhibiteurs efficaces de radicaux libres dans la réaction de Fenton (**Mironczuk-Chodakowska et al., 2018**).

Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH) est un composé de faible poids moléculaire constitué de trois acides aminés : glycine, cystéine et acide glutamique. Il contient une liaison peptidique inhabituelle entre le groupe amine de la cystéine et le groupe carboxyle de la chaîne latérale du glutamate (**Santos Sánchez et al., 2019**). Il est principalement synthétisé dans le foie et la forme réduite bioactive constitue plus de 98 % du total du glutathion cellulaire, le reste est sous forme oxydée (GSSG). Cette prédominance est due à l'enzyme glutathion réductase qui est constitutivement active et inductible par le stress oxydatif (**Réaction 5, figure 4**). Le GSH est un antioxydant hydrosoluble présent dans les cellules à haute concentrations (1 à 10 mM) dans le noyau, les mitochondries et le cytoplasme (**Nimse and Pal, 2015**). Le GSH est impliqué dans plusieurs lignes de défense contre les ROS. Le groupe thiol confère au GSH la capacité de protéger d'autres fonctions thiols des protéines contre les dommages oxydatifs (**Réaction 3 figure 4**). Ces derniers (-SH) sont des entités chimiques répandues et hautement réactives dans les cellules. Ils se complexent avec les ions métalliques, participent aux réactions d'oxydation et donnent des acides sulfoniques, des radicaux thiol et des disulfures (**Mirończuk-Chodakowska et al., 2018**). En tant qu'antioxydants, le GSH réduit les ROS lors des réactions enzymatiques et non enzymatiques. Il régénère d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine C et la vitamine E et est impliqué dans la réparation des lipides endommagés dans les processus de peroxydation et dans le maintien des fragments sulfhydryle des protéines sous forme réduite (**Réaction 7 figure 4**) (**Nabi, 2014**).

Acide alpha-lipoïque (AL)

L'acide alpha-lipoïque (AL) peut fournir une activité antioxydants dans les milieux non polaires et polaires et présenter un effet antioxydants même sous ses formes oxydées (AL) et réduites, acide dihydrolipoïque (DHAL). AL peut exercer son effet antioxydants dans

n'importe quel compartiment subcellulaire du corps, et il est efficace pour recharger/réactiver les enzymes dans les mitochondries. Le diabète sucré et les maladies neurodégénératives peuvent être contrôlées avec AL en raison des propriétés antioxydants du système lipoate /dihydrolipoate, influençant la concentration tissulaire des formes réduites d'autres formes d'antioxydants (**Aguilar et al., 2016**).

Autres antioxydants à faible poids moléculaire

L'acide urique et l'albumine sont les deux principaux antioxydants dans le plasma humain, contribuant respectivement à 24% et 33% de l'activité antioxydants totale du plasma (**Aguilar, 2016**). La mélatonine (MEL) est un composé de faible poids moléculaire classé comme indol. L'une des fonctions importantes de la MEL est la réduction du stress oxydatif, résultant de sa capacité à piéger les radicaux libres et à empêcher leur formation en régulant l'activité des enzymes antioxydants et en stimulant les activités des antioxydants endogènes qui métabolisent les espèces réactives (antioxydant indirect). MEL est un puissant inhibiteur du radical hydroxyle (**Mirończuk-Chodakowska et al., 2018**). Les polyamines (PA) telles que la spermidine, la spermine et la putrescine sont des amines biogènes aux propriétés antioxydants, elles protègent les membranes cellulaires du peroxyde d'hydrogène, des superoxydes et des radicaux peroxydes (**Moussa et al., 2019**). Le coenzyme Q est un composé considéré comme un antioxydants liposoluble de synthèse endogène, présent dans toutes les membranes, son effet protecteur est étendu aux lipides, aux protéines et à l'ADN. La bilirubine a montré un fort potentiel antioxydants contre les radicaux peroxyde dans les milieux polaires (**Santos-Sánchez et al., 2019**).

1.1.7.2.Mécanismes de défense indirecte

Ces mécanismes indirects n'agissent pas directement sur les radicaux libres pour les éliminer ou les convertir en formes moins réactives. Ils peuvent agir sur certains mécanismes de

régulation qui contrôlent et régulent les processus qui conduisent à la production endogène de RONS, ça peut être un contrôle transcriptionnel des enzymes impliquées dans la génération de RONS endogènes (**Engwa, 2018**). Une autre approche indirecte consiste en molécules et enzymes qui sont transportées vers des sites de dommages oxydatifs pour la réparation des macromolécules ciblés par les RONS. Cela peut inclure la réparation de dommages d'ADN, de protéines ou de lipides. Des exemples courants comprennent des systèmes d'enzymes de réparation de l'ADN (polymérases, glycosylases et nucléases) et des enzymes protéolytiques (protéases et peptidases) retrouvés dans le cytosol et les mitochondries des cellules de mammifères. Des exemples spécifiques de ces enzymes sont la GPx, la glutathion réductase (GR) et la méthionine sulfoxyde réductase (MSR) (**Santos-Sánchez et al., 2019**). Ces enzymes agissent comme intermédiaires dans le processus de réparation des dommages oxydatifs causés par l'attaque des RONS. Certaines barrières cellulaires ou surfaces naturelles telles que la peau ou les membranes cellulaires agissent comme un système de défense indirect contre les RONS en empêchant les RONS exogènes de pénétrer dans le corps ou empêcher certains RONS endogènes d'atteindre les macromolécules cibles (**Engwa, 2018**).

1.1.7.3. Antioxydants exogènes

Les antioxydants non enzymatiques peuvent interagir ensemble pour piéger les radicaux libres et leur activité de piégeage peut être synergique. La plupart des scavengers proviennent de sources endogènes, telles que les processus de biosynthèse et des sous-produits du métabolisme cellulaire. Cependant, le nombre de ces molécules à faibles poids moléculaires synthétisées par la cellule vivante ou générées sous forme de déchets tels que les dipeptides d'histidine, le glutathion, l'acide urique, l'acide lipoïque et la bilirubine est limité. Plus encore, la concentration de piéteur doit être suffisamment élevée pour concurrencer les espèces délétères sur leurs cibles biologiques. Des sources exogènes d'antioxydants non enzymatiques, en particulier de l'alimentation, des plantes et des composés phytochimiques,

sont nécessaires pour compléter les antioxydants endogènes non enzymatiques **(Engwa, 2018)**.

Les antioxydants alimentaires tels que la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, certains minéraux (par exemple Zn, Mn, Cu, Se) et les polyphénols (flavonoïdes, acides phénoliques, stilbènes, lignanes) peuvent affecter l'activité des antioxydants endogènes. Les antioxydants endogènes et exogènes peuvent agir en synergie pour maintenir ou rétablir l'homéostasie redox. Les antioxydants exogènes sont présents en quantités importantes dans les fruits, légumes, boissons couramment consommés (jus, thé, café), noix et produits céréaliers. Les antioxydants alimentaires peuvent retarder le processus de vieillissement et peuvent également atténuer les complications du diabète et des maladies cardiovasculaires **(Mironczuk-Chodakowska et al., 2018)**. La figure 4 résume le fonctionnement et la synergie entre les différents constituants endogènes et exogènes du système de défense antioxydants.

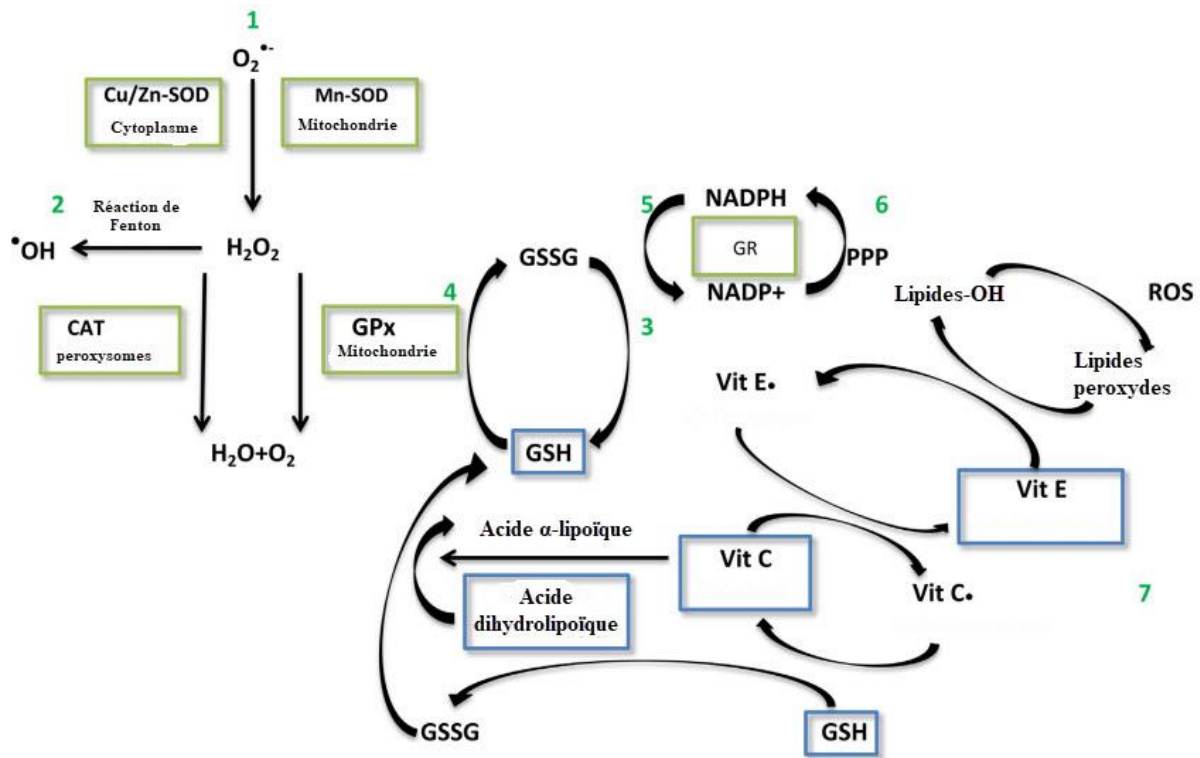


Figure 4 : Mécanismes de défense cellulaires Adaptée à partir de (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

1.2. Inflammation

1.2.1. Définition

Le terme inflammation vient du Mot latin « *inflammare* » qui signifie (brûler) (Abdulkhaleq et al., 2018). L'inflammation est une composante centrale de l'immunité innée (non spécifique) (Minihane et al., 2015), elle est généralement définie comme une réponse à une homéostasie tissulaire perturbée, induite par des agents pathogènes envahissants ou des signaux endogènes tels que des cellules endommagées. Cependant, les blessures ou les traumatismes (en l'absence d'infection) et l'exposition à des particules / irritants / polluants étrangers sont également de puissants activateurs de l'inflammation (Ashley et al., 2012). L'inflammation aboutit à une réparation des tissus ou parfois à des pathologies, lorsque la réponse n'est pas contrôlée, c'est donc un mécanisme de défense vital pour la santé (Chen et al., 2018). Les signes de base de l'inflammation sont (1) un œdème ou un gonflement causé par un dépôt progressif de liquide à l'extérieur des vaisseaux sanguins; (2) la douleur, causée par la

pression qu'exerce l'œdème sur les tissus environnant et / ou une réponse directe aux réactions de la prostaglandine, de la sérotonine et de la bradykinine; (3) rougeur, à la suite d'une vasodilatation au site inflammatoire; et (4) une fièvre provoquée par des médiateurs pro-inflammatoires qui contribuent à l'augmentation de la température locale et / ou systémique (Nunes, 2020).

1.2.2. Mécanismes de l'inflammation

La réponse inflammatoire est une activation coordonnée des voies de signalisation qui régulent les niveaux de médiateurs inflammatoires dans les cellules tissulaires résidentes et les cellules inflammatoires recrutées dans le sang. Bien que les processus de la réponse inflammatoire dépendent de la nature précise du stimulus initial et sa localisation dans le corps, ils partagent tous un mécanisme commun, qui peut être résumé comme suit : 1) Les récepteurs cellulaires de reconnaissance des motifs reconnaissent le stimulus nuisible ; 2) Activation des voies inflammatoires ; 3) Libération des médiateurs inflammatoires ; et 4) Recrutement des cellules inflammatoires (Figure 5).

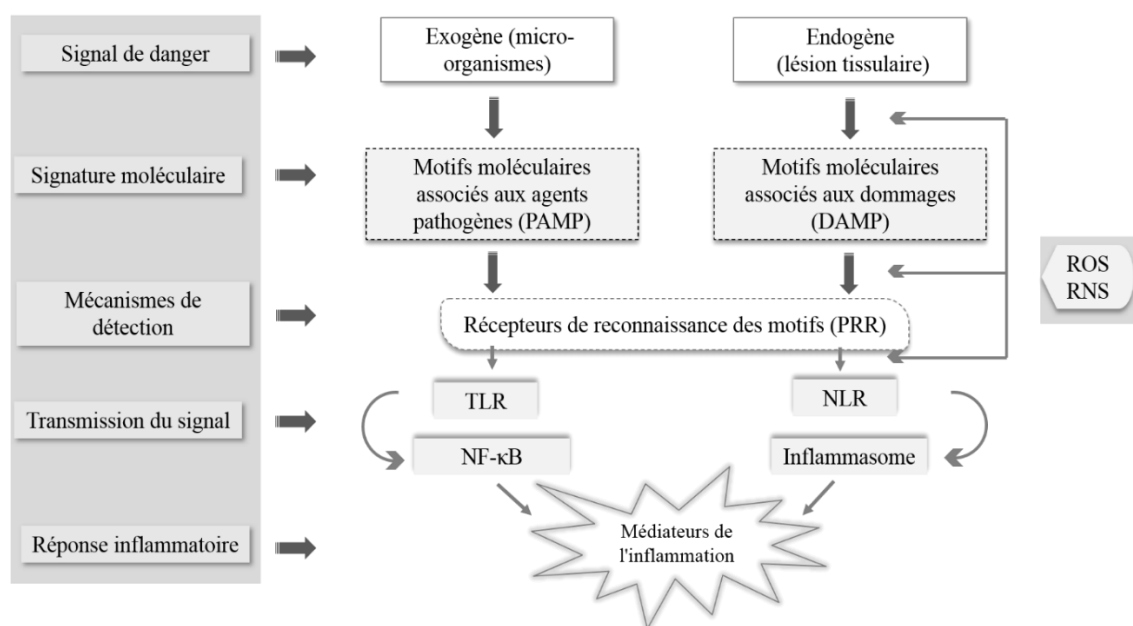


Figure 5 : Processus et voies de déclenchement de la réponse inflammatoire (Chatterjee, 2016)

a. Déclenchement de l'inflammation : Récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR)

Les stimuli inflammatoires sont d'abord reconnus par les cellules hôtes à travers des récepteurs transmembranaires spécifiques, appelés récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR : Pattern recognition receptors), qui sont exprimés par les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Ils sont chargés de détecter la présence de signaux exogènes comprenant principalement des molécules microbiennes, par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) et la flagelline de bactéries Gram-négatives, l'acide lipotéichoïque de bactéries Gram-positives et l'ARN viral, ces structures conservées (motifs) dans les microbes sont appelées motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP : Pathogens associated molecular patterns) (**Ahmed, 2011**). Des molécules non infectieuses, comme les allergènes et les polluants atmosphériques tels que la silice et l'amiante sont aussi reconnues. De multiples signaux endogènes sont également capables de provoquer une réponse inflammatoire par l'activation des mécanismes de défense immunitaire innés. Celles-ci sont collectivement appelées « motifs moléculaires associés aux dommages » ou DAMP (Damage associated molecular pattern), parfois également appelées « alarmines ». Les DAMP sont libérés dans des conditions de lésion tissulaire et proviennent soit de cellules mourantes (nécrotiques), soit de la dégradation de la matrice extracellulaire. Des exemples de DAMP intracellulaires comprennent les protéines de choc thermique, la protéine HMGB1 (High mobility group box 1), l'ATP et l'ADN. Les DAMP extracellulaires comprennent la fibronectine, l'acide hyaluronique, ainsi que des peptides dérivés du collagène ou élastine. Enfin, divers cristaux agissant comme des signaux de danger endogènes peuvent favoriser une forte réponse inflammatoire, notamment l'urate monosodique, le pyrophosphate de calcium dihydraté et l'ester de cholestérol (**Lugrin et al., 2014**). À ce jour, un certain nombre de PRR ont été identifiés avec la capacité sélective de détecter les PAMP, les DAMP ou les

deux, et ceux-ci comprennent les récepteurs de type Toll (TLR : Toll like receptors), récepteurs de lectine de type C (CLR), récepteurs de type RIG-1 (RLR) et récepteurs de type NOD (NLR) (**Ahmed, 2011**).

b. Transduction du signal

Les interactions des récepteurs PRR avec les stimuli appropriés entraînent la transduction des signaux au noyau où l'activation d'un ensemble sélectif de gènes a lieu (**Ahmed, 2011**). Les principales voies de signalisations incluent : les kinases (MAPK kinases, PI3 kinase), protéine adaptatrice, tels que le facteur de différenciation myéloïde-88 (MyD88), facteurs de transcription, dont le principal est le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B : Nuclear factor kappa B), la protéine activatrice 1 (AP-1) et les facteurs de régulation d'interféron, ainsi que l'inflammasome dans le cas de l'activation NLR. Ces cascades de signalisation favorisent l'expression des gènes codant pour des cytokines, chimiokines, enzymes, facteurs de croissance et molécules supplémentaires qui sont nécessaires pour la résistance antimicrobienne et la réparation tissulaire (**Lugrin et al., 2014**). Les trois voies les plus étudiées sont : la voie JAK/STAT, la voie MAP kinase et la voie du facteur de transcription NF- κ B.

L'une des voies inflammatoires les plus importantes est celle du facteur de transcription NF- κ B qui joue un rôle important dans la réaction inflammatoire, immunitaire, la survie et le processus d'apoptose. Le facteur NF- κ B est un dimère formé à partir de 5 protéines dont l'activation est induite par une gamme de stimuli, y compris les cytokines inflammatoires, les motifs bactériens ou viraux, le stress, les ROS, les ultraviolets et les rayonnements ionisants. Dans des conditions physiologiques, les protéines I κ B présentes dans le cytoplasme inhibent le facteur NF- κ B. Les PRRs utilisent des mécanismes de transduction du signal similaires pour activer une I κ B kinase (IKK) qui régule l'activation de la voie NF- κ B par la

phosphorylation de I κ B. La phosphorylation de l'I κ B entraîne sa dégradation par le protéasome et la libération subséquente de NF- κ B qui passe au noyau et active la transcription des gènes cibles. Cette voie régule la production de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules inflammatoires, qui contribuent à la réponse inflammatoire. Le facteur NF- κ B cible l'inflammation non seulement directement par augmentation de la production de cytokines inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion, mais aussi par régulation la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose. La figure 6 résume cette voie de signalisation (Chen et al, 2018).

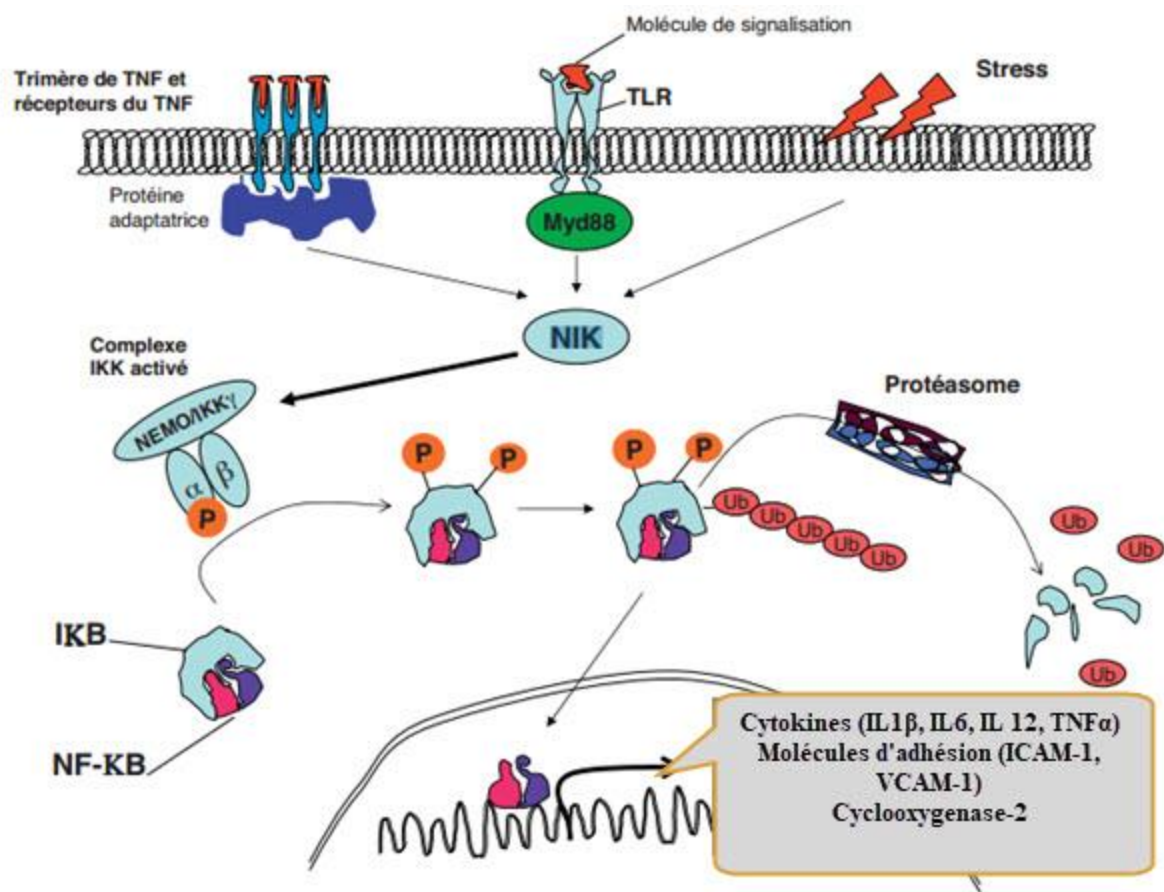


Figure 6 : Voie inflammatoire de signalisation NF- κ B (Adapté à partir de Liu et al., 2017). I κ B: Protéines inhibitrices (inhibitors of NF- κ B). TLR: Toll like receptors; IKK: I κ B kinase-kinases; NIK: NF- κ B-inducing kinases. MyD88 : Myeloid differentiating factor 88.

c. Médiateurs de l'inflammation

L'activation des PRR par les signaux exogènes et endogènes et la transduction du signal au noyau induit la production d'une panoplie de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines inflammatoires sont classées en interleukines (IL), facteurs stimulants les colonies (CSF), les interférons (IFN), les facteurs de nécrose tumoral (TNF). Les Facteurs de croissance et les chimiokines, les plus importants sont IL1 β , IL6, IL 8, IL 12 et le TNF α (**Minihane et al., 2015 ; Abdulkhaleq et al., 2018**). Ces cytokines sont produites par les cellules principalement pour recruter des leucocytes au site d'infection ou de blessure (**Ashley et al., 2012 ; Chen et al., 2018**). Elles modulent la réponse immunitaire à l'infection ou à l'inflammation et régulent l'inflammation elle-même via un réseau complexe d'interactions. Ces cytokines sont principalement libérées par des cellules immunitaires, y compris les monocytes, les macrophages et les lymphocytes mais aussi les fibroblastes et les cellules endothéliales et d'autres cellules (**Abdulkhaleq et al., 2018**).

Les interleukines ont un effet très puissant sur les cellules hépatiques, elles les stimulent pour produire les protéines de la phase aiguë (**Abdulkhaleq et al., 2018**). Des exemples de ces protéines incluent, la protéine C réactive (CRP), l'haptoglobine, le sérum amyloïde A, le fibrinogène et la glycoprotéine alpha 1-acide. Ces protéines aident à restaurer l'homéostasie et à réduire la croissance microbienne indépendamment des anticorps lors d'un traumatisme, d'un stress ou d'une infection (**Chen et al., 2018**). Le plasma sanguin est une source importante de médiateurs inflammatoires tels que le complément, les facteurs de coagulation, le système fibrinolytique et les kinines. La perméabilité vasculaire est directement influencée par le système kinine qui génère des médiateurs chargés d'augmenter la perméabilité vasculaire. De plus, une kinine essentielle nommée bradykinine est responsable de deux des principaux effets inconfortables de l'inflammation, les démangeaisons et la douleur (**Nunes, 2020**).

Les prostaglandines sont considérées comme des médiateurs inflammatoires majeurs. Ce type d'acides gras joue un rôle essentiel dans l'agrégation plaquettaire et favorisent la perméabilité vasculaire. Ce groupe de molécules est ciblé par de nombreux médicaments anti inflammatoires (**Abdulkhaleq et al., 2018**).

La réponse inflammatoire implique un réseau coordonné de nombreux types de cellules. Les macrophages activés, les monocytes et d'autres cellules interviennent dans les réponses locales aux dommages tissulaires et aux infections. Sur les sites de lésions tissulaires, les cellules épithéliales et endothéliales endommagées libèrent des facteurs qui déclenchent la cascade inflammatoire, ainsi que des chimiokines et des facteurs de croissance, qui attirent les neutrophiles et monocytes. Les premières cellules attirées vers le site de l'inflammation sont les neutrophiles, suivis des monocytes, des lymphocytes (cellules NK, cellules T et cellules B) et des mastocytes (**Abdulkhaleq et al., 2018**). Les monocytes peuvent se différencier en macrophages et en cellules dendritiques et sont recrutés par chimiotaxie dans les tissus endommagés (**Chen et al., 2018**).

d. Résolution de l'inflammation

La résolution est la dernière phase de l'inflammation, elle est essentielle pour limiter les dommages collatéraux que subit l'hôte (**Fullerton and Gilroy, 2016**). Les agents nuisibles qui ont déclenché la réponse inflammatoire sont éliminés. Par la suite, la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires est suspendue (**Schett and Neurath, 2018**), sous l'action de phosphatases qui désactivent les facteurs de transcription induisant la synthèse de ces médiateurs (**Ward, 2010**). Les cellules produisant des prostaglandines et des leucotriènes pro inflammatoires, passent rapidement aux lipoxines, qui bloquent le recrutement de neutrophiles et favorisent plutôt une infiltration accrue des monocytes importants pour la cicatrisation des plaies (**Ashley et al., 2012**). Tous les médiateurs pro inflammatoire sont

catabolisés, arrêtant ainsi le recrutement des leucocytes et la formation de l'œdème **(Fullerton and Gilroy, 2016)**. Cela est le cas des kinines telles que la bradykinine et la lysyl-bradykinine, qui sont hydrolysées par des kininases conduisant à leur inactivation fonctionnelle **(Ward, 2010)**. Des cytokines anti-inflammatoires telles que, IL-4, IL-10 et IL-12 sont libérés dans cette étape. Ce sont de puissants facteurs anti-inflammatoires qui stoppent la réponse inflammatoire aiguë en stabilisant I κ B α , qui bloque l'activation du facteur NF- κ B. Des Inhibiteurs de sérine-protéases sont aussi libérés pour désactiver les protéases libérées par les cellules phagocytaires et limiter leurs effets néfastes sur les tissus adjacents **(Ward, 2010)**.

Quel que soit la réponse initiale, soit par neutrophiles, éosinophiles ou réponse adaptative (lymphocytes), les cellules immunitaires sont éliminées du tissu. Les leucocytes inflammatoires peuvent réintégrer la circulation systémique, mais de nombreux neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes subissent une apoptose ou une nécrose locale et une efferocytose ultérieure par des macrophages recrutés. Une fois l'efferocytose terminée, les macrophages recrutés peuvent quitter le site inflammatoire par drainage lymphatique ou par apoptose locale **(Fullerton and Gilroy, 2016)**.

1.2.3. Classification de l'inflammation

L'inflammation peut être classée en deux types en fonction de la durée de la réaction ainsi que divers facteurs immunitaires. Ces deux classes différentes sont l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique (Figure 7).

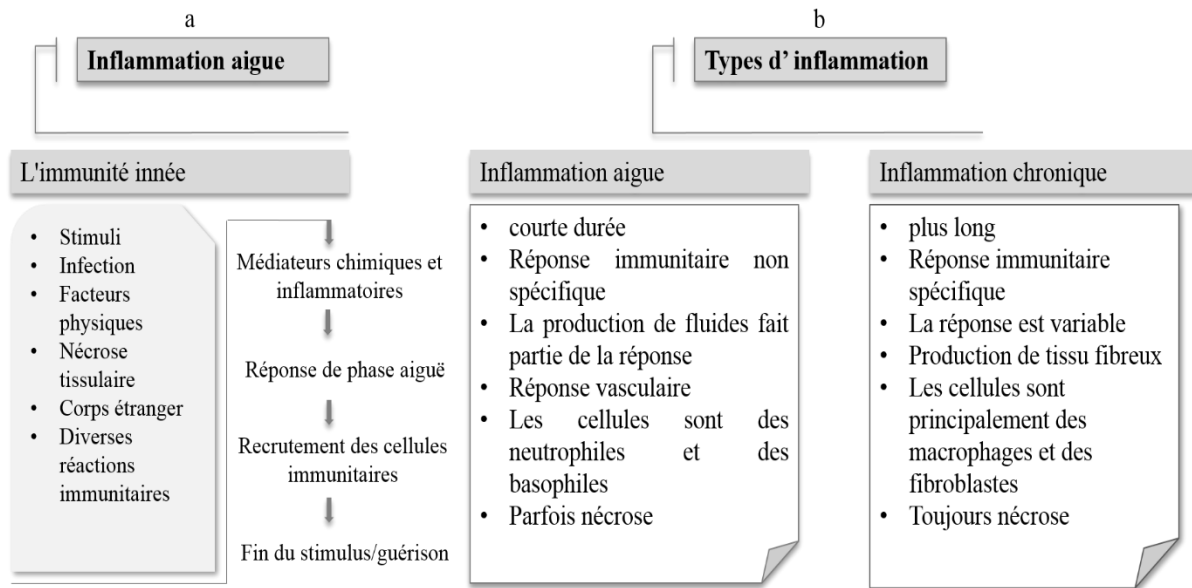


Figure 7 : a. Voies inflammatoires aiguës et leur processus d'activation ; b. Classification de l'inflammation par durée et fonctions immunitaires (Arulselvan et al., 2016).

1.2.3.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une réaction courte, qui dure de quelques minutes à quelques jours, et ses principales caractéristiques sont la fuite des protéines et du liquide plasmatiques (Exsudât) et le mouvement des leucocytes vers une zone extravasculaire. Ces événements cellulaires et vasculaires sont induits par des facteurs chimiques produits par des cellules et/ou apportés par le plasma et sont responsables des symptômes cliniques classiques de l'inflammation qui sont : gonflement, rougeur, douleur, chaleur et perte de fonction. Les premières altérations constatées lors de l'inflammation sont les changements dans le flux vasculaire et altérations du calibre de petits vaisseaux sanguins. Les Vaisseaux et capillaires nouvellement générés et les artérioles plus larges augmentent le flux sanguin vers la région cible (Arulselvan et al., 2016). Les cellules endothéliales activées expriment à leurs surfaces les molécules d'adhésion comme l'ICAM-1, E-selectine et P-selectine pour les neutrophiles. L'histamine agit sur la paroi vasculaire et induit l'ouverture réversible de la jonction serrée de cellules endothéliales (Ward, 2010). Enfin, après ces changements circulatoires, la migration

des leucocytes commence et ils adhèrent à l'endothélium, d'abord, en roulant puis par adhésion. Par la suite, ils traversent la paroi vasculaire (transmigration) dans le tissu interstitiel (**Arulselvan et al., 2016**). Les médiateurs et effecteurs inflammatoires sont extrêmement puissants et ne font pas la distinction entre les cibles microbiennes et cellules hôtes ; comme c'est le cas des protéases et radicaux libres libérés par les cellules phagocytaires, les dommages aux tissus de l'hôte sont donc inévitables durant la réaction inflammatoire (**Arulselvan et al., 2016**). Des lésions tissulaires induites par l'inflammation aiguë sont observées dans de nombreux organes, y compris le cœur, le pancréas, le foie, les reins, les poumons, le cerveau, le tractus intestinal et le système reproducteur (**Chen et al., 2018**).

1.2.3.2. Inflammation chronique

Une régulation appropriée des mécanismes de l'inflammation est essentielle pour empêcher une amplification incontrôlée de la réponse inflammatoire initiale et un passage de la réparation tissulaire aux dommages collatéraux (**Lugrin et al., 2014**). Cependant, il existe des situations dans lesquelles une telle restauration ne peut pas se produire de manière adéquate, entraînant un stress cellulaire persistant perpétuant et amplifiant la réponse inflammatoire. Dans ces conditions, le processus devient inadapté, entraînant des altérations importantes des fonctions tissulaires, avec des troubles systémiques et persistants de l'homéostasie (**Lugrin et al., 2014**) induisant une inflammation chronique qui peut durer des semaines, des mois ou des années. L'inflammation chronique des tissus se produit généralement lorsque les réponses inflammatoires se produisent en l'absence d'un stimulus réel. Elle survient généralement par le biais d'infections qui ne sont pas résolues par les mécanismes de protection endogène, ou par un autre mécanisme de résistance aux défenses de l'hôte. Elles peuvent également provenir d'agents physiques ou chimiques, qui ne peuvent pas être métabolisés, ou bien d'une susceptibilité génétique. La persistance des corps étrangers, des expositions chimiques

continues, l'inflammation aiguë récurrente ou des agents pathogènes spécifiques sont autant de raisons cruciales de l'inflammation chronique (**Arulselvan et al., 2016**). Sur le plan histologique cette inflammation est caractérisée par l'infiltration de cellules mononucléaires, y compris les macrophages, les lymphocytes et les plasmocytes qui remplacent les neutrophiles, la destruction des tissus par les médiateurs inflammatoires et la réparation impliquant l'angiogenèse et la prolifération des fibroblastes, les fibres de collagène et la formation du tissu conjonctif, qui se traduisent finalement par la formation de granulome (**Ward, 2010 ; Aoki and Narumiya, 2016**). Selon l'intensité de la réaction inflammatoire, les signes classiques d'inflammation aiguë peuvent ne pas apparaître, et les niveaux de CRP, par exemple, sont faibles par rapport à ceux qui accompagnent une inflammation aiguë après une lésion tissulaire ou une infection (**Antonelli and Kushner, 2017**).

1.2.4. Pathologies inflammatoires

Les maladies inflammatoires sont un groupe de troubles cliniques qui se caractérisent par des réponses inflammatoires chroniques comme caractéristique majeure. L'inflammation chronique est si étroitement liée à la pathogenèse des maladies inflammatoires qu'elle peut être à la fois cause et conséquence de ces pathologies (**Ahmed, 2011**). Le Diabète, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque chronique, les maladies neurodégénératives et le cancer sont des exemples typiques de processus pathologiques associés à ces altérations inflammatoires chroniques (**Lugrin et al., 2014 ; Arulselvan et al., 2016**).

1.2.5. Interrelation inflammation-stress oxydant

Les maladies non transmissibles (MNT) sont, par définition, les maladies chroniques non infectieuses. Les MNT les plus courantes sont l'obésité, les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer, les maladies respiratoires chroniques et les maladies neurologiques. Ces pathologies sont la cause la plus courante de décès et d'invalidité dans le monde depuis au

moins les trois dernières décennies. Des recherches récentes ont révélé que ces pathologies ont des facteurs physiopathologiques similaires comme les processus pro-oxydatif et pro-inflammatoire (**Camps and García-Heredia, 2014**). Il existe un chevauchement entre le phénomène de stress oxydant et la réponse inflammatoire, de telle sorte que l'un peut être la cause et/ou la conséquence de l'autre (**Figure 8**) (**Camps and García-Heredia, 2014**).

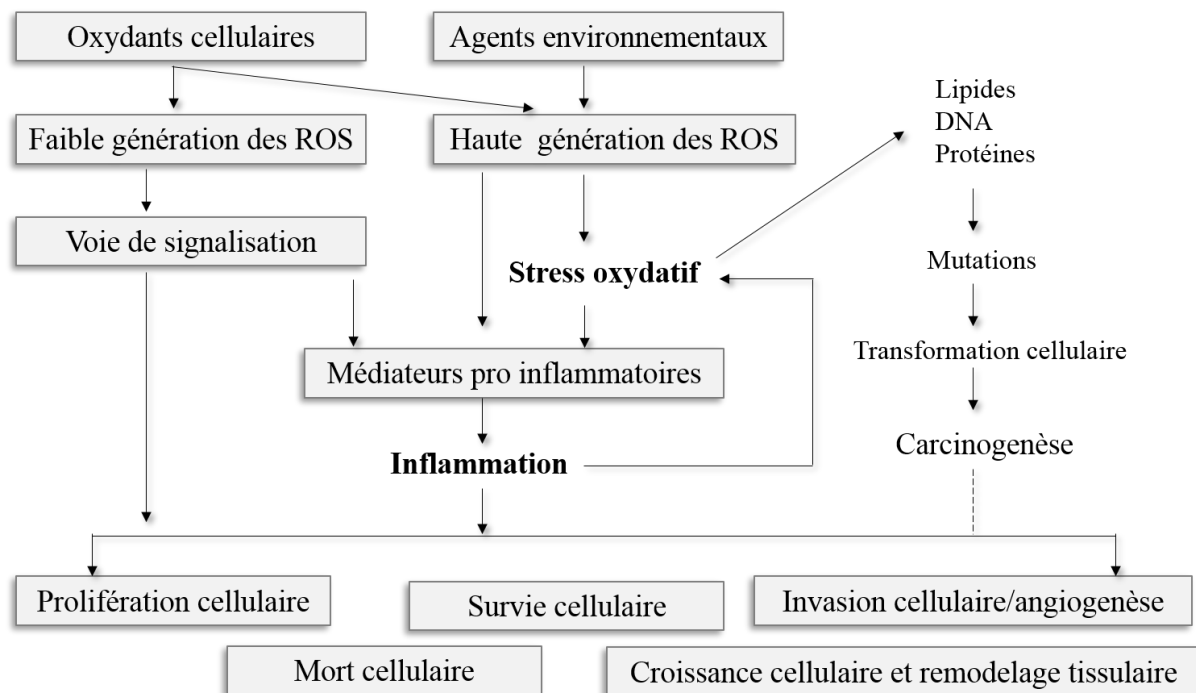


Figure 8 : Relation croisée entre le stress oxydant et l'inflammation (**Chatterjee, 2016**).

Lors d'une réaction inflammatoire, les neutrophiles créent un environnement cytotoxique en libérant des produits chimiques nocifs à partir des granules cytoplasmiques. La libération rapide de ces produits chimiques nécessite la consommation de glucose et d'oxygène. Ce phénomène est connu sous le nom d'explosion respiratoire. Les produits chimiques toxiques libérés comprennent des espèces d'oxygène et d'azote hautement réactives (ROS et RNS, respectivement) et diverses protéinases (**Ashley et al., 2012**). Ainsi, la génération de radicaux libres fait partie intégrante de la réponse inflammatoire. Les réactions aiguës et chroniques sont couplées à des altérations importantes de l'équilibre redox et tout ce qui en résulte, en raison de l'augmentation de la génération des RONS. Lorsque de telles réponses sont

excessivement prolongées, le résultat peut être des dommages oxydatifs auto-infligés à l'organisme (**Lugrin et al., 2014 ; Bondy, 2016**).

Le stress oxydant induit la mort cellulaire et endommage la matrice extracellulaire, en raison des dommages infligés aux biomolécules et qui dépassent toute capacité de réparation. Les cellules nécrotiques et la matrice extra-cellulaire endommagée libèrent à leur tour diverses molécules intracellulaires et extracellulaires, qui agissent comme des alarmines déclenchant des cascades inflammatoires grâce à la reconnaissance par les PRR. Ce type d'inflammation est appelé : Inflammation stérile ou inflammation induite par le stress oxydant. Un exemple de molécules responsables de cette inflammation est la protéine HMGB1 (High mobility group box 1) dont les effets incluent l'inflammation, chimiotaxie, maturation des cellules dendritiques et activation des cellules endothéliales. La libération de HMGB1 est un phénomène normal observé lors de l'exposition des cellules au stress oxydant spécialement sous l'effet du peroxynitrite et du peroxyde d'hydrogène. En plus de provoquer l'inflammation cette molécule peut accentuer le stress oxydant car la fixation de HMGB1 sur le récepteur TLR4 induit l'expression de gènes codant pour NOX et iNOS responsable de la génération des RONS (**Lugrin et al., 2014**).

En outre, les conditions de stress oxydant peuvent induire diverses modifications au sein des lipides et des protéines, générant les épitopes dits spécifiques à l'oxydation, qui agissent comme de puissants DAMP capables de déclencher une réponse inflammatoire par liaison à plusieurs PRR. De tels épitopes spécifiques de l'oxydation comprennent les phospholipides oxydés tels que la 1-palmytoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine et les lipoprotéines de basse densité oxydées (LDL), qui sont de plus en plus reconnus comme médiateurs clés de l'inflammation associée au processus d'athérogènes (**Lugrin et al., 2014**).

1.3. Polyphénols

Les polyphénols existent naturellement dans les végétaux et leurs produits dérivés, y compris les fruits et légumes (**Tangney and Rasmussen, 2013**). Plus de 8000 composés phénoliques différents sont identifiés dans l'alimentation humaine. C'est le groupe de métabolites secondaires le plus distribué dans les plantes (**Durazzo et al., 2019**). Les composés phénoliques sont définis comme des métabolites secondaires issus bio-génétiquement de la voie shikimate / phénylpropanoïde, qui fournit directement des phénylpropanoïdes. Leur structure est constituée d'un cycle aromatique, contenant un ou plusieurs substituants hydroxyles (**Figure 9**) (**Vuolo et al., 2019**). Elle peut varier d'une simple molécule à un polymère complexe de haut poids moléculaire. Il existe plusieurs manières de les classer mais la classification la plus adoptée implique la subdivision des composés phénoliques en deux groupes principaux : les flavonoïdes et les polyphénols non flavonoïdes, et cette classification est largement utilisée dans la littérature (**Durazzo et al., 2019**).

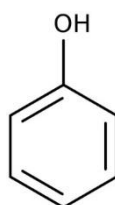


Figure 9 : Structure de base des composés phénoliques

1.3.1. Classification

Dans la nature, les polyphénols sont liés aux sucres sous forme de glycosides. Cependant, la classification des polyphénols est basée sur la structure chimique des aglycones. Ces formes contiennent au moins un cycle aromatique et sont classées en différents groupes en fonction du nombre de cycles aromatiques et des éléments structuraux qui lient ces cycles entre eux.

Par conséquent, les polyphénols sont classés comme des flavonoïdes et des non flavonoïdes (acides phénoliques, lignanes , xanthone et stilbènes) (**Mrduljaš et al., 2017**).

1.3.1.1.Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent trois quarts des composés phénoliques présents dans l'alimentation humaine. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire, caractérisées par un squelette à 15 atomes de carbone, arrangés en C6–C3–C6. Les structures flavonoïdes sont essentiellement constituées de deux cycles aromatiques, A et B, reliés par un pont à trois atomes de carbone, souvent sous la forme d'un cycle hétérocyclique C (**Mrduljaš et al., 2017**). Le cycle C est principalement responsable des variétés de classes de flavonoïdes ; les variations de son mode de substitution fournissent les principales classes de flavonoïdes, telles que les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavanols (catéchines), les isoflavones, les flavanonols et les anthocyanidines (**Figure 10**) (**Vuolo et al., 2019**).

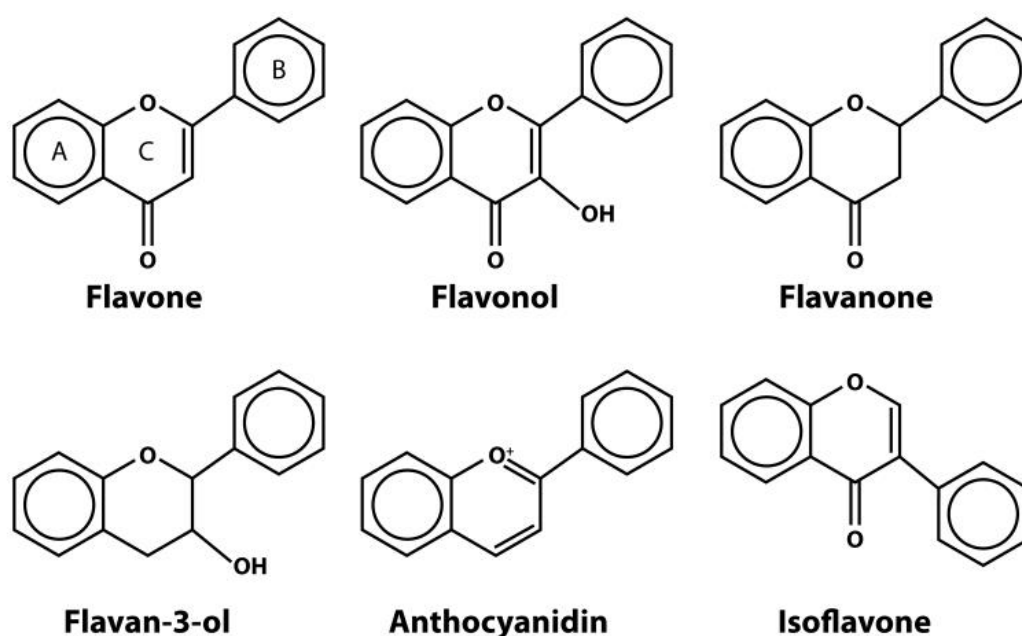


Figure 10 : Variation structurelle des différentes classes des flavonoïdes

Les variations des anneaux A et B donnent lieu aux différents composés au sein de la même classe de flavonoïdes. Ces variations sont dues aux substitutions qui peuvent être l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, la sulfatation et l'acylation (**Figure 11**) (**Abbas et al., 2017**).

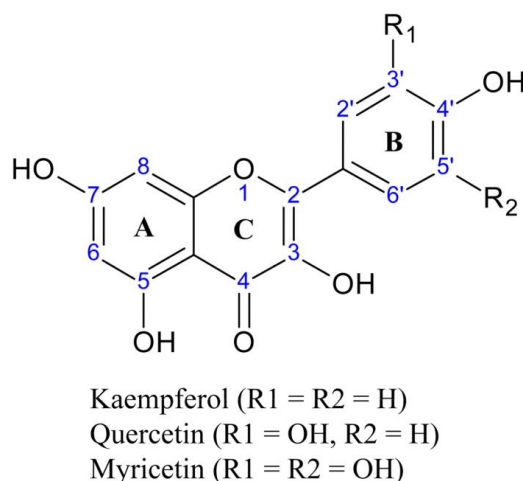


Figure 11 : Exemple de variation intra-classe des flavonols

1.3.1.2. Polyphénols non-Flavonoïdes

a. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés phénoliques non flavonoïdes omniprésents chez les plantes et se caractérisant chimiquement par un groupe carboxyle lié au cycle benzénique (**Durazzo et al., 2019**). Les acides hydroxybenzoïque (HBA) et hydroxycinnamique (HCA) sont les deux classes d'acides phénoliques. Ils sont dérivés de deux principaux composés, les acides benzoïque et cinnamique, respectivement (**Vuolo et al., 2019**).

Les HBA ont une structure générale en C6–C1, avec quelques variations dans leur structure de base telles que les hydroxylations et les méthoxylations des cycles aromatiques. Des exemples de HBA comprennent l'acide salicylique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide

protocatéchique, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gallique et l'acide ellagique (Figure 12) (Vuolo et al., 2019).

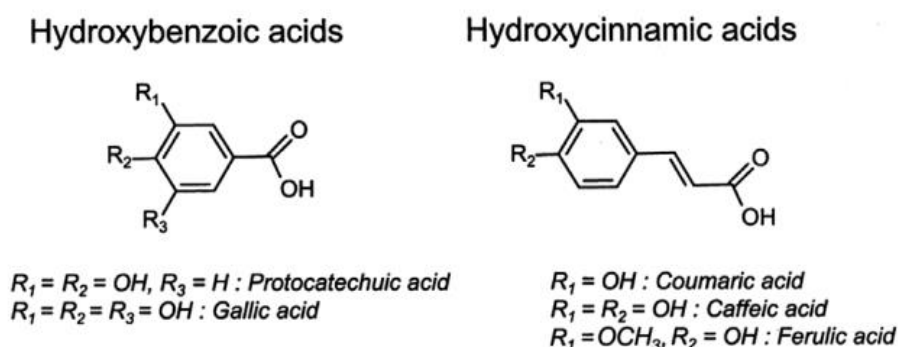


Figure 12 : Structure de base et variabilité structurelle des acides phénoliques

Les HCA ont une structure de base en C6–C3, avec une double liaison dans la chaîne latérale qui peut avoir une configuration en *cis* ou *trans*, dans les plantes, ils se présentent généralement sous forme de monomères, dimères ou polymères. Ils peuvent être retrouvés sous forme de condensats avec des alcools ou des esters (Vuolo et al., 2019). Les acides caféique, férulique, sinapique et *p*-coumarique appartiennent aux acides hydroxycinnamiques (Durazzo et al., 2019).

b. Autres composés non-flavonoïdes

Les xanthones, les stilbènes, les lignanes et les tanins appartiennent aux composés phénoliques non flavonoïdes. A l'exception des tannins, tous ces composés possèdent deux anneaux aromatiques dans leurs structures (Durazzo et al., 2019). Les xanthones, dont la structure chimique de base est illustrée dans la **figure 13.a**, sont des molécules très stables, qui ne sont pas dotées d'une grande utilité en thérapeutique. Ces composés comprennent une famille de composés O-hétérocycle symétriques avec une structure de base dibenzo- γ -pyrone et sont connus sous les noms de xanthone, xanthène ou dibenzo- γ -pyrone.

La structure chimique de base des stilbènes consiste en deux cycles benzéniques liés par une double liaison (**Figure 13.b**). Les stilbènes présentent une grande diversité dans leurs structures phénoliques (divers substituants chimiques et polymérisation), ce qui est un facteur déterminant pour leurs taux d'absorption et de métabolisme. Le plus connu et étudié parmi les stilbènes est le resvératrol (**Abbas et al., 2017**).

Les lignanes sont des composés di-phénoliques dérivés de la combinaison de deux unités phényl-propanoïdes C6-C3 aux atomes de carbone β et β' et pouvant former d'autres liaisons éther, lactone ou carbone supplémentaires (**Figure 13.c**). Les lignanes sont dérivés de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique. Ils sont largement répandus dans le règne végétal et on leur attribue une large gamme de propriétés physiologiques, influençant positivement la santé humaine (**Mrduljaš et al., 2017**).

Les tanins sont des polyphénols qui ont la capacité de précipiter les protéines. Ils sont classés en deux grands groupes : tanins hydrolysables et non hydrolysables, également appelés tanins condensés ou pro-anthocyanidines (**Figure 13.d**). Les tanins hydrolysables sont formés à partir de plusieurs molécules d'acides phénoliques comme les acides gallique et l'hexa-hydroxy-diphénique, qui sont unis par des liaisons ester à une molécule centrale de glucose. Les deux principaux types de tanins hydrolysables sont les gallotanins et les ellagitanins, qui sont, respectivement, composés des unités d'acide gallique et d'acide ellagique (**Abbas et al., 2017**).

Les tanins condensés, ou pro-anthocyanidines, sont des composés dont les structures sont basées sur des précurseurs de flavonoïdes oligomères et varient dans le type de liaisons entre les unités de flavonoïdes ; motifs d'hydroxylation et la stéréochimie des carbones 2, 3 et 4 du cycle pyranique. Ce sont des oligomères et des polymères constitués de deux à plus de 200 monomères d'unités flavan-3-ol (**Durazzo et al., 2019**).

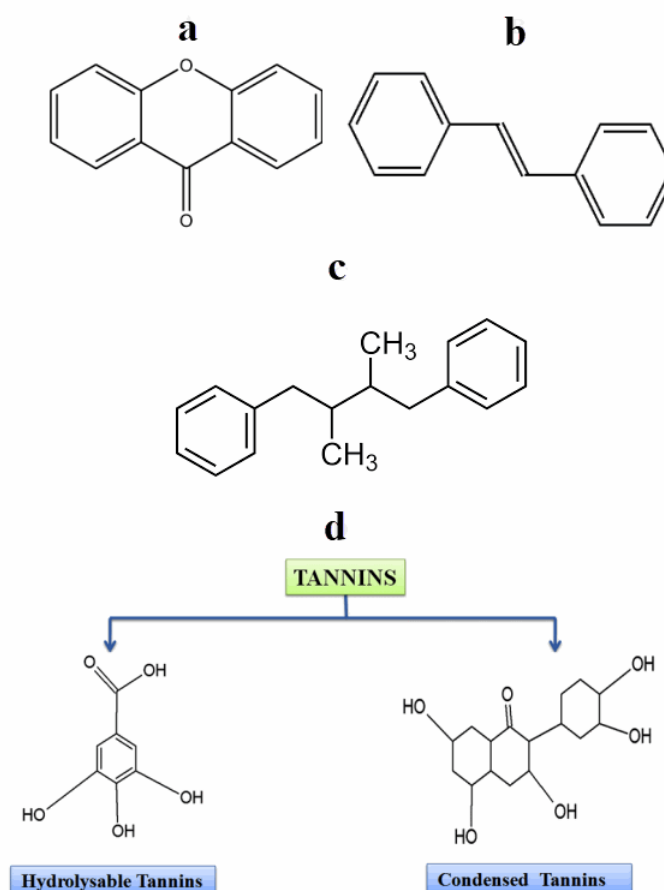


Figure 13 : Structure de base de certains composés phénoliques non- flavonoïdes ; a : Chalcones ; b : Stilbènes ; c : Lignanes ; d : Tannins

1.3.2. Polyphénols et santé humaine

La diversité structurelle des polyphénols reflète l'étendue de leurs fonctions biologiques. Ils sont principalement connus pour leur activité antioxydants, ils agissent par trois mécanismes principaux. Ces mécanismes incluent la neutralisation directe des radicaux libres par transfert d'un atome d'hydrogène et/ou d'électron, à partir de leurs groupes hydroxyles, la chélation des métaux de transition (Fer et cuivre) impliqués dans les processus de formation de radicaux libres et la régulation des activités enzymatiques impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif (**Mojzer et al., 2016**). Les polyphénols comme la quercétine et la rutine peuvent aussi agir comme antioxydants en inhibant les activités des enzymes générant des radicaux libres telles que la xanthine oxydase et l'oxyde nitrique synthase (**Engwa, 2018**).

Cette activité se traduit par une protection efficace des biomolécules (ADN, protéines, lipides, lipoprotéines), des cellules, des tissus et des organes contre les effets délétères du stress oxydant, maintenant le bon fonctionnement de l'organisme **(Nimse and Pal, 2015)**.

Bien que la plupart des recherches se concentrent sur l'activité antioxydants des polyphénols, ces derniers sont dotés d'un large éventail d'activités biologiques. Les polyphénols présentent une activité antivirale, antiallergique, anti tumorale, antibactérienne, antifongique et anti thrombotique. Ils présentent aussi une activité anti-inflammatoire qui dépend de leurs structures. L'activité anti-inflammatoire a également été confirmée par leurs capacités à inhiber les lipoxygénases et les cyclooxygénases. Les polyphénols sont utilisés contre le diabète, l'hypertension et l'athérosclérose. Un certain nombre de flavonoïdes présentent une certaine activité cytotoxique **(Kaurinovic and Vastag, 2019)**. Des études épidémiologiques confirment qu'une consommation modérée et prolongée d'aliments riches en polyphénols pourrait empêcher la genèse du cancer et des maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le diabète de type 2 et l'obésité, qui sont les atteintes les plus courantes dans les populations **(Mrduljaš et al., 2017)**. Malgré la diversité des bio activités des polyphénols, ces dernières paraissent d'une façon ou d'une autre reliés à leur activité antioxydants **(Crascì et al., 2018)**.

1.3.3. Biodisponibilité et bioaccessibilité des polyphénols

Même si un composé phénolique a une forte activité antioxydants ou d'autres activités biologiques *in vitro*, il aurait peu d'activité biologique *in vivo* à cause de sa faible biodisponibilité **(D'Archivio et al., 2010)**. Malgré leurs propriétés bioactives démontrées, l'action des polyphénols sur les systèmes biologiques reste complexe et contestée car elle est affectée par plusieurs facteurs comme les doses, la biodisponibilité, le métabolisme et d'autres biotransformations **(Barros and Junior, 2019)**. Donc, les polyphénols les plus

abondants dans notre alimentation ne sont pas nécessairement ceux qui ont le meilleur profil de biodisponibilité. Par conséquent, il est non seulement important de savoir quelle quantité d'un nutriment est présente dans un aliment ou un complément alimentaire spécifique, mais il est encore plus important de connaître la quantité bio disponible (**Barros and Junior, 2019**).

1.3.3.1. Biodisponibilité

Bien que plusieurs définitions de la biodisponibilité aient été suggérées, la plus appropriée semble être la fraction d'un nutriment ou d'un composé bioactif ingéré qui atteint la circulation systémique et les sites spécifiques où il peut exercer son action biologique (**Hu et al., 2017**). En d'autres termes, cela signifie simplement la quantité ingérée des polyphénols qui est capable d'exercer ses effets bénéfiques sur les tissus cibles (**Santos et al., 2019**). Dans l'ensemble, la biodisponibilité comprend la digestion gastro-intestinale, l'absorption, la métabolisation, la distribution tissulaire et la bio activité (**Carbonell-Capella et al., 2014**).

1.3.3.2. Bioaccessibilité

La bioaccessibilité est définie comme la fraction de polyphénols qui est libérée de la matrice alimentaire pendant le processus de digestion, puis devient accessible pour l'absorption intestinale. Elle concerne les polyphénols libérés de la matrice alimentaire par l'action des enzymes digestives (intestin grêle) et de la microflore bactérienne (gros intestin), ces composés deviennent bio accessibles dans l'intestin et donc potentiellement bio disponibles (**Santos et al., 2019**).

Différents modèles *in vitro* ont été développés pour estimer la biodisponibilité et la bio accessibilité, les plus connus sont les modèles de simulation de la digestion qui ont été mis au point pour imiter avec précision les conditions physico-chimiques et physiologiques du tractus gastro-intestinal humain, ainsi que des modèles *in vivo* dans les organismes vivants (**Figure 14**). Cependant, la comparaison des résultats entre différentes études est difficile à

réaliser, car il n'existe pas de modèle expérimental standard pour étudier la bio accessibilité et la biodisponibilité.

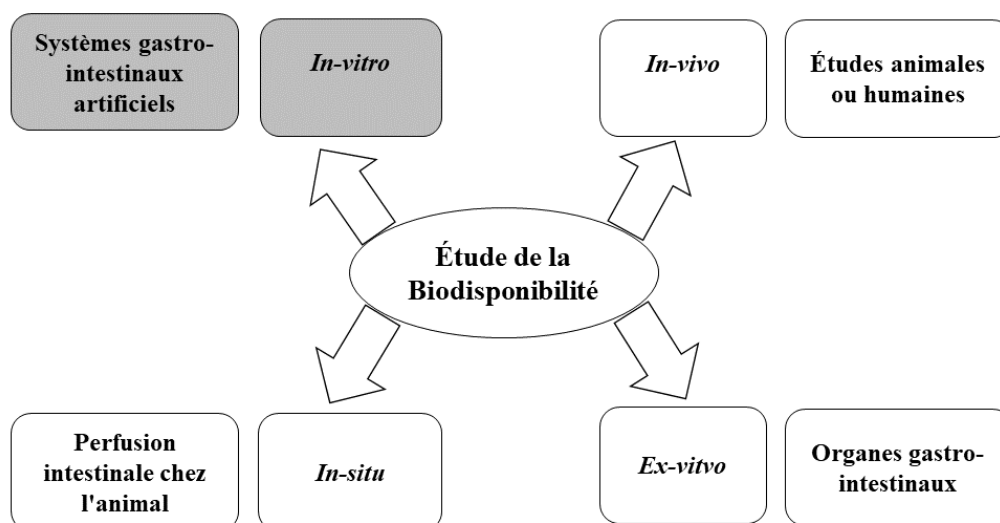


Figure 14 : Différentes méthodes d'études de la bioaccessibilité et biodisponibilité (Santos et al., 2019)

Les modèles de digestion *in vitro* se basent sur la physiologie humaine, pour être simples, économiques et reproductibles. Le but est d'étudier les modifications structurales, la digestibilité et la libération des constituants alimentaires dans des conditions gastro-intestinales simulées. Il y'a deux modèles des digestion *in vitro*, le modèle statique et le modèle dynamique (Santos et al., 2019).

1.3.3.3. Modèle statique de digestion *in vitro*

Le modèle de digestion statique a été appliqué dans ce travail pour digérer nos échantillons, il permet d'estimer la bio accessibilité par des méthodes *in vitro* avec une très bonne corrélation avec les résultats obtenus à partir d'études humaines et de modèles animaux. Cette méthode est basée sur la réduction du système gastro-intestinal en un simple réacteur chimique. Les modèles statiques sont les systèmes digestifs les plus courants dans lesquels la phase gastrique consiste en une hydrolyse avec la pepsine des aliments homogénéisés à pH (1-2) et à température fixe (37 ° C) pendant une période définie (1-3 heures). Par la suite, la phase

intestinale peut se produire dans le même bioréacteur avec l'ajout d'enzymes pancréatiques avec ou sans bile (pH 6-7) (**Carbonell-Capella et al., 2014 ; Santos et al., 2019**). Ces méthodes sont limitées car elles négligent l'acidification graduelle de l'estomac. En plus elles ne prédisent pas exactement la quantité de composés bioactifs spécifiques que les humains peuvent absorber et utiliser. Bien que complexes, elles restent une version simplifiée associée au système *in vivo*, car elles excluent le microbiote, les hormones spécifiques ou le système immunitaire et la réponse spécifique de l'hôte (**D'Archivio et al., 2010 ; Santos et al., 2019**).

1.3.3.4. Bio accessibilité et la biodisponibilité des composés phénoliques

La biodisponibilité semble différer considérablement d'un composé phénolique à un autre, et les plus abondants dans notre alimentation ne sont pas nécessairement ceux qui ont la meilleure biodisponibilité. L'absorption et le métabolisme des composés phénoliques sont déterminés principalement par leurs caractéristiques physicochimiques. Par exemple, la taille moléculaire, la structure de base, le degré de polymérisation ou de glycosylation, la solubilité et la conjugaison avec d'autres composés phénoliques sont considérés comme des facteurs critiques (**Carbonell-Capella et al., 2014**).

La structure chimique des polyphénols, plus que la concentration, détermine le taux et l'étendue de l'absorption et la nature des métabolites circulant dans le plasma. La plupart des polyphénols sont stockés sous formes glycosylée, acylée ou liés avec des fragments rhamnoside (**Abbas et al., 2017**). Généralement, les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle ; cependant, la plupart des polyphénols sont présents dans les aliments sous forme d'esters, de glycosides ou de polymères qui ne peuvent pas être absorbés sous leur forme native (**Barros and Junior, 2019**).

Lorsque les composés phénoliques sont consommés dans l'alimentation, ils sont libérés de la matrice après mastication. L'action mécanique de la mastication cause la rupture des cellules

végétales avec libération de polyphénols liés faiblement à la paroi cellulaire et ceux contenus dans les vacuoles (Nagar et al., 2019). (Figure 15).

L'estomac réduit la taille des particules des aliments, ce qui améliore encore la libération de composés phénoliques, qui sont stables dans l'environnement gastrique acide, mais sont cependant dégradés sous les environnements faiblement alcalins dans l'intestin grêle (Hu et al., 2017). Le tractus gastro-intestinal (GIT) peut être considéré comme un extracteur efficace, où une partie des composés phytochimiques contenus dans les matrices alimentaires est extraite et devient disponible pour l'absorption dans l'intestin (Hu et al., 2017)

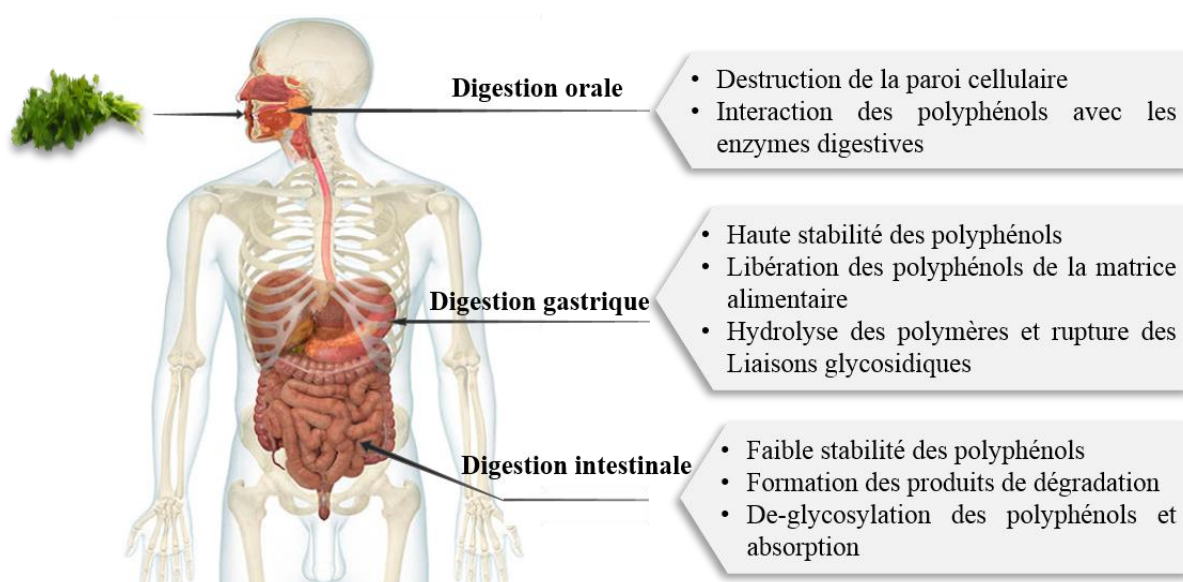


Figure 15 : Différents effets de la digestion gastro-intestinale sur les polyphénols

Seulement 5% à 10% de la quantité de polyphénols ingérée est absorbée dans l'intestin grêle. De cette quantité, 90 à 95% entrent dans la circulation sous forme de composés conjugués par une combinaison de méthylation, de conjugaison au sulfate, de conjugaison au glucuronide et, dans le cas de certains acides phénoliques, également par conjugaison à la glycine (Barros and Junior, 2019).

1.4. Matériel végétal étudié

1.4.1. Généralité sur les Ranunculacées

La famille des Ranunculacées est constituée de 60 genres et 2200 espèces dont la plupart sont des plantes herbacées, mais aussi des demi-arbustes ou des lianes généralement vivaces avec des rhizomes bien développés (**Maire, 1964**). Ces plantes poussent dans les régions fraîches ou tempérées près des endroits humides. Morphologiquement les Ranunculacées sont caractérisées par des feuilles simples ou composées, non stipulées et souvent divisées. Les fleurs sont modérément grandes, bisexuées, parfois unisexuées, actinomorphes, parfois zygomorphes, exclusivement hypogynes, principalement entomophiles. Les sépales comportent entre 3 et 6 pétaloïdes, entre 1 à 13 pétales, libres, généralement sécrétant du nectaire (**Kubitzki, 1993**). Le fruit est un akène ou follicules, rarement baies. Les graines sont à albumen abondant, oléagineux. Ces plantes sont souvent âcres, et pourvues d'alcaloïdes (**Maire, 1964**). Elles ont des racines adventives, parfois pivotantes développées. Il est estimé que 30 genres et 220 espèces ont un usage médical (**Da-cheng, 2018**), parmi lesquels on trouve le genre *Ranunculus*.

1.4.2. Le genre *Ranunculus*

1.4.2.1. Généralités

Ranunculus est un grand genre contenant presque 600 espèces. Environ 122 espèces existent en Chine (**Aslam et al., 2012**) et 50 espèces en Algérie (**Hachelaf et al., 2013**). Ils sont distribués dans tout l'hémisphère nord et les régions tempérées méridionales, dans les tropiques ils sont habituellement limités aux hautes altitudes (**Aslam et al., 2012**). Les plantes du genre *Ranunculus* sont des herbes à fleurs blanches ou jaunes avec des feuilles entières ou divisées. Les fleurs hermaphrodites sont solitaires ou en panicules lâches, actinomorphes. Les

sépales sont entre 3 et 5, les pétales entre 5 et 15, libres, pourvus à la base d'une fossette nectarifère. Les étamines sont ordinairement très nombreuses (**Maire, 1964**).

1.4.2.2. Usage traditionnel des *Ranunculus*

a. Médecine traditionnelle

Les espèces du genre *Ranunculus* sont généralement utilisées pour le traitement de la fièvre intermittente, du rhumatisme et sont utilisés comme rubéfiant. Les plantes sont généralement préparées comme décoction. Elles sont indiquées également comme remède pour les hémorragies (*Ranunculus repens*) et les névralgies, comme antispasmodique, diaphorétiques (*Ranunculus bulbosus*), antihelminthique (*Ranunculus Hirtellus*). D'autres espèces sont utilisées pour le traitement du tympanisme, conjonctivite (*Ranunculus laetus*) et pour le traitement de l'hépatite ictérique aiguë (*Ranunculus sceleratus*) (**Aslam et al., 2012**). En Algérie, *Ranunculus repens* est utilisée par la population campagnarde (Jijel, Est d'Algérie) dans le traitement des hépatites et du diabète (**Kebièche et al., 2011**).

b. Alimentation Humaine

En plus de leurs usages médicaux, les communautés locales ont utilisé les plantes *Ranunculus* à des fins alimentaires. Beaucoup d'entre elles sont traditionnellement consommées dans les régions Méditerranéennes, comme en Italie où *Ranunculus repens*, *Ranunculus bulbosus* et *Ranunculus ficaria* sont consommés sous forme de salades, de soupes ou ajoutés comme ingrédients alimentaires (**Guarrera and Savo, 2016**). La consommation de ces plantes ne se limite pas à la région Méditerranéenne mais s'étend à d'autres pays comme la Hongrie où *Ranunculus ficaria* est également consommé (**Dénes et al., 2012**) et le Japon où *Ranunculus nipponicus* est consommé (**Nakaya et al., 2015**).

1.4.2.3. Activités pharmacologiques

La partie aérienne de *Ranunculus sceleratus* possède des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro* en plus de son activité antibactérienne (Aslam et al., 2012). Les espèces *Ranunculus aestivalis*, *Ranunculus marginatus* et *Ranunculus laetus* possèdent également une activité antibactérienne (Aslam et al., 2012). *Ranunculus japonicum* a montré une activité analgésique et anti-inflammatoire chez les souris *in vivo* (Aslam et al., 2012). *Ranunculus sieboldii* et *Ranunculi Ternati* ont tous deux montré des activités cytotoxiques et anticancéreuse (Aslam et al., 2012). Le **tableau II** résume d'autres activités des espèces du genre *Ranunculus*.

Tableau II : Activités pharmacologiques des espèces du genre *Ranunculus*

Espèce	Activité	Référence
<i>R.repens</i>	Inhibition de la Xanthine oxydase	(Khan et al., 2008)
	Anti-diabétogène et cytoprotecteur	(Kebièche et al., 2011)
<i>R. pedatus et</i>	Anti-inflammatoire et cicatrisante	(Akkol et al., 2012)
<i>R. constantinapolitanus</i>	Inhibition de la cyclo-oxygenase	
<i>R.peltatus</i>	Ant-inflammatoire	(Prieto et al., 2008)
<i>R. arvensis</i>	Antifongique	(Hachelaf et al., 2013)
<i>R. sceleratus</i>	Anti-inflammatoire	(Prieto et al., 2003)
<i>R.bulbosus</i>	Antimicrobienne	(Didry et al., 1993)
<i>R.laetus</i>	Antibactérienne	(Hussain et al., 2009)
<i>R.marginatus</i>	Antioxydants et antibactérienne	(kaya et al., 2010)
<i>R.trachycarpus</i>		
<i>R. sprunerianus</i>		

1.4.2.4. Composition chimique

Les plantes du genre *Ranunculus* produisent à la fois des substances nutritives, non nutritives et bioactives. Les études ont montré la présence d'une variété d'acides gras, principalement de l'acide palmitique, stéarique et oléique en plus de plusieurs hydrocarbures saturés et non-saturés (**Da-cheng, 2018**). Ces plantes se trouvent être une excellente source de minéraux comme le sodium et le potassium et d'autres micro éléments essentiels comme le fer et le zinc (**Kibar et al., 2016**). Les molécules bioactives incluent des métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les triterpènes, les saponines, les coumarines et des alcaloïdes en plus des huiles essentielles et des huiles fixes (**Aslam et al., 2012**).

1.4.3. *Ranunculus macrophyllus* (Bouton d'or à grande feuille)

Appelée aussi « Mouter, الموتر » en Arabe, c'est une plante herbacée annuelle velue avec des poils écartés ou droits et des tiges rampantes ou érigées. Les feuilles du bas sont segmentées, chacune ayant 3 segments lobées et dentées. Les feuilles du haut sont coupées en segments étroits. Les sépales sont velus par la suite repliés (plié vers le bas). Les fleurs sont jaunes sur de longues tiges, solitaires. Les akènes sont velus ou chauves avec le bec incurvé minuscule. Fréquemment retrouvée dans des zones humides telles que des cours d'eau cette espèce fleurit entre le mois d'Avril et Mai (**Maire, 1964**) (**Figure 16**).



Figure 16 : Photographies de *Ranunculus macrophyllus* Desf. a : Parties aériennes en pleine floraison ; b : Racines (Deghima Amirouche, 2018, Ras El Oued)

La classification botanique de l'espèce *R. macrophyllus* Desf. selon **Maire, (1964)** est montrée dans le tableau III.

1.4.3.1. Usage traditionnel de *Ranunculus macrophyllus* Desf.

Les feuilles du bouton d'or sont utilisées pour le traitement de certaines maladies cutanées (**Rai et al., 2011**) alors que les racines sont traditionnellement utilisées comme remède pour la stérilité féminine et aussi comme moyen pour gagner du poids (**Ouarghidi et al., 2013**). Cette herbe sauvage comestible, fait aussi partie du régime Méditerranéen en Afrique du Nord (**Rivera et al., 2006**). La recherche dans la littérature scientifique n'a montré aucune étude portant sur la composition chimique, valeurs nutritionnelles ou les activités biologiques de cette plante. Ce fait, en plus de la chimiotaxonomie (Composition chimique et activités biologiques) des espèces du même genre et de son utilisation traditionnelle, sont les principaux facteurs qui ont guidé notre choix pour cette plante.

Tableau III : Classification botanique de l'espèce *Ranunculus macrophyllus* Desf.

Règne	Plantae – Plantes
Sous-règne	Tracheobionta – Plantes vasculaires
Super-division	Spermatophyta – Plantes à grains
Division	Magnoliophyta – Plantes à fleurs
Classe	Magnoliopsida – Dicotylédones
Subclass	Magnoliidae
Ordre	Ranunculales
Famille	Ranunculaceae
Genre	<i>Ranunculus</i>
Espèce	<i>Ranunculus Macrophyllus</i> Desf.

C hapitre II :

Matériels et Méthodes

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Matériel végétal

Les racines et les parties aériennes (tiges, feuilles, fleurs) de *Ranunculus macrophyllus* Desf. ont été collectées à Ras El Oued-Bordj - Bou Arreridj au Nord-Est de l'Algérie en mai 2018 (Coordonnées du système de positionnement global (GPS): 35°58'31,4"N 5°01'53,4"E, 1027 m au-dessus du niveau de la mer). La plante a été identifiée par Dr. Bouadam du Département de Biologie Physico-Chimique de l'université de Bejaia en utilisant la référence **Maire, 1964**. Un spécimen (AB-108) a été déposé dans l'herbier du Département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de M'sila. Le matériel végétal été bien lavé puis séché pendant 1 mois à l'air libre et broyé avec un broyeur électrique.

2.1.2. Animaux

Des souris *SWISS Albino* NMRI mâles/femelles pesant entre 20 et 25 ± 2 g ont été achetées à l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie). Les souris ont été maintenues dans une salle d'animaux dans des conditions standard (température 25 ± 3 °C et humidité 50 ± 10%) sous un cycle de 12 heures de lumière / 12 heures d'obscurité. Les souris ont reçu un régime alimentaire standard et de l'eau à volonté, elles ont été acclimatées pendant au moins 10 jours avant le test et mises à jeun 12 heures avant le dosage.

2.1.3 Larves *Artemia salina*

Les œufs de l'artémie, crevette saumurée (*Artemia salina*) ont été achetés auprès de Waterlife Research Industries (Bath Road, Longford, Middlesex, Royaume-Uni). Les œufs ont éclos dans une fiole conique contenant 1 L d'eau de mer artificielle stérile (3,3% de salinité, pH: 8,0 ± 0,5). Le ballon a été continuellement aéré en utilisant une pompe à air et maintenu dans

un bain-marie à 29 - 30 ° C sous une source de lumière vive. Après 48 h, les nauplii (larves) écloses ont été utilisées dans l'expérience.

2.2. Méthodes

2.2.1. Extraction et fractionnement

L'extraction de la poudre végétale a été réalisée selon **Prieto et al., (2003)**. La première étape a consisté en une extraction solide-liquide, où une quantité de 100 g de poudre végétale a été macérée à température ambiante trois fois avec 500 mL de méthanol pur. Les filtrats combinés ont été évaporés à basse pression avec un évaporateur rotatif (40 ° C) pour donner l'extrait méthanolique brut. Ce dernier a été dissout dans 100 mL d'une solution hydro-méthanolique (10%) et soumis à une extraction liquide-liquide dans une ampoule de séparation. L'extrait brut a été extrait séquentiellement en utilisant des solvants de polarité croissante, l'hexane, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n-butanol pour donner 4 fractions et la phase aqueuse restante a été désignée comme la cinquième fraction.

2.2.2. Etude phytochimique

2.2.2.1. Composés phénoliques totaux (TPC)

Le contenu phénolique total des fractions a été estimé avec la méthode de **Singleton and Rossi (1965)**. Un mélange de 200 µL d'échantillon et 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu à 10% a été incubé pendant 4 min, puis 800 µL de carbonate de sodium (7,5%) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé pendant 2 heures et l'absorbance a été lue à 765 nm. L'acide gallique a été utilisé comme standard et une courbe d'étalonnage a été préparée dans les mêmes conditions. Les résultats ont été exprimés en µg EAG / mg d'extrait sec (e. s).

2.2.2.2. Flavonoïdes totaux (TFC)

La teneur totale en flavonoïdes a été évaluée selon la méthode au trichlorure d'aluminium. Une quantité de 0,5 mL d'extrait a été mélangée avec le même volume de trichlorure

d'aluminium (2%) et incubée pendant 15 min et l'absorbance a été mesurée à 430 nm. Pour ce test, la quercétine a été utilisée pour préparer une courbe d'étalonnage dans les mêmes conditions et les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g EQ} / \text{mg}$ extrait sec (es) (**Djeridane et al., 2006**).

2.2.2.3. Tanins totaux (TTC)

La teneur totale en tanins de nos fractions a été estimée selon la méthode basée sur leur capacité à précipiter les protéines. Un volume d'échantillon a été mélangé avec deux volumes de BSA (1 mg / mL), puis incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Le mélange a été centrifugé pendant 15 min à 3000 g et le surnageant a été jeté à la fin. Dans une deuxième étape, les plaquettes restantes dans le tube à essai ont été dissoutes dans 4 mL de solution SDS / TEA (1% SDS, 5% v / v TEA dans de l'eau distillée) et 1 mL de FeCl_3 a été ajouté. Le mélange a ensuite été incubé à nouveau pendant 15 min et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le blanc contenait 1 mL de FeCl_3 et 4 mL de solution SDS / TEA. L'acide tannique a été utilisé comme composé de référence et les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g EAT} / \text{mg e. s}$ (**Hagerman and Butler, 1978**).

2.2.2.4. Flavonols totaux (FOL)

Pour évaluer la teneur en flavonols de nos fractions, 1 mL d'échantillon et 1 mL de trichlorure d'aluminium (2%) ont été mélangés avec 1,5 mL d'acétate de sodium aqueux (5%) et incubés à 25 °C pendant 2 heures et 30 min. L'absorbance a ensuite été lue à 440 nm et les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g ER} / \text{mg e. s}$ en utilisant une courbe d'étalonnage préparée avec la rutine (**Kumaran and Karunakaran, 2007**).

2.2.2.5. Tanins condensés (CTC)

L'estimation des tanins condensés a été effectuée selon la méthode de **Sun et al., (1998)**, où un volume de 250 μL d'extrait (1 mg / mL dans le méthanol) a été mélangé avec 625 μL de

vanilline (1% dans le méthanol) et 625 μL d'acide sulfurique (10% dans du méthanol), le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 min et l'absorbance a été mesurée à 500 nm. Une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant la catéchine comme standard et les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g EC} / \text{mg e. s.}$

2.2.2.6. Triterpinoides totaux (TC)

Pour l'estimation des triterpènes, 30 μL d'extrait, 50 μL de vanilline (5% dans l'acide acétique) et 100 μL d'acide perchlorique ont été mélangés. Le mélange a été incubé à 60 °C pendant 45 min, puis refroidi dans un bain de glace et 450 μL d'acide acétique ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 548 nm. L'acide ursolique a été utilisé comme standard pour préparer la courbe d'étalonnage et les résultats ont été exprimés en $\mu\text{g EAU} / \text{mg e. s}$ (**Chang et al., 2012**).

2.2.2.7. Analyse chromatographique des composés phénoliques

a. Chromatographie liquide capillaire-détecteur à barrette de diodes (cLC-DAD)

La méthode de **León-González et al., (2018)** a été adoptée pour analyser la teneur des composés phénoliques des fractions à l'aide d'un instrument Agilent cLC Mod. Série 1100 (Agilent Technologies, Madrid, Espagne), équipé d'une pompe capillaire binaire G1376A, d'un dégazeur G1379A et d'un détecteur à barrette de diodes G1315B (500 nL, 10 mm de longueur de trajet). Une chromatographie liquide haute performance en phase inversée a été réalisée sur une colonne analytique capillaire Synergi Fusion 4 μm C18 (150 mm X 0,3 mm ID) fournie par Phenomenex (Torrance, CA, USA) équipée d'un acier inoxydable externe et maintenue à température ambiante. Une boucle d'injection d'un volume de 10 μL a été placée dans une valve d'injection Rheodyne®. La détection a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV / Vis HP8543 à barrettes de diodes (Agilent Technologies), connecté

au logiciel HP Chemstation. Le logiciel Agilent Chemstation pour Microsoft Windows a été utilisé pour acquérir et analyser des données.

La phase mobile consistait en un gradient de deux solvants, l'acétonitrile (A) et une solution aqueuse 0,1% (v) de TFA à pH 3,2 (B). La composition du gradient était de 8% A pendant 3 min, suivie d'une augmentation linéaire à 34% A pendant 11 min, d'une étape isocratique à 34% A pendant 7 min, puis d'une diminution linéaire à 8% A, qui a été maintenue jusqu'à la fin de l'analyse. Le débit de la phase mobile était de 10 μL / min.

Les polyphénols ont été détectés à 220, 260, 292, 310 et 365 nm et identifiés en fonction de leurs temps de rétention et de leur absorption UV par rapport aux composés purs standard. Les composés ont été quantifiés à leur absorbance maximale, 292 nm pour l'acide gallique, la naringine et l'hespéridine, 365 nm pour la rutine, la quercétine, la myricétine et le kaempférol, et 310 nm pour l'acide chlorogénique, l'acide *trans*-férulique, l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique et le resvératrol, en utilisant leurs courbes d'étalonnage respectives. La gamme de linéarité était de 10-310 μg / L pour l'acide gallique, 10-75 μg / L pour l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, 40-400 μg / L pour l'acide chlorogénique, 20-400 μg / L pour l'acide *p*-coumarique et 15-200 μg / L pour l'acide *trans*-férulique, 30-200 μg / L pour la rutine, 15-60 μg / L pour la naringine, 10-60 μg / L pour le resvératrol, 5-60 μg / L pour la quercétine, 12-60 μg / L pour le kaempférol et 100-500 μg / L pour l'hespéridine. La linéarité a été évaluée en termes de coefficients de corrélation au carré (r^2). Les valeurs de r^2 étaient supérieures à 0,95 pour toutes les courbes d'étalonnage. Toutes les solutions d'injection ont été préparées dans une solution aqueuse à 0,1% (v) de TFA ajustée à pH 3,2 contenant 1% (v / v) d'acétonitrile pur.

b. Chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS / MS)

Les identités des composés ont été corroborées par LC-MS / MS en mode d'ionisation par électro-pulvérisation négative (ESI), en utilisant un système triple quadripôle Shimadzu LC-MS-8030 (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) équipé d'une unité de distribution de solvant Nexera LC-30AD, un échantillonneur automatique Nexera SIL-30AC avec plateau à température contrôlée et un four à colonne CTO-20AC. Une colonne analytique SynergiTM C18 Fusion-RP 80 Å de Phenomenex (150 x 3 mm D.I., 4 µm) à température ambiante a été utilisée comme phase stationnaire. Les données ont été acquises et traitées avec le logiciel Lab Solutions LC-MS fourni par Shimadzu. L'équipement MS / MS utilisait de l'azote comme gaz de nébulisation (1,5 L · min⁻¹) et de séchage (15,0 L · min⁻¹). La fragmentation a été réalisée en utilisant de l'argon comme gaz de collision à une pression de 230 kPa dans la cellule de collision, et les tensions d'énergie de collision appliquées étaient comprises entre 10 et 55 eV. ESI la tension d'ionisation a été fixée à -4,5 kV. Le courant d'interface était fixé à 6,2 µA et la tension du détecteur à 1,84 kV.

Un mélange de méthanol (solvant A) et de solution aqueuse d'acide formique à 0,2% (v / v) (solvant B) a été utilisé comme phase mobile : 5% de solvant A ont été maintenus pendant 0,1 min, une augmentation linéaire à 40% A en 25 min, et à 70% A en 10 minutes supplémentaires. Cette condition a été maintenue pendant 2 min, puis changée aux conditions initiales (5% A) en 1 min et équilibrée pendant 2 min. Le débit était de 0,50 mL / min. La solution d'injection a été préparée comme suit, 40 µL d'extraits de plantes ont été ajoutés à 2,5 mL de méthanol contenant 0,2% (v / v) d'acide formique, puis dilués à 5 mL avec de l'eau de qualité LC / MS. Un volume de 20 µL de ce mélange a été injecté dans le chromatographe. À des fins de quantification, des courbes d'étalonnage ont été effectuées à l'aide d'étalons externes. La gamme de linéarité était de 30-130 µg / L pour l'acide gallique, 10-80 µg / L pour l'acide dihydroxybenzoïque, l'acide *p*-coumarique, l'hespéridine, l'acide caféique et le resvératrol, 10-100 µg / L pour l'acide chlorogénique, 20-80 µg / L pour l'acide *trans*-

férule et le kaempférol, 20-100 µg / L pour la naringine et la rutine, 5-50 µg / L pour la quercétine et la myricétine et 15-130 µg / L pour la catéchine.

2.2.3. Activité antioxydants *in vitro*

2.2.3.1. Neutralisation du radical libre DPPH[•]

Un mélange de 0,5 mL d'une solution méthanolique de DPPH 0,1 mM et de 1,5 mL des fractions ont été incubés dans l'obscurité pendant 30 min et l'absorbance a été mesurée à 517 nm (**Shen et al., 2010**). Le BHT, le BHA (antioxydants synthétiques) et l'acide gallique, la quercétine (composés purs) ont été utilisés comme composés de référence. L'inhibition du radical DPPH a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Ac} - \text{At} / \text{Ac}) * 100$$

Où Ac est l'absorbance du contrôle et At est l'absorbance du test.

Les inhibitions obtenues ont été tracées en fonction des concentrations de l'échantillon et les courbes résultantes ont été utilisées pour calculer l'IC₅₀ (concentration de l'échantillon qui réduit de 50% le DPPH)

2.2.3.2. Neutralisation du radical libre ABTS^{•+}

La capacité de neutralisation des radicaux a été évaluée en utilisant le radical cationique stable ABTS^{•+}, comme décrit par **Re et al., (1999)**. Le radical ABTS^{•+} a été généré en mélangeant une solution ABTS (7 mM) avec 13,24 mg de persulfate de potassium pendant 16 h. La solution résultante a été réfrigérée, puis diluée pour atteindre une absorbance de 0,7 ± 0,02 à 734 nm. 100 µL d'échantillon ont été mélangés avec 1,9 mL de solution ABTS^{•+} et incubés. Après 7 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le BHA (Butyl hydroxy anisole), le BHT (Butyl hydroxy toluène), l'acide gallique et la quercétine ont été utilisés comme composés standard. L'inhibition a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Ac}-\text{At} / \text{Ac}) * 100$$

Où Ac est l'absorbance du contrôle et At est l'absorbance du test.

Les inhibitions obtenues étaient tracées en fonction des concentrations de l'échantillon et les courbes résultantes ont été utilisées pour calculer les IC₅₀ (concentration de l'échantillon qui réduit de 50% l'ABTS).

2.2.3.3. Neutralisation du radical peroxyde d'hydrogène

L'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène a été évaluée sur la base de la méthode de **Ruch et al., (1989)**. Une quantité de 0,50 mL d'échantillon dissous dans du PBS (pH 7,4) a été mélangée à 1 mL d'une solution fraîchement préparée de 20 µM H₂O₂. Le mélange a été incubé dans l'obscurité pendant 10 min, puis l'absorbance a été mesurée à 240 nm. Un blanc a été préparé pour chaque concentration et le contrôle contenait du PBS au lieu de l'extrait. L'acide gallique (GA) et le BHA ont été utilisés comme composés de référence. Le pourcentage d'inhibition du peroxyde d'hydrogène a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ D'inhibition} = (\text{Ac}-\text{At} / \text{Ac}) * 100$$

Où Ac est l'absorbance du contrôle et At est l'absorbance du test.

Les inhibitions obtenues en fonction des concentrations de l'échantillon et les parcelles résultantes ont été utilisées pour calculer l'IC₅₀ (concentration de l'échantillon qui réduit de 50% du H₂O₂)

2.2.3.4. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits a été évalué selon **Oyaizu, (1986)**. En bref, des volumes égaux d'extrait, d'hexacyanoferrate de potassium (1%) et de tampon phosphate (0,2 M - pH 6,6) ont été mélangés et incubés à 50 ° C pendant 20 min. Le même volume de TCA (10%) a été immédiatement ajouté et le mélange a été centrifugé à 700 tr / min pendant 10 min. 1,25

mL du surnageant a été mélangé avec 1,25 mL d'eau milli-Q et 0,5 mL de FeCl₃ (0,1%). Le mélange a été agité et l'absorbance a été lue à 700 nm. Le BHA, le BHT, l'acide gallique et la quercétine ont été utilisés comme composés standard. Une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant de l'acide ascorbique dans les mêmes conditions et les résultats ont été exprimés en équivalents d'acide ascorbique / mg d'extrait (µg EAA / mg d'extrait).

2.2.3.5. Chélation de fer

Pour estimer la capacité de chélation du fer de nos échantillons, 500 µL d'échantillon ont été mélangés avec 100 µL de FeCl₂ (0,6 mM) et 900 µL de méthanol, puis 100 µL de ferrozine (5 mM) ont été ajoutés au mélange après 5 min. Le mélange réactionnel a été agité et incubé pendant 10 min, et l'absorbance a été mesurée à 562 nm (**Le et al., 2007**). Le blanc a été préparé avec tous les réactifs à l'exception de l'extrait. L'EDTA a été utilisé comme composé de référence et les pourcentages de chélation ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ chélation} = (\text{Ac} - \text{At} / \text{Ac}) * 100$$

où Ac est l'absorbance du contrôle et At est l'absorbance de l'échantillon.

Les inhibitions obtenues ont été tracées en fonction des concentrations de l'échantillon et les parcelles résultantes ont été utilisées pour calculer l'IC₅₀ (concentration de l'échantillon qui chélate 50% de fer)

2.2.3.6. Capacité antioxydants totale

La capacité antioxydants totale de nos fractions a été déterminée en utilisant la méthode au phosphomolybdène. En bref, 0,1 mL d'échantillon a été mélangé avec 1 mL de solution de réactif (acide sulfurique 0,6 M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM) et incubé à 95 ° C pendant 90 min. L'absorbance a ensuite été mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol au lieu de l'extrait (**Prieto et al., 1999**). Des composés

standards tels que le BHA, le BHT, l'acide gallique et la quercétine ont été utilisés à des fins de comparaison. Les résultats ont été exprimés en μg équivalents d'acide ascorbique / mg d'extrait en utilisant une courbe d'étalonnage d'acide ascorbique élaborée dans les mêmes conditions.

2.2.3.7. Test de blanchiment du β -carotène

Le test de blanchiment du β -carotène / acide linoléique a été utilisé pour évaluer la capacité des extraits à inhiber la peroxydation lipidique. Comme indiqué par **Tepe et al., (2005)**, l'émulsion de β -carotène a été préparée en mélangeant 0,5 mg de β -carotène, 1 mL de chloroforme et 25 μL d'acide linoléique, puis 200 mg de tween 20 ont été ajoutés au mélange. Le chloroforme a été évaporé sous pression réduite et 100 mL d'eau milli-Q saturée en oxygène ont été ajoutés et agités vigoureusement. Un volume de 2,5 mL de la solution de β -carotène préalablement préparée ont été ajoutés dans des tubes à essai et mélangés avec 350 μL d'extrait. La même procédure a été répétée avec du BHA, du BHT et de l'acide gallique comme témoins positifs (2 mg / mL) tandis que du méthanol et de l'eau ont été utilisés comme témoins négatifs. L'absorbance a été mesurée à 490 nm après 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h et 48 h d'incubation dans l'obscurité à température ambiante. L'inhibition du blanchiment au β -carotène après 24 h a été calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition } 24 \text{ h} = (\text{AE} / \text{AB}) * 100$$

AE: Absorbance en présence de l'extrait ou des standards après T = 0 h.

AB: Absorbance en présence de l'extrait ou des étalons après T = 24 h.

2.2.3.8. Hémolyse oxydative

L'inhibition de l'hémolyse induite par AAPH a été évaluée selon la méthode rapportée par **Miki et al., (1987)**. L'AAPH est utilisé comme initiateur de radicaux pyroxyles pour évaluer

la capacité des extraits à protéger la membrane des globules rouges contre l'hémolyse oxydative provoquée par ce radical libre. Le sang a été collecté sur des souris saines et lavé la première fois avec dix volumes de PBS (pH 7,4) dans une centrifugeuse pendant 10 min à 4000 tr / min. Le surnageant et la couche leucocytaire ont été soigneusement retirés et les globules rouges (GR) ont subi deux lavages de 5 min chacun dans les mêmes conditions. Les GR résultants ont finalement été dilués dans quatre volumes de PBS et utilisés pour ce test dans les 6 heures suivant leur préparation.

Le composé azoïque thermolabile AAPH a été utilisé comme initiateur des radicaux libres pour induire l'hémolyse des globules rouges. Un volume de 0,50 mL de la solution finale de GR a été mélangé avec le même volume de différentes concentrations des fractions dissoutes dans du PBS ou juste du PBS pour le contrôle. La réaction a été démarrée en ajoutant 0,50 mL d'AAPH 200 mM, et le mélange a été agité doucement et incubé pendant 3 h à 37 ° C. Après incubation, le milieu réactionnel a été dilué avec huit volumes de PBS puis centrifugé pendant 5 min à 4000 tr / min. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 540 nm et l'inhibition de l'hémolyse a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Ac-As} / \text{Ac}) * 100$$

où Ac est l'absorbance du contrôle, et As l'absorbance de l'échantillon.

2.2.4. Etude toxicologique

2.2.4.1 Effet larvicide sur *Artemia salina*

La toxicité générale des fractions a été évaluée à l'aide du test BSL développé par **Meyer et al., (1982)** et décrit par **Al-Saeedi et al., (2017)**. Une solution mère d'extrait a été préparée en utilisant du DMSO (1% v / v) et un volume approprié de cette solution a été ajouté à un tube à essai contenant 10 nauplii de crevettes de saumure. Le volume dans le tube à essai a été complété à 5 mL de sorte que les concentrations finales des fractions étaient de 1, 10, 50,

100, 500, 1000 µg / mL. De la même manière, le DMSO (diméthylsulfoxyde) (1%) a été utilisé comme contrôle négatif. Après 24 h d'incubation à température ambiante (25 ° C), un comptage de contrôle a été effectué à l'aide d'une loupe 3 X et le nombre de nauplii survivants a été noté. Les Nauplii étaient considérés comme morts s'ils ne montraient aucun mouvement pendant 30 secondes. Ensuite, le pourcentage de mortalité dans chaque tube a été déterminé et la concentration létale médiane (CL₅₀) a été calculée à l'aide de la méthode d'analyse statistique probit. La mort aléatoire chez le témoin a été mesurée et les données ont été corrigées à l'aide des formules d'Abbott (**Meyer et al., 1982**).

$$\% \text{ Mort} = [(\text{test-contrôle}) / \text{contrôle}] * 100$$

Les critères de toxicité étaient les suivants :

- Mortalité <50% était considérée comme non larvicide,
- Mortalité de 50 à 75% était considérée comme légèrement larvicide,
- Mortalité > 75% était considérée comme hautement larvicide et
- Mortalité de 100% était considérée comme extrêmement larvicide (**Choi, 2017**).

2.2.4.2. Toxicité aiguë

Pour évaluer la toxicité aiguë des fractions choisies, une dose limite de 2000 mg / kg a été testée conformément à la ligne directrice 423 de l'OCDE (**OECD, 2011**). Cette méthode, appelée méthode de la classe de toxicité aiguë, est une étude de toxicité orale aiguë à dose unique qui dure 14 jours. Il s'agit d'une procédure par étapes avec utilisation de 3 animaux du même sexe par étape. La consommation d'eau et de nourriture a été enregistrée quotidiennement et les souris ont été pesées une fois par semaine. Les souris ont été surveillées, pour des signes de toxicité aiguë (douleur aiguë, détresse, diarrhée, troubles de la motilité, convulsions, hypoactivité, douleur abdominale, coma, excitation ou troubles

respiratoires.) quotidiennement avec une attention particulière pendant les 4 premières heures.

2.2.5. Activité anti-inflammatoire

2.2.5.1. Stabilisation membranaire

Une étude préliminaire a été réalisée pour évaluer l'activité anti-inflammatoire potentielle des fractions RM-EA et RM-B en utilisant deux modèles *ex vivo* de stabilisation membranaire. L'hémolyse induite par l'hypotonie sur des GR de souris, développée à l'origine par **Seeman and Weinstein, (1966)** a été le premier modèle utilisé. Brièvement, 1 mL de diverses concentrations d'extrait (dans une solution saline tamponnée au phosphate de sodium hypotonique, NaCl 50 mM dans du PBS 10 mM pH 7,4) a été ajouté à 5 mL de PBS hypotonique puis 500 μ L de suspension érythrocytaire à 10% ont été ajoutés, le contrôle contient tous les réactifs sauf l'extrait ou l'étalon, l'absorbance a été mesurée après 10 min d'incubation suivie d'une centrifugation pendant 10 min (3000 tr / min), l'acide acétylsalicylique a été utilisé comme étalon. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition de l'hémolyse} = (Ac - At / Ac) * 100$$

où Ac est l'absorbance du témoin dans une solution hypotonique et At est l'absorbance de l'échantillon dans une solution hypotonique.

L'hémolyse induite par la chaleur a également été utilisée selon **Shinde et al., (1999)**. Un volume de 5 mL de diverses concentrations d'extrait préparés dans du PBS (PH 7,4) et disposés en 2 séries de tube est mélangé avec 30 μ L de suspension érythrocytaire à 40%, la première série de tubes a été incubée à 54 ° C pendant 20 min tandis que la deuxième a été incubée à 0-5 ° C, après incubation, les tubes ont été centrifugés pendant 3 min (1300 g) et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 540 nm. L'acide acétylsalicylique a été utilisé

comme standard et traité de la même manière. L'inhibition de l'hémolyse a été calculée avec l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition de l'hémolyse} = (At2 - At1 / Ac - At1) * 100$$

Où At1 est l'absorbance de l'échantillon dans une solution non chauffée, At2 est l'absorbance de la solution chauffée de l'échantillon et Ac est l'absorbance du témoin dans une solution non chauffée.

2.2.5.2. Œdème auriculaire induit par le xylène

L'effet anti-inflammatoire des extraits a été étudié à l'aide du modèle d'œdème auriculaire induit par le xylène chez la souris selon **Xu et al., (2014)**. Des souris mâles *SWISS Albino* NMRI pesant de 20 à 25 g ont été utilisées dans ce test. Les souris ont été regroupées au hasard en 5 groupes (n = 7). Le groupe 1 a servi de contrôle négatif et a reçu le véhicule (tween 80 à 5% v / v) à 10 mL / kg p.c, le groupe 2 a servi de contrôle positif et a reçu de la dexaméthasone (1 mg / kg p.c), les groupes 3, 4 et 5 ont reçu l'extrait à 200, 400 et 600 mg / kg p.c, respectivement. L'inhibition de l'œdème a été calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\Delta \text{ poids de l'oreille du contrôle} - \Delta \text{ poids du de l'oreille test}) / (\Delta \text{ poids de l'oreille du contrôle}) \times 100$$

2.2.6. Bioaccessibilité gastro-intestinale *in vitro*

2.2.6.1. Digestion gastro-intestinale *in vitro*

Les fractions RM-EA et RM-B ont été soumises à un processus de digestion *in vitro* en utilisant la procédure décrite par **Gayoso et al., (2018)**. Des échantillons (200 mg) ont été placés dans trois tubes Falcon différents et dissous dans 12 ml d'eau distillée. Les tubes ont été maintenus à 37 ° C dans un bain-marie sous agitation continue. Le pH de la solution a été ajusté à 6,5 avec du bicarbonate de sodium 1 M et la digestion orale a commencé dans les

trois tubes en ajoutant 50 µL d'α-amylase (A1031, 852 unités / mg de protéine) (1,3 mg / ml dans 1 mM de CaCl₂) pendant 2 min. A la fin de cette étape, le tube numéro un a été immédiatement congelé. Cette étape a été suivie par l'ajout de 66 µL de pepsine (P7000, 674 unités / mg de protéine) (160 mg / mL dans 0,1 M HCl) dans les deuxièmes et troisièmes tubes pour simuler la digestion gastrique pendant 2 heures, le pH a été ajusté à 2,5 en utilisant du HCl 3 M. Après, le deuxième tube a été immédiatement congelé. La digestion intestinale a été initiée dans le tube restant en ajoutant 500 µL d'un mélange de pancréatine (P1750, 4 × spécifications de la pharmacopée américaine) (4 mg / mL) et d'extrait de bile (B8631) (25 mg / mL) à pH 7,5 pour 2 heures. Après l'arrêt des réactions enzymatiques par congélation immédiate, les trois tubes ont été centrifugés à 4000 g (rotor A-4-62, centrifugeuse modèle 5810R, Eppendorf) pendant 40 minutes à 4°C et le surnageant, qui est considéré comme la fraction bio accessible, a été collectée et lyophilisée (Cryodos-50, Telstar) pour une analyse plus approfondie. Le surnageant du premier tube représente la fraction bio accessible de la digestion orale (OD), le surnageant du deuxième tube représente la fraction bio accessible de la digestion gastrique (GD) tandis que le surnageant du troisième tube représente la fraction bio accessible de la digestion intestinale (ID). En parallèle, des échantillons non digérés ont été soumis aux mêmes procédures en l'absence d'enzymes digestives. Pour chaque digestion, trois triplicatas indépendants ont été effectués et la bio accessibilité des composés individuels a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Bio accessibilité (\%)} = [(\text{mg de composé dans l'échantillon digéré}) / (\text{mg de composé dans l'échantillon non digéré})] \times 100$$

Le contenu phytochimique et l'activité antioxydants ont été déterminés à l'aide de tests *in vitro* dans des échantillons non digérés et digérés. Avant chaque test, les échantillons lyophilisés ont été dissouts dans du méthanol.

2.2.6.2. Capacité d'absorption des radicaux d'oxygène (ORAC)

L'activité antiradicalaire a été aussi testée contre le radical pyroxyde AAPH en utilisant la méthode ORAC comme décrite par **Prior et al., (2003)**. Le test a été effectué en utilisant un lecteur de microplaque FLUOstar Omega (BMG Labtech, Allemagne) dans une microplaque à 96 puits, où 40 µL de l'échantillon ont été mélangés avec 120 µL de fluorescéine de sodium (132,5 nM dans un tampon phosphate 10 mM) et la fluorescence a été immédiatement mesurée à T0 (longueur d'onde d'excitation de 485 nm et longueur d'onde d'émission de 520 nm). Ensuite, 40 µL de solution AAPH (0,3 M dans un tampon phosphate 10 mM) ont été ajoutés et des lectures ont été prises toutes les 45 secondes pendant une heure. Le trolox (4-250 µM) a été utilisé comme étalon pour tracer une courbe d'étalonnage afin d'exprimer les résultats en µM équivalent Trolox / mg d'extrait.

2.2.7. Innocuité à moyen-terme

2.2.7.1. Concept expérimental

L'effet de l'administration répétée de *R. macrophyllus* Desf. sur la capacité antioxydants plasmatique et les paramètres biochimiques sériques a été étudié selon **Wu et al., (2015)**. Les souris ont été réparties au hasard en 5 groupes (n = 8). Les groupes 1, 2 et 3 ont reçu, par voie orale, l'extrait à 50, 100 et 200 mg / kg de poids corporel (p.c), tandis que le groupe 4 a servi de contrôle positif et a reçu vitamine C (Vit C 100 mg / kg p.c) et enfin, le groupe 5 qui a servi de contrôle négatif a reçu le véhicule (Tween 80 à 5% v/v). L'extrait, la Vit C et le véhicule ont été administrés par voie orale une fois par jour pendant 21 jours consécutifs.

À la fin de la période des 21 jours, les souris ont été mises à jeun pendant 12 h et ont été sacrifiées en sectionnant la veine jugulaire avec une lame chirurgicale, le sang a été recueilli dans des tubes héparinés puis centrifugé à 3000 g pendant 10 min. Le plasma a été soigneusement recueilli et conservé dans un congélateur (-20 ° C) jusqu'à son utilisation. Une

partie du plasma a été utilisée pour étudier la capacité antioxydants en utilisant à la fois des tests de piégeage DPPH et FRAP, et l'autre partie a été utilisée pour analyser les paramètres biochimiques (AST, ALT, ALP, urée et créatinine) à l'aide de kits commerciaux (Spinreact, Espagne). Une petite partie du foie a été rapidement liquéfiée, pesée et homogénéisée dans du KCl glacé (1,5%, p) pour préparer 10% d'homogénat (p / v). L'homogénat a ensuite été centrifugé deux fois à 2000 g pendant 10 min à 4 ° C. Le surnageant a été aliquoté et conservé à -20 ° C jusqu'à utilisation. Cet homogénat a été utilisé pour estimer la catalase, le GSH, le MDA et les protéines totales (kits commerciaux).

2.2.7.2. Inhibition du radical DPPH[•] *in vivo*

Le test DPPH a été effectué sur le plasma selon **Cuendet et al., (1997)**. Un volume de 25 µL de plasma a été mélangé à 625 µL de solution DPPH (0,4% v dans le méthanol). Le mélange résultant a été agité et incubé à température ambiante pendant 30 min dans l'obscurité, et l'absorbance a ensuite été mesurée à 517 nm. L'inhibition a été calculée au moyen de la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Ac-As} / \text{Ac}) * 100$$

où Ac est l'absorbance du tube de contrôle et As est l'absorbance de l'échantillon.

2.2.7.3. Pouvoir réducteur du plasma (FRAP)

La capacité du plasma à réduire le TPTZ ferrique (Fe³⁺ + -TPTZ) en TPTZ ferreux (Fe²⁺ + -TPTZ) a été évaluée en utilisant la méthode modifiée et décrite par **Pulido et al., (2000)**. En bref, une solution fraîche de réactif FRAP a été préparée en mélangeant 2,5 mL de TPTZ (10 mM dans HCl 40 mM) et 2,5 mL de FeCl₃.6H₂O (20 mM) dans 25 mL de tampon acétate (acétate de sodium 300 mM, pH ajusté à 3.6 en utilisant de l'acide acétique). Ce réactif a été pré-incubé à 37 ° C avant utilisation. Dans un tube à essai, 900 µL de réactif FRAP ont été ajoutés à 70 µL d'eau milli-Q et 30 µL d'extrait. L'augmentation de l'absorbance a été évaluée

à 593 nm pendant 30 min à 37 ° C. Une courbe d'étalonnage de FeSO₄.7H₂O (100-2000 µM) a été préparée dans les mêmes conditions pour calculer la valeur FRAP des extraits et des composés standards, les résultats ont été exprimés en µmol FeSO₄ / mg d'extrait.

2.2.7.4. Estimation de la catalase (CAT)

La catalase, dans le tissu hépatique, a été estimée selon la méthode proposée par **Claiborne, (1985)**. Un volume de 50 µL d'homogénat de tissu a été mélangé avec 2950 µL de H₂O₂ (19 mM) préparé dans du tampon phosphate 0,10 M (pH 7,4). La diminution de l'absorbance a été mesurée à 240 nm pendant 2 min. L'activité catalase a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction 43,6 M⁻¹ cm⁻¹ à 240 nm. Les résultats ont été exprimés en UI / mg de protéines.

2.2.7.5. Estimation du glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH), dans l'homogénat tissulaire, a été évalué par la méthode décrite par **Ellman, (1959)**. En bref, 25 uL d'homogénat de tissu ont été dilués dans 5 mL de PBS (0,1 M, pH 8). Ensuite 1,5 mL du mélange ont été prélevés et mélangés avec 10 µL de DTNB (0,01 M). L'absorbance a été enregistrée après 5 min d'incubation à 412 nm. Le GSH a été calculé en utilisant le coefficient d'extinction 1,36 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ à 412 nm, et les résultats ont été exprimés en nmol / g de tissu.

2.2.7.6 Estimation de la peroxydation lipidique (MDA)

L'étendue de la peroxydation lipidique, dans le tissu hépatique, a été estimée selon la procédure établie par **Ohkawa et al., (1979)**. Le mélange réactionnel était composé de 125 µL d'homogénat, 125 µL de TCA (20% p / v) et 250 µL de TBA (0,67% p / v). Le mélange a été incubé pendant 20 min à 100 ° C. Après refroidissement, 1 mL de *n*-butanol froid a été ajouté et le mélange a été centrifugé pendant 10 min à 3000 tr / min. L'absorbance du

surchargeant a été mesurée à 530 nm. Le niveau de MDA a été calculé en utilisant le coefficient d'extinction $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et les résultats ont été exprimés en nmol MDA / g de tissu.

2.3. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicatas et les données ont été analysées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 7.00. Les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs moyennes et d'écart type (SD) pour les tests *in vitro* ou d'erreur standard des moyennes (SEM) pour l'étude *in vivo*. Les différences entre les fractions de plantes et les témoins positifs ont été analysées en utilisant une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie du test post hoc de différence significative de Tukey avec $\alpha = 0,05$. La corrélation linéaire de Pearson a été calculée pour évaluer la corrélation entre les composants bioactifs totaux et les résultats de l'activité biologique. Les données d'extraction ont également été explorées et modélisées à l'aide de l'analyse en composants principaux (ACP) à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

C

hapitre III :

Résultats et Discussion

3. Résultats et discussion

3.1. Fractionnement bio-guidé des racines

3.1.1. Rendement d'extraction et de fractionnement des racines

L'extraction méthanolique des racines de *R. macrophyllus* Desf. a donné un extrait jaunâtre gommeux qui représente $15,3 \pm 1,0\%$ (p / p) de la poudre initiale des racines. Le fractionnement liquide-liquide de l'extrait brut méthanolique avec des solvants de polarité croissante a donné 5 fractions. Le rendement des fractions obtenues est présenté dans la **Figure 17**.

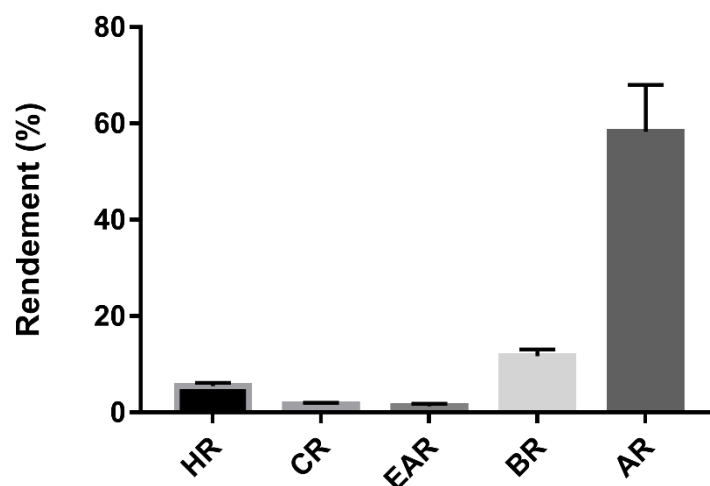


Figure 17 : Rendements des différentes fractions de l'extrait méthanolique de *R. macrophyllus* Desf. HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR : Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction *n*-butanol ; AR : Fraction aqueuse.

La fraction aqueuse (AR) constitue la partie la plus importante de l'extrait brut méthanolique, avec $58,3 \pm 9,7\%$, suivie de la fraction butanolique (BR) avec $11,7 \pm 1,4\%$ et de la fraction hexane (HR) avec $5,5 \pm 0,6\%$, tandis que la fraction chloroforme (CR) et la fraction acétate d'éthyle (EAR) ne représentent que $1,6 \pm 0,4$ et $1,3 \pm 0,5\%$, respectivement. **Khan et al., (2006)** ont signalé un rendement inférieur pour l'extrait brut méthanolique de *R. repens*. Dans la même étude, la fraction chloroforme a représenté 13% de l'extrait méthanolique brut, ce résultat est supérieur à celui trouvé dans notre étude. Le rendement de l'extrait hydro-

éthanolique des racines de *R. ternatus* trouvé par **Deng et al., (2013)** était similaire au notre (16%), le même travail a également rapporté un rendement similaire pour la fraction aqueuse (64,5%). Le rendement d'extraction est affecté par plusieurs facteurs, en plus de la variation inter-espèces, il existe également une variation intra-espèces. La première peut s'expliquer par des facteurs génétiques et environnementaux (**Siddhuraju and Becker, 2003**), tandis que la seconde peut s'expliquer par le choix des méthodes d'extractions et les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (température, pH, temps d'extraction) (**Do et al., 2013**).

3.1.2. Colorimétrie des composés bioactifs

Les polyphénols et les triterpènes ont été quantifiés à l'aide de méthodes colorimétriques et les résultats sont présentés dans le **tableau IV**.

Tableau IV : Quantification colorimétrique des composés phénoliques et des triterpènes dans les différentes fractions des racines de *R. macrophyllus* Desf.

	TPC	TFC	FOL	TTC	CTC	TC
	µg EAG/mg extrait sec	µg EQ/mg extrait sec	µg ER/mg extrait sec	µg EAT/mg extrait sec	µg EC/mg extrait sec	µg EAU/ mg extrait sec
HR	10,4 ^d ± 1,9	0,7 ^c ± 0,01	2,5 ^b ±0,2	0,5 ^b ± 0,2	86,5 ^b ± 0,2	91,3 ^a ± 6,6
CR	110,7 ^b ± 3,7	1,2 ^b ± 0,1	3,8 ^b ±0,2	33,2 ^a ± 2,6	94,1 ^b ± 0,4	64,6 ^b ± 0,8
EAR	271,0 ^a ± 0,2	3,5 ^a ± 0,1	24,3 ^a ± 4,7	31,3 ^a ± 1,0	128,6 ^a ± 9,7	37,6 ^c ± 5,4
BR	46,1 ^c ± 0,9	1,1 ^b ± 0,0	4,6 ^b ± 0,6	1,0 ^b ± 0,1	101,5 ^b ± 11	19,7 ^d ± 1,5
AR	6,0 ^d ± 1,1	0,5 ^d ± 0,0	3,5 ^b ± 0,4	1,4 ^b ± 0,2	106,5 ^b ± 7,9	17,9 ^d ± 6,5

HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR ; Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction *n*-butanol ; AR : Fraction aqueuse ; TPC : Polyphénols totaux ; TFC : Flavonoïdes totaux ; FOL : Flavonols totaux ; TTC : Tannins totaux ; CTC : Tannins condensés ; TC : Triterpènes. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET (n = 3). Les valeurs sur la même colonne avec des lettres exposantes différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$).

La fraction EAR contient les taux les plus élevées de polyphénols totaux, de flavonoïdes totaux et de flavonols. Les tanins totaux sont répartis également entre EAR et CR, tandis que les autres fractions ne contiennent que de petites quantités de ces composés. Les tanins condensés sont présents dans toutes les fractions en quantité similaire, à l'exception de la

fraction EAR qui contient une quantité significativement plus élevée que les autres fractions. Pour les triterpènes, leur contenu diminue avec l'augmentation de la polarité du solvant, la quantité la plus élevée se trouve dans la fraction HR tandis que la quantité la plus faible est observée dans la fraction AR. Les polyphénols totaux des différentes fractions des parties aériennes de *R. sceleratus* étudiés par **Shahid et al., (2015)**, ont montré la même répartition générale des polyphénols entre les solvants mais avec des quantités différentes, la teneur en polyphénols dans les fractions chloroforme, acétate d'éthyle et butanol était inférieure à nos teneurs en polyphénols pour les mêmes fractions, tandis que l'hexane et la fraction aqueuse avaient une teneur en TPC plus élevée que nos fractions correspondantes. La présence de flavonoïdes, de tanins et de terpènes a été signalée pour *R. arvensis* et d'autres espèces mais n'ont pas été quantifiées (**Hachelaf et al., 2013; Khan et al., 2017**).

Dans les mêmes conditions d'extraction (température, temps d'extraction, pH et autres), les facteurs les plus importants qui affectent le rendement d'extraction, exprimés en poids / poids ou en quantité de métabolite extraites, sont le choix du solvant et les propriétés chimiques (polarité) des molécules à extraire (**Do et al., 2013**). Les molécules polaires seront plus solubles dans un solvant polaire tandis que les composés non polaires seront plus susceptibles d'être extraits avec un solvant non polaire (**Ramawat and Mérillon, 2013**). Le méthanol est un excellent solvant pour l'extraction quantitative des composés phénoliques et peut extraire différents groupes de polyphénols et de terpènes (**Oreopoulou et al., 2019**). Le fractionnement avec des solvants de polarités croissantes peut permettre la séparation des composés phénoliques en groupes séparés (**Rafińska et al., 2019**), il a été rapporté que l'acétate d'éthyle peut dissoudre les diterpènes phénoliques et les flavonoïdes aglycones (**Oreopoulou et al., 2019**), tandis que les triterpènes sont souvent extraits avec des solvants non polaires (**Mutai et al., 2007**).

3.1.3. Activité antioxydants *in vitro* (Racines)

3.1.3.1. Inhibition des radicaux libres

L'activité de piégeage des radicaux des différentes fractions a été évaluée contre le DPPH, l'ABTS et le peroxyde d'hydrogène, les résultats sont présentés dans le **Tableau V**. La fraction d'acétate d'éthyle a présenté une forte activité de piégeage des radicaux libres avec une IC_{50} très faible pour le DPPH ($3,7 \pm 0,1 \mu\text{g} / \text{mL}$) et l'ABTS ($80,7 \pm 3 \mu\text{g} / \text{mL}$), cette activité est similaire à celle des antioxydants synthétiques (BHA, BHT) et des composés purs (quercétine, acide gallique) utilisés comme antioxydants de référence. La fraction chloroforme a également montré une très bonne activité antiradicalaire avec une IC_{50} de $19,0 \pm 1,0$ et de $369,1 \pm 19,0 \mu\text{g} / \text{mL}$ pour le DPPH et l'ABTS, respectivement. L'hexane et la fraction aqueuse ont présenté l'activité antiradicalaire la plus faible par rapport aux autres fractions et aux antioxydants standards.

Nous pouvons également voir dans le **Tableau V** que les antioxydants synthétiques et les composés purs naturels avaient une activité antiradicalaire similaire contre le DPPH et l'ABTS. La neutralisation des radicaux libres est l'un des principaux mécanismes par lesquels les polyphénols exercent leur activité antioxydants (**Belščak-Cvitanović et al., 2018**). Cette activité dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyle dans le composé testé. Le piégeage d'un radical libre est réalisé par un don d'atomes d'hydrogène ou le transfert d'un électron (**Shahidi and Ambigaipalan, 2015**).

Tableau V : Activité antiradicalaire et chélation du fer des différentes fractions des racines de *R. macrophyllus* Desf.

	DPPH	ABTS	H ₂ O ₂	Chélation du Fer
	IC ₅₀ (µg/mL)			
HR	81,1 ^d ± 5	9081,0 ^e ± 112,0	380,0 ^c ± 3,5	2366,0 ^c ± 84,0
CR	19,0 ^b ± 1,0	369,1 ^b ± 19,0	709,0 ^f ± 6,0	4978,0 ^e ± 54,0
EAR	3,7 ^a ± 0,1	80,7 ^a ± 3,0	645,0 ^e ± 5,0	> 5000
BR	57,7 ^c ± 2,0	1228,0 ^c ± 33,0	4027,0 ^g ± 34,0	2572,0 ^d ± 51,0
AR	318,8 ^e ± 4,0	6271,0 ^d ± 49,0	>10000	1012,0 ^b ± 30,0
BHA	1,9 ^a ± 0,2	41,1 ^a ± 0,8	80,8 ^a ± 2,0	-
BHT	4,1 ^a ± 0,2	38,5 ^a ± 0,9	-	-
Quercétine	1,3 ^a ± 0,1	19,4 ^a ± 0,1	-	-
Acide Gallique	0,5 ^a ± 0,0	59,0 ^a ± 4,0	278,0 ^b ± 7,0	-
EDTA	-	-	-	22,0 ^a ± 1,0

HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR : Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction *n*-butanol ; AR : Fraction aqueuse ; DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ; ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; BHT : Hydroxytoluène butylé ; EDTA : L'acide éthylène diamine tétra-acétique . Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type des triplicatas, les nombres sur la même colonne avec différentes lettres en exposant sont significativement différents ($p < 0,05$).

Bien que le peroxyde d'hydrogène possède une faible réactivité, il est toujours capable de nuire aux cellules, par sa capacité de pénétrer la membrane cellulaire et d'oxyder un certain nombre de molécules à l'intérieur de la cellule. Il peut également réagir avec des métaux de transition comme le fer pour générer les radicaux hydroxyles, connus pour être très réactifs et destructeurs (Halliwell et al., 2000). En plus d'être physiologiquement produit dans notre organisme, le peroxyde d'hydrogène est également présent naturellement dans les aliments, l'eau et l'air, ce qui augmente notre exposition à cette espèce réactive (Bhatti et al., 2015a). Tout cela souligne l'importance de l'activité antiradicalaire contre le peroxyde d'hydrogène. L'activité anti-peroxyde d'hydrogène a révélé que HR avait une excellente activité ($IC_{50} = 380,0 \pm 3,5 \mu\text{g} / \text{mL}$), avec EAR ($IC_{50} = 645,0 \pm 5,0 \mu\text{g} / \text{mL}$). Ces deux fractions ont une meilleure activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène que les autres fractions ; en même

temps, leur activité reste nettement inférieure à celle des antioxydants de référence. Une activité modérée a été observée pour CR avec une IC_{50} égale à $4027 \pm 34 \mu\text{g} / \text{mL}$, BR a l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène la plus faible. Il est intéressant de noter que pour ce test, l'antioxydant synthétique testé (BHA) a un meilleur effet que l'acide gallique ($IC_{50} = 278,0 \pm 7,0 \mu\text{g} / \text{mL}$). D'autres espèces comme *R. arvensis* et *R. sceleratus*, ont montré des activités antiradicalaires modérées (Khan et al., 2017; Shahid et al., 2015) tandis que *R. reptans* a montré une forte activité antiradicalaire (Paudel et al., 2014).

Pour comprendre la relation entre les métabolites secondaires et l'activité antioxydants observée, et ainsi expliquer la différence entre nos fractions, nous avons effectué une étude de corrélation (Tableau VI). Nous avons constaté que le DPPH et l'ABTS étaient significativement corrélés avec les flavonoïdes totaux ($r = 0,99$), les polyphénols ($r = 0,97$) et les flavonols totaux ($r = 0,96$), ce qui suggère que les polyphénols sont les principaux contributeurs à l'effet anti-radicalaire contre DPPH et ABTS. Ce fait explique aussi les meilleurs résultats de EAR comparée aux autres fractions, car cette fraction a montré des taux supérieurs de TFC, TPC et FOL. Nos résultats dans ce cas sont conformes avec ceux de Kiselova et al., (2006), Li et al., (2009) et Kumar et al., (2014).

Contrairement aux DPPH et ABTS, la capacité d'inhibition du peroxyde d'hydrogène n'était pas significativement corrélée à la teneur phénolique des échantillons, elle était même négativement corrélée avec la teneur en tanins condensés. Cela peut justifier l'activité modérée de EAR contre ce radical libre malgré sa richesse en composés phénoliques. La capacité d'inhibition du peroxyde d'hydrogène de nombreux extraits de plantes n'est pas toujours liée à leur teneur en polyphénols (Bayliak et al., 2016).

Tableau VI : Corrélation de Pearson entre les activités antioxydants et les composés bioactifs.

	DPPH	ABTS	H ₂ O ₂	Chélation de fer	FRAP	TAC	β-Carotène
TPC	0,97*	0,98*	0,19	0,24	0,96*	0,95*	0,71
TFC	0,99*	0,99*	0,19	0,33	0,98*	0,92*	0,62
FOL	0,96*	0,96*	0,06	0,55	0,96*	0,84	0,43
TTC	0,70	0,73	0,23	-0,10	0,69	0,83	0,83
CTC	0,84	0,85	-0,28	0,72	0,83	0,64	0,14
TC	-0,10	-0,12	0,93*	-0,54	-0,06	0,20	0,61

TPC: Polyphénols totaux ; TFC : Flavonoides totaux ; FOL : Flavonoles totaux ; TTC :T totaux ; CTC : Tannins condensés ; TC : Triterpènes.; DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ; ABTS: Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique; H₂O₂: Peroxide d'hydrogene; FRAP: Pouvoir réducteur; TAC: Capacité antioxydants totale.* Corrélation significative ($p < 0,05$).

En fait, l'étude de l'activité anti-H₂O₂ de plusieurs polyphénols comme la diosmine et la narirutine a révélé qu'ils n'avaient pas une telle activité, tandis que d'autres comme la lutéoline-7-O-rutinoside n'avaient qu'une faible activité anti-H₂O₂ (Sroka et al., 2005). Il semble que cette activité ait une certaine exigence de structure, en particulier la position des groupes hydroxyle sur les cycles aromatiques (Sroka et al., 2005).

La capacité des échantillons à piéger le peroxyde d'hydrogène était significativement corrélée à la teneur en triterpènes ($r = 0,93$), ce qui signifie que cette capacité peut être principalement attribuée aux triterpènes bioactifs. Cela se reflète dans l'excellente activité de la fraction hexane contre l'hydrogène peroxyde, étant une fraction riche en triterpènes. De nombreux terpènes se sont révélés être de bons antioxydants, que ce soit dans des études *in vitro* ou *in vivo* (González-Burgos and Gómez-Serranillos, 2012). Les composés bioactifs des végétaux ne sont pas limités aux polyphénols et cela doit donc être pris en considération lors de l'étude de l'activité antioxydants des extraits de plantes.

3.1.3.2. Chélation du fer

Les différentes fractions ont été testées pour leur capacité de chélation du fer et les résultats sont présentés dans le **tableau V**. Toutes les fractions ont montré des capacités de chélation du fer dose dépendantes et différentes ; les fractions peuvent être classées selon leur activité décroissante comme suit: AR> HR> BR> CR> EAR. Par rapport à l'agent de chélation du fer standard EDTA (IC_{50} égale à $22,0 \pm 1,0 \mu\text{g} / \text{mL}$), toutes les fractions ont montré une faible capacité de chélation du fer. Même avec la plus grande quantité de polyphénols, l'EAR a montré la plus faible capacité de chélation du fer. Lors de l'étude de la corrélation (**Tableau VI**) entre les composés bioactifs et la chélation du fer, nous n'avons trouvé aucune corrélation significative entre la chélation du fer et les composés bioactifs quantifiés, pour les CTC ($r = 0,72$) la corrélation était élevée, mais non significative ; pour les polyphénols, cela est conforme à **Chai et al., (2014)** et **Ebrahimzadeh et al., (2008)**. En fait, tous les composés phénoliques ne sont pas de bons agents chélateurs du fer, cette capacité est fortement liée aux caractéristiques structurelles des composés et la présence de certains groupes fonctionnels peut entraver ou renforcer cette capacité (**Andjelković et al., 2006; Zhang and Tsao, 2016**).

3.1.3.3 Pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur est basé sur le transfert d'électrons (**Huang et al., 2005**), c'est un test qui mesure les réducteurs (antioxydants) présents dans un échantillon sur la base d'une réaction colorimétrique (**Hajimahmoodi et al., 2008**). Le pouvoir réducteur de nos fractions est représenté sur la **Figure 18**.

De toutes les fractions étudiées, EAR a montré le meilleur pouvoir réducteur avec une valeur FRAP de $310,4 \pm 1,7 \mu\text{g EAA} / \text{mg e.s.}$ Cette valeur est comparable au pouvoir réducteur du BHT et significativement supérieure aux valeurs de toutes les autres fractions.

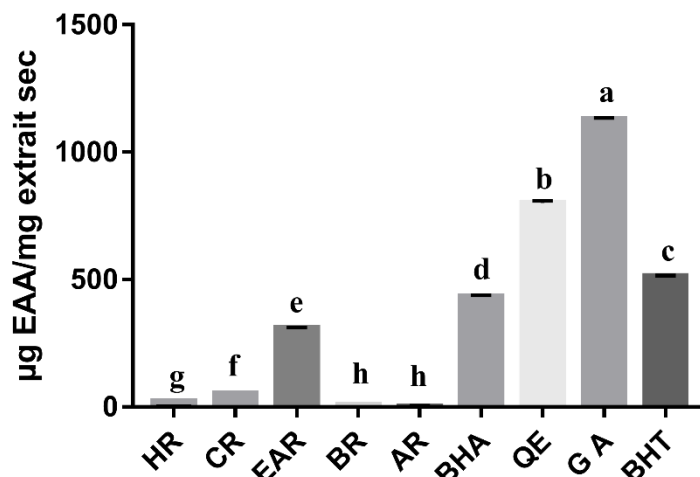


Figure 18 : Pouvoir réducteur des différentes fractions des racines de *R. macrophyllus* Desf., BHA, quercétine, acide gallique et BHT. HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR : Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction n-butanol ; AR : Fraction aqueuse ; BHA : Hydroxyanisol butylé; BHT: Hydroxytoluène butylé; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type des triplicatas, les bars avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$).

La fraction CR a enregistré un pouvoir réducteur modéré ($53,2 \pm 0,5$ $\mu\text{g EAA / mg}$), tandis que le pouvoir réducteur des fractions restantes n'a pas dépassé $21,7 \pm 0,1$ $\mu\text{g EAA / mg}$. Les antioxydants de référence ont eu une activité plus élevée que nos fractions avec une valeur maximale enregistrée pour l'acide gallique ($1129,0 \pm 5,0 \mu\text{g EAA / mg}$) et une valeur minimale pour le BHA ($434,5 \pm 4,0$ $\mu\text{g EAA / mg}$). Les composés purs naturels (quercétine, acide gallique) ont eu un meilleur pouvoir réducteur que les composés synthétiques (BHA, BHT). L'étude de corrélation n'a révélé aucune relation entre la teneur en triterpènes des fractions et leur pouvoir réducteur ($r = -0,06$), tandis qu'une forte relation significative entre les flavonoïdes ($r = 0,98$), les flavonols ($r = 0,96$) et la teneur totale en polyphénols des fractions ($r = 0,96$) a été trouvée. La corrélation avec les tanins totaux ($r = 0,69$) et la teneur en tanins condensés ($r = 0,83$) était élevée, mais non significative. On peut donc supposer que les polyphénols sont les principaux composés responsables du pouvoir réducteur des fractions, et que la fraction avec le plus de polyphénols, présente le meilleur pouvoir réducteur, ce qui est en parfait accord avec d'autres études (Balík et al., 2008; Zhang et al.,

2013; Aklima et al., 2014). Contrairement à nos résultats, Amessis-Ouchemoukh et al., (2014) n'ont pas trouvé de corrélation significative entre la teneur en polyphénols et le pouvoir réducteur. La capacité de réduction de nos échantillons est due à la présence d'agents réducteurs qui agissent comme donneurs d'électrons, à cet égard, les polyphénols sont connus pour être d'excellents donneurs d'électrons (Bendary et al., 2013), leur permettant de piéger les radicaux libres (Loganayaki et al., 2013). De plus, cette capacité de don d'électrons peut leur permettre de régénérer ou de réparer d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E (Shahidi et al., 1992).

3.1.3.4. Capacité antioxydants totale

Le test du phosphomolybdène est un test quantitatif où la TAC est exprimée en équivalents d'acide ascorbique. Au contact de nos fractions, le Mo (VI) est réduit en Mo (V) avec apparition ultérieure du complexe phosphomolybdène (V) de couleur verte. Cette méthode permet d'évaluer la capacité antioxydants hydrosoluble et liposoluble (Prieto et al., 1999). La capacité antioxydants totale (TAC) des différentes fractions et des composés standards est indiquée dans la **Figure 19**. EAR a présenté la capacité antioxydants totale la plus forte ($360,8 \pm 1,3 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$) par rapport aux autres fractions. CR et HR ont montré un TAC modéré avec $210,0 \pm 8,9$ et $153,9 \pm 6,4 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$ respectivement, tandis que BR ($92,6 \pm 1,5 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$) et AR ($84,1 \pm 4,3 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$) ont présenté l'activité la plus faible. L'activité de l'EAR était significativement plus élevée que les composés standards BHA ($284,2 \pm 2,3 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$) et quercétine ($242,5 \pm 7,6 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$), similaire au BHT ($352,6 \pm 6,1 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$), mais toujours plus faible que l'activité de l'acide gallique ($737,0 \pm 1,6 \mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$). Dans ce test, l'acide gallique était meilleur que les antioxydants synthétiques, tandis que la quercétine a présenté une capacité antioxydants totale inférieure à celle du BHA et du BHT.

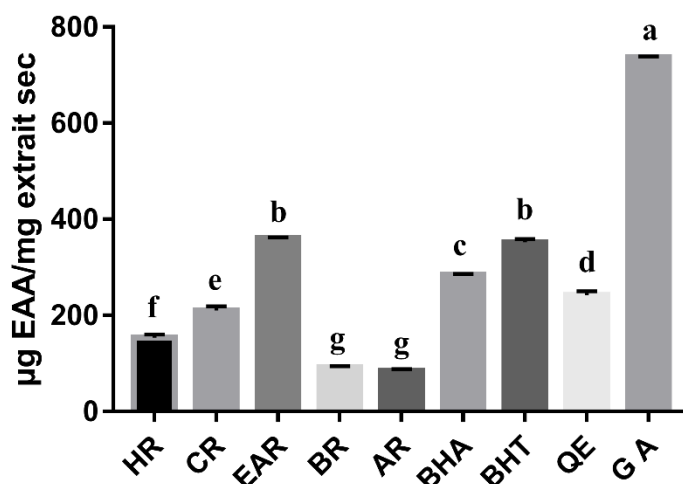


Figure 19 : Capacité antioxydants totale des différentes fractions des racines de *R. macrophyllus* Desf., BHA, quercétine, acide gallique et BHT. HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR : Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction *n*-butanol ; AR : Fraction aqueuse ; BHA : Hydroxyanisol butylé; BHT: Hydroxytoluène butylé; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique . Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type des triplicatas, les bars avec des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$).

Le TAC de l'EAR suggère la présence d'antioxydants efficaces dans cette fraction, l'étude de corrélation a révélé une corrélation significative avec les polyphénols totaux ($r = 0,95$) et les flavonoïdes ($r = 0,92$), la corrélation avec la teneur totale en tanins ($r = 0,83$) et les flavonols ($r = 0,84$) étaient également élevés, mais non significative. Cela montre que les polyphénols sont les principaux contributeurs à cette activité. Donc, les différentes performances des fractions dans ce test sont principalement dues à leurs teneurs différentes en composés phénoliques. **Jan et al., (2013)** et **Zhao et al., (2014)** ont également signalé ce fait, tandis que **Sarikurkcu et al., (2017)** ont constaté que la corrélation n'était significative qu'avec les flavonoïdes et les flavonols. Le fait que HR ait une meilleure activité que BR, malgré sa teneur inférieure en polyphénols, peut suggérer l'implication d'autres composés bioactifs dans l'activité antioxydants totale de la HR. En fait, les caroténoïdes et l' α -tocophérol sont parmi les principaux composés non phénoliques impliqués dans la capacité antioxydants totale des extraits non polaires (**Prieto et al., 1999**). Les triterpènes peuvent être au moins partiellement

responsables de l'activité de la fraction HR. **Sarikurkcu et al., (2017)** ont constaté que ces composés étaient significativement corrélés avec la TAC de plusieurs extraits de plantes.

3.1.3.5. Test de blanchiment du β -carotène

Le β -carotène est un pigment naturel rouge-orange et un puissant antioxydants, lorsqu'il est oxydé par un radical ou un agent oxydant, le β -carotène se décolore rapidement. Dans le test de blanchiment du β -carotène, les radicaux sont générés par l'auto-oxydation de l'acide linoléique en présence d'oxygène, l'ajout d'un autre antioxydants avec le β -carotène empêchera ou retardera sa décoloration. Plus l'antioxydants est fort, plus la décoloration est retardée, cet effet est dû à la compétition entre le β -carotène et l'autre antioxydants présent dans le système.

La capacité de nos échantillons et étalons à inhiber le blanchiment au β -carotène est résumée dans **la Figure 20**. Tous les échantillons ont pu retarder la décoloration de la solution de β -carotène à différentes échelles comme le montre la cinétique de blanchiment du β -carotène dans la **Figure 20.b** et **20.a** pour les standards.

EAR et CR ont donné les meilleurs résultats, elles ont inhibé le blanchiment du β -carotène de $81,0 \pm 0,5\%$ et $80,2 \pm 0,8\%$ respectivement, et cela après 24 h. En même temps, le taux d'inhibition des HR était de $59,0 \pm 0,2\%$ tandis que le taux d'inhibition du BR n'était que de $26,6 \pm 4,6\%$. On peut dire qu'après 24h, l'effet de la AR était très faible ($12,7 \pm 1,5\%$) et même similaire au méthanol utilisé comme contrôle négatif. L'EAR et la CR ont eu un meilleur effet que l'acide gallique ($71,7 \pm 5,0\%$) et les antioxydants synthétiques ont la meilleure inhibition du blanchiment du β -carotène. Après 24h, l'inhibition du BHA était de $96,9 \pm 2,3\%$ et celle du BHT de $94,4 \pm 0,5\%$ (**Figure 20.c**). Le blanchiment du β -carotène était corrélé avec les différents composés bioactifs dans l'ordre suivant, TTC ($r = 0,83$) > TPC

($r = 0,7$) > TFC ($r = 0,62$) > TC ($r = 0,6$) > FOL ($r = 0,42$) > CTC ($r = 0,13$), mais aucune n'était significative.

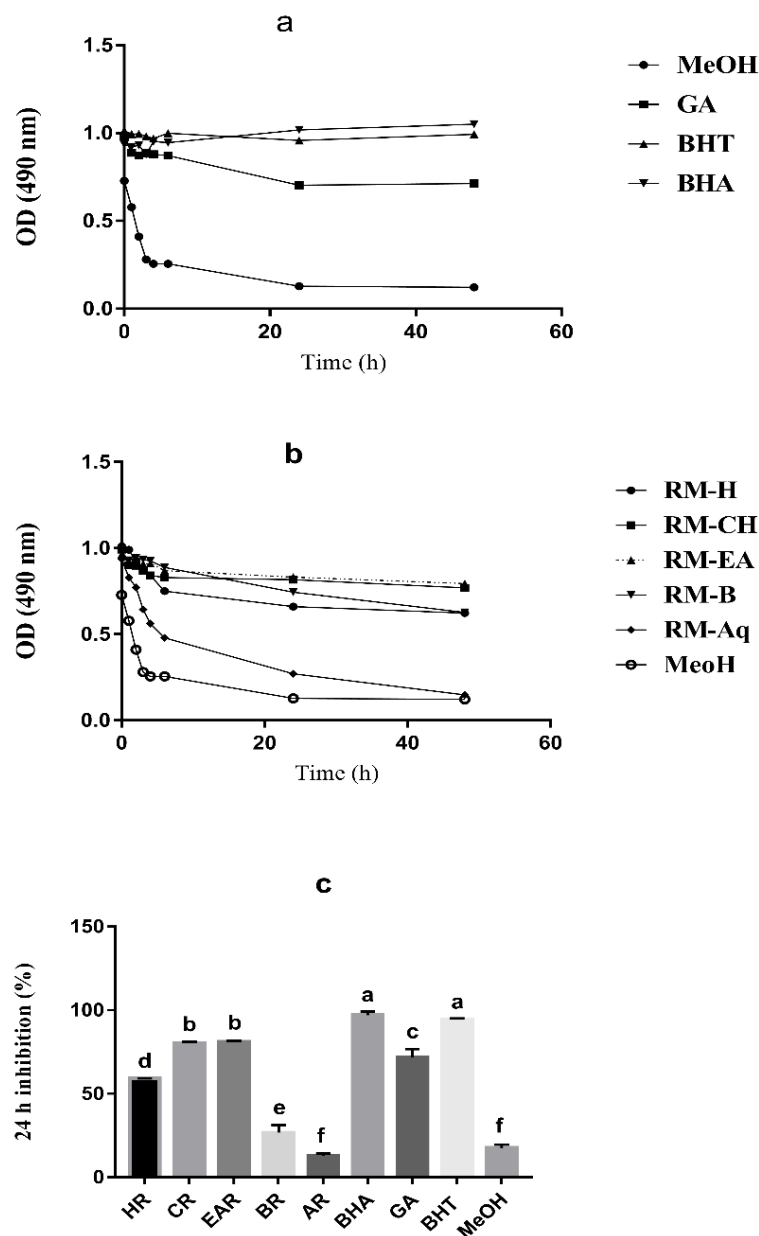


Figure 20 : Test de blanchiment du β -carotène des racines *R. macrophyllus* Desf, (a) Cinétique du blanchiment du β -carotène pour le BHA, le BHT, l'acide gallique et le méthanol (MeOH). (b) Cinétique du blanchiment au β -carotène pour différentes fractions et le méthanol. (c) Inhibition du blanchiment au β -carotène après 24 h pour les fractions, les standards et le méthanol. HR : Fraction hexane ; CR : Fraction chloroforme ; EAR : Fraction acétate d'éthyle ; BR : Fraction *n*-butanol ; AR : Fraction aqueuse ; BHA : Hydroxyanisol butylé ; BHT: Hydroxytoluène butylé ; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique . Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ ET des triplicatas. Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes $p < 0,05$.

Nous pouvons suggérer que le blanchiment du β -carotène est le résultat d'une synergie entre les différents composants d'un échantillon. **Sarikurkcü et al., (2017)** ont signalé une corrélation significative du blanchiment du β -carotène uniquement avec le FOL, mais pas avec le TPC, le TFC et le TC.

Alors que d'autres tests comme FRAP sont basés sur la capacité de transfert d'électrons des réducteurs dans un échantillon, le blanchiment du β -carotène est un test basé sur le transfert d'hydrogène (**Nićiforović et al., 2017**). En fait, les polyphénols sont connus pour réagir avec les radicaux lipidiques par transfert d'atomes d'hydrogène (**Prior et al., 2005**), ainsi la bonne activité de blanchiment du β -carotène de nos échantillons reflète leur excellente capacité de don d'hydrogène.

Nous pouvons voir d'après les résultats de la **figure 20.c** que les fractions non polaires (HR et CR) avaient une meilleure activité que les fractions polaires (BR et AR), cela peut être expliqué par la polarité des réducteurs dans les fractions non polaires. En effet, le milieu réactionnel du β -carotène est une émulsion d'acide linoléique, par conséquent les molécules non polaires auront un meilleur accès aux radicaux lipidiques que les molécules polaires (**Nićiforović et al., 2017**) à cet égard, la richesse des HR et CR en triterpènes liposolubles doit être pointée car ils peuvent être partiellement responsables de cette activité.

3.1.4. Analyse cLC-DAD et LC-MS / MS des composés phénoliques des racines

L'estimation colorimétrique des composés bioactifs et l'étude de corrélation ont révélé que l'EAR avait la teneur en polyphénols la plus élevée et les meilleures activités antioxydants. En outre, la plupart des activités étaient fortement corrélées avec la teneur en polyphénols. Par conséquent, le profil en polyphénols d'EAR a été étudié à l'aide de LC-DAD capillaires et LC-MS / MS.

Nous pouvons voir dans le **tableau VII** le mélange de composés identifiés et quantifiés à partir de la fraction d'acétate d'éthyle des racines de *R. macrophyllus* Desf. Ce mélange contient de grandes quantités d'acides phénoliques et de flavonoïdes. Les deux catégories d'acides phénoliques étaient présentes, les dérivés d'acide cinnamique tels que l'acide chlorogénique ($3,5 \pm 0,2 \text{ mg / g d'extrait sec}$), caféique ($6,7 \pm 0,4 \text{ mg / g d'extrait sec}$), *p*-coumarique ($3,0 \pm 0,1 \text{ mg / g d'extrait sec}$) et l'acide *trans*-férulique ($2,1 \pm 0,1 \text{ mg / g d'extrait sec}$); et les dérivés d'acide benzoïque comme l'acide gallique ($9,27 \pm 0,6 \text{ mg / g d'extrait sec}$) et l'acide dihydroxybenzoïque ($8,1 \pm 0,2 \text{ mg / g}$). Les flavonoïdes identifiés étaient l'hespéridine ($5,9 \pm 0,6 \text{ mg / g}$) et la rutine, cette dernière n'a été détectée que par LC-MS / MS, cela peut s'expliquer par la sensibilité de la méthode pour ce composé particulier, le stilbène resvératrol ($3,3 \pm 0,2 \text{ mg / g d'extrait sec}$) a également été identifiée.

D'après la littérature consultée il semblerait que les composés mentionnés soient identifiés et quantifiés pour la première fois dans les racines de *R. macrophyllus* Desf. L'acide *trans*-férulique a été détecté dans *R. muricatus* (**Da-Cheng, 2018**), tandis que l'acide *p*-coumarique et l'acide gallique ont également été précédemment détecté dans les racines de *R. ternatus* (**Deng et al., 2013; Da-Cheng, 2018**). L'acide caféique et la rutine ont été signalés pour *R. arvensis* (**Bhatti et al., 2015a**). En se basant sur la littérature (en particulier des revues sur le genre *Ranunculus*, **Aslam et al., 2012** et **Da-Cheng, 2018**), il semblerait que l'hespéridine, l'acide chlorogénique et le resvératrol sont détectés pour la première fois dans le genre *Ranunculus*.

Tableau VII : Conditions optimisées pour l'analyse cLC-DAD et LC-MS / MS des polyphénols des racines *R. macrophyllus* Desf : résultats d'identification et de quantification.

Composé	cLC-DAD			LC-MS/MS					
	Rt,	UV ^a ,	Quantité	Rt,	Ion Précurseur, <i>m/z</i> [M-H] ⁻	Transition de	Transitions de Confirmation		Quantité extraite (mg/g extrait sec)
	min	nm	extraite (mg/g extrait sec)	min		Quantification Ion produit I, <i>m/z</i> (Ce, eV) ^b	Ion produit II, <i>m/z</i> (Ce, eV) ^b	Ion produit III, <i>m/z</i> (Ce, eV) ^b	
A. Gallique	3,7	292	9,3± 0,6	6,25	169,00	125,10 (19)	79,05 (23)	53,10 (20)	LOD ^c
A. Dihydroxybenzoïque	5,09	260	8,1± 0,2	10,22	153,00	109,05 (16)	108,10 (25)	53,05 (25)	LOD
A. Chlorogénique	8,29	260	3,5± 0,2	16,76	353,10	191,05 (16)	85,10 (44)	93,1 (42)	LOD
A. Caféique	10,44	310	6,7± 0,4	18,07	179,00	135,05 (18)	134,00 (30)	89,05 (34)	LOD
A. <i>p</i>-Coumarique	12,95	310	3,0± 0,1	23,00	163,00	119,05 (17)	93,05 (31)	117,10 (34)	LOD
A. <i>Trans</i>-Férulique	13,74	310	2,1± 0,1	23,98	193,20	134,00 (18)	178,00 (17)	149,10 (15)	LOD
Hespéridine	15,35	292	5,9± 0,6	27,56	609,10	301,15 (23)	286,15 (48)	164,05 (55)	LOD
Rutine	-	-	nd	28,47	609,00	300,10 (42)	300,95 (33)	271,05 (45)	LOD
Resvératrol	17,18	310	3,3± 0,2	30,71	227,10	143,10 (25)	113,00 (10)	69,10 (21)	n.d

^a Longueur d'onde utilisée pour la quantification.^b Énergie de collision en électron-volt^c LOD: déterminé aux niveaux de la limite de détection de la méthode; n.d: non détecté; Rt: temps de rétention

Il est essentiel de souligner l'importance des composés identifiés, car ils sont largement répandus dans les fruits et légumes et constituent donc l'un des groupes de polyphénols les plus courants dans l'alimentation humaine. En fait, les quantités trouvées dans notre étude sont similaires ou supérieures à celles trouvées dans les sources de polyphénols courantes. La quantité de resvératrol trouvée est similaire aux niveaux de resvératrol dans les pépins de raisin rouge et blanc (**Counet et al., 2006**), dans la même étude, nous pouvons voir que la quantité d'acide *trans*-férulique dans l'extrait de chocolat ($2,4 \pm 0,1$ mg / g d'extrait sec) est similaire à la quantité que nous avons trouvée dans la présente étude ($2,1 \pm 0,1$ mg / g de). La quantité d'héspéridine, connue sous le nom de glucoside d'écorce d'orange, dans notre étude était supérieure à sa quantité dans *Citrus mitis* Blanco ($1,5 \pm 0,2$ mg / g de) (**Lou et al., 2014**), les quantités d'acide gallique et d'acide *trans*-férulique dans les écorces d'ananas sont inférieures à la quantité que nous avons trouvée dans les racines de *R. macrophyllus* Desf. (**Li et al., 2014**). La teneur en acide caféique est presque 30 fois plus élevée que dans les racines de betterave rouge (*Beta vulgaris*) tandis que la teneur en acide chlorogénique est 17 fois plus élevée que dans les tiges de betterave rouge (**Ben haj koubaier et al., 2014**). De plus, les racines de *R. macrophyllus* Desf. contiennent de bonnes quantités de dérivés d'acide hydroxybenzoïque, c'est très important surtout quand on sait que les niveaux de ces composés sont très faibles dans les plantes comestibles, sauf dans certains fruits rouges (**Gómez-Maqueo et al., 2018**). Les racines *R. macrophyllus* Desf. Constituent donc une bonne source de dérivés d'acide hydroxybenzoïque. Ils peuvent être considérés également comme une source appréciable de polyphénols de haute valeur ayant un intérêt potentiel dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique et alimentaire, comme l'acide *trans*-férulique, l'héspéridine et le resvératrol.

Malgré les très bons résultats obtenus et à cause du très faible rendement de la fraction active EAR et son insolubilité dans les solutions aqueuse nous avons interrompu les tests sur cette fraction.

3.2. Fractionnement bio-guidé des parties aériennes

3.2.1. Rendements d'extraction et de fractionnement

La macération à température ambiante de la poudre végétale des parties aériennes a donné un extrait méthanolique brut verdâtre semi-solide qui représente 22,35% (p /p matière sèche). La séparation liquide-liquide de l'extrait méthanolique avec des solvants de polarité croissante a donné cinq fractions avec les rendements suivants 12,72% (RM-H), 0,67% (RM-CH), 3,1% (RM-EA), 12,03% (RM-B), 61,46% (RM-Aq) (**Figure 21**).

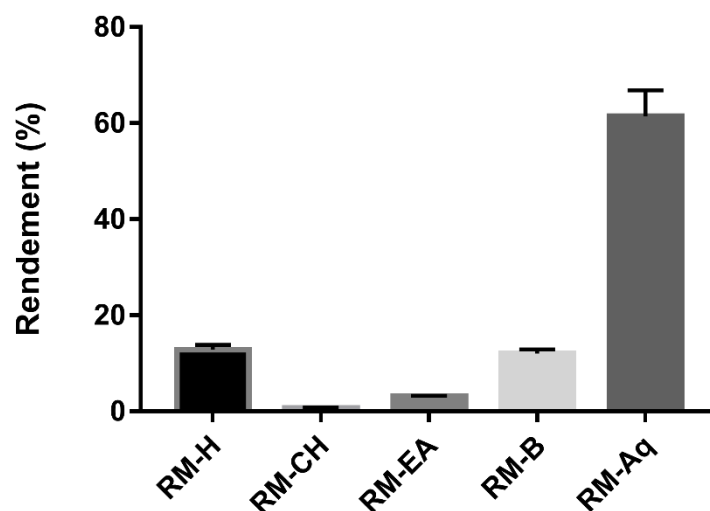


Figure 21 : Rendements des différentes fractions de l'extrait méthanolique de *Ranunculus macrophyllus* Desf. RM-H : Fraction hexane ; RM-CH : Fraction chloroforme ; RM-EA : Fraction acétate d'éthyle ; RM-B : Fraction *n*-butanol ; RM-Aq : Fraction aqueuse.

Les travaux antérieurs sur *R. peltatus* ont rapporté un rendement de 3,7% (p/p de matière fraîche) pour l'extrait méthanolique brut et pour les fractions les rendements suivants ont été obtenus, *n*-hexane (4%), chloroforme (9%), acétate d'éthyle (4%) *n*-butanol (5%) et aqueux (78%) (**Prieto et al., 2008**). Montrant des rendements inférieurs pour l'extrait méthanolique brut, l'hexane et le *n*-butanol, des rendements supérieurs pour le chloroforme et des

rendements similaires pour l'acétate d'éthyle et la fraction aqueuse par rapport à nos résultats. Pour *R. sceleratus*, **Shahid et al., (2015)** ont rapporté 12,2% (p / p de matière sèche) pour l'extrait méthanolique brut tandis que pour les différentes fractions, les rendements étaient de 15,21% pour l'hexane, 19,02% pour le chloroforme, 21,73% pour l'acétate d'éthyle, 10,86 pour le *n*-butanol et 21% pour la fraction aqueuse. Ces rendements sont inférieurs pour l'extrait méthanolique brut et la fraction aqueuse, plus élevés pour l'acétate d'éthyle et le chloroforme et similaires pour le *n*-butanol et l'hexane. De nombreux facteurs influencent le rendement d'extraction, y compris le solvant d'extraction, la zone de croissance de la plante, le stade de maturité de l'échantillon récolté, la manipulation post-récolte est également un facteur clé (**Siddhuraju and Becker, 2003**).

3.2.2. Colorimétrie des composés bioactifs

Les fractions résultantes de la séparation liquide-liquide ont été soumises à des dosages colorimétriques pour estimer leurs teneurs en métabolites secondaires et les résultats sont présentés dans le **Tableau VIII**.

La fraction d'acétate d'éthyle contient des niveaux très élevés de composés phénoliques et de triterpènes. Elle présente la plus grande quantité de polyphénols totaux ($413,0 \pm 4,0$ EAG / mg d'extrait), de flavonoïdes totaux (49 ± 1 EQ / mg d'extrait), de flavonols ($263,6 \pm 0,6$ ER / mg d'extrait) et de tanins condensés (92 ± 1 EC / mg d'extrait). La fraction d'hexane, quant à elle, présente la teneur la plus élevée en tanins totaux (69 ± 2 EAT / mg d'extrait) et des triterpènes (74 ± 6 EAU / mg d'extrait).

Tableau VIII : Estimation colorimétrique de la teneur en métabolites secondaires des différentes fractions de *Ranunculus macrophyllus* Desf.

	TPC µg EAG/mg extrait sec	TFC µg EQ/mg extrait sec	FOL µg ER/mg extrait sec	TTC µg EAT/mg extrait sec	CTC µg EC/mg extrait sec	TC µg EAU/mg extrait sec
RM-H	21,8 ^c ±0,7	6,89 ^d ±0,09	7,0 ^e ±1,0	69,0 ^a ±2,0	84,0 ^a ±7,0	74,0 ^a ± 6,0
RM-CH	245,0 ^b ±7,0	16,0 ^c ± 1,0	13,9 ^d ±0,5	29,0 ^b ± 4,0	66,0 ^a ±6,0	40,6 ^b ±0,5
RM-EA	413,0 ^a ±4,0	49,0 ^a ±1,0	263,6 ^a ±0,6	1,5 ^c ± 0,1	92,0 ^a ±1,0	70,0 ^a ±2,0
RM-B	256,0 ^b ±7,0	40,0 ^b ± 2,0	159,0 ^b ± 5,0	6,0 ^c ±1,0	76,0 ^a ± 6,0	27,6 ^c ±0,9
RM-Aq	25,0 ^c ±1,0	5,0 ^d ±0,7	27,9 ^c ±0,5	2,2 ^c ±0,7	39,6 ^b ±0,7	17,2 ^d ±0,5

RM-H : Fraction hexane ; RM-CH : Fraction chloroforme ; RM-EA : Fraction acétate d'éthyle ; RM-B : Fraction *n*-butanol ; RM-Aq : Fraction aqueuse. TPC: Teneur total en polyphénols; TFC: Teneur totale en flavonoïdes; FC: Teneur en flavonol; TTC: Teneur totale en tanins; CTC: Teneur en tanins condensés; TC: Teneur en triterpènes. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET (n = 3). Les valeurs sur la même colonne avec différentes lettres en exposant sont significativement différentes ($p < 0,05$).

La fraction aqueuse semble être la plus pauvre parmi toutes les fractions car elle contient de faibles quantités de toutes les classes de métabolites secondaires. Le TPC des différentes fractions de *R. sceleratus* a été étudié par **Shahid et al., 2015** et les résultats obtenus étaient les suivants : 24 ± 1 µg EAG / mg d'extrait pour la fraction hexane, 73,3 µg EAG / mg d'extrait pour la fraction chloroforme, 97,1 µg EAG / mg d'extrait pour la fraction d'acétate d'éthyle, 79,6 et 64,6 µg EAG / mg d'extrait pour le *n*-butanol et la fraction aqueuse. Les résultats retrouvés par **Shahid et al., 2015** suggèrent la même répartition générale des composés phénoliques entre les différentes fractions mais avec des quantités plus faibles. La polarité du solvant détermine la nature des molécules extraites (**Ashraf et al., 2016**). Il est également important de noter que les différentes propriétés chimiques des différentes classes de molécules affectent leur extractibilité (**Ramawat and Mérillon, 2013**).

3.2.3. Activité antioxydants *in vitro*

3.2.3.1. Inhibition des radicaux libres

L'activité antiradicalaire des différentes fractions a été testée contre le DPPH, ABTS et le peroxyde d'hydrogène et les résultats sont résumés dans le tableau IX.

Tableau IX : Activité antiradicalaire et chélation du fer des différentes fractions des parties aériennes de *R. macrophyllus* Desf.

	DPPH	ABTS	H ₂ O ₂	Chélation du Fer
	IC ₅₀ (µg/mL)			
RM-H	46,8 ^d ± 8,2	1533,6 ^d ± 69,8	391,1 ^d ± 14,1	810,3 ^a ± 7,9
RM-CH	31,8 ^c ± 1,7	175,9 ^b ± 10,1	306,6 ^c ± 13,5	> 15000
RM-EA	1,6 ^a ± 0,2	77,5 ^a ± 1,4	190,0 ^b ± 13,7	6067,5 ^c ± 794,0
RM-B	4,2 ^{ab} ± 0,2	247,4 ^b ± 10,8	625,6 ^e ± 13,6	2069,4 ^b ± 269,9
RM-Aq	10,7 ^b ± 1,6	812,6 ^c ± 38,0	4186,8 ^f ± 8,7	792,9 ^a ± 25,4
BHA	1,9 ^a ± 0,2	41,1 ^a ± 0,8	80,8 ^a ± 2,0	-
BHT	4,1 ^{ab} ± 0,2	38,5 ^a ± 0,9	-	-
Quercétine	1,3 ^a ± 0,1	19,4 ^a ± 0,1	-	-
Acide Gallique	0,5 ^a ± 0,0	59,0 ^a ± 4,0	278,0 ^c ± 7,0	-
EDTA	-	-	-	22,0 ^a ± 1,0

RM-H : Fraction hexane ; RM-CH : Fraction chloroforme ; RM-EA : Fraction acétate d'éthyle ; RM-B : Fraction n-butanol ; RM-Aq : Fraction aqueuse. DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ; ABTS: Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique); BHA: Hydroxyanisole butylé; BHT: Hydroxytoluène butylé; EDTA: L'acide éthylène diamine tétra-acétique . Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart type de triplicatas. Les valeurs dans la même colonne avec des différents chiffres en exposant sont significativement différents ($p < 0,05$).

La fraction RM-EA a montré une activité antiradicalaire exceptionnelle contre les trois radicaux libres testés dans l'ordre suivant DPPH (1,6 µg/mL) > ABTS (77,5 µg/mL) > H₂O₂ (190 µg/mL) avec des IC₅₀ très basse. Dans tous les cas, l'activité de cette fraction était similaire ou significativement supérieure à celle des antioxydants standards naturels et synthétiques. L'activité des fractions RM-B et RM-CH était modérée contre les trois radicaux libres. Il est tout de même intéressant de mentionner que pour le peroxyde d'hydrogène la fraction RM-CH (306,6 µg/mL) a donné une activité similaire à celle de l'acide gallique.

Bien que, l'activité de la fraction RM-H était faible contre le DPPH et l'ABTS, cette fraction a montré une activité modérée contre le peroxyde d'hydrogène (391,1 µg/mL), alors que La fraction RM-Aq a montré une activité antiradicalaire faible contre tous les radicaux testés.

Les mêmes fractions obtenues de *R. scleratus* (Shahid et al., 2015) ont généralement exhibé une faible activité contre le radical DPPH. L'extrait méthanolique de *R. arvensis* (Khan et al., 2017) et les fractions hexane et éthyle acétate de *R. marginatus* et *R. sprunerianus* (Kaya et al., 2010) ont montré une faible activité antiradicalaire contre le DPPH. Alors que les extraits éthanoliques de *R. sardous* et *R. ficaria* (Neag et al., 2017) ont montré une meilleure activité contre le radical ABTS. De même, l'extrait chloroformique de *R. arvensis* a montré une meilleure activité contre le peroxyde d'hydrogène que la même fraction dans notre étude. La différence entre les résultats peut être expliquée d'abord par la méthode d'extraction et la nature du solvant utilisé et en cas d'utilisation de la même méthode d'extraction, la variation de la composition chimique entre les différentes espèces reste un facteur déterminant (Righi et al., 2020).

3.2.3.2. Chélation du fer

La capacité des différentes fractions à lier les ions de fer a été testée et les résultats sont montrés dans le **tableau IX**. La fraction d'hexane (IC_{50} : $810,3 \pm 7,9$ µg/mL) et la fraction aqueuse ($792,9 \pm 25,4$ µg/mL) ont présenté la meilleure capacité à chélater les ions de fer, leur effet est similaire à celui de l'EDTA (agent chélateur du fer) qui a une IC_{50} de 22 ± 1 µg/mL et ça malgré leurs taux faibles en composés phénoliques. Les Fractions acétate d'éthyle et de butanol ont exhibé une faible capacité à lier les ions de fer avec un effet dose dépendant, alors que la fraction de chloroforme n'a montré aucun effet dose dépendant ($IC_{50} > 15000$ µg/mL).

3.2.3.3. Pouvoir réducteur

L'un des mécanismes d'action des polyphénols est le don d'hydrogène ou d'électrons, cette capacité a été estimée pour nos fractions à l'aide du test du pouvoir réducteur (**Figure 22**).

Parmi les cinq fractions étudiées, la fraction d'acétate d'éthyle se distingue par son pouvoir réducteur exceptionnel de 514 ± 8 $\mu\text{g EAA} / \text{mg}$ d'extrait meilleur que le pouvoir réducteur de l'antioxydant synthétique BHA. Un pouvoir réducteur modéré a été observé pour la fraction butanol (148 ± 4 $\mu\text{g EAA} / \text{mg}$ d'extrait) et la fraction chloroforme (76 ± 8 $\mu\text{g EAA} / \text{mg}$ d'extrait), tandis que la fraction aqueuse et la fraction hexane ont montré le pouvoir réducteur le plus faible. L'acide gallique a montré le pouvoir réducteur le plus fort. L'extrait éthanolique de *R. Laetus* a montré un pouvoir réducteur modéré ($152,1$ $\mu\text{g EAA} / \text{mg}$ d'extrait) par rapport à nos résultats (**Khalid et al., 2016**).

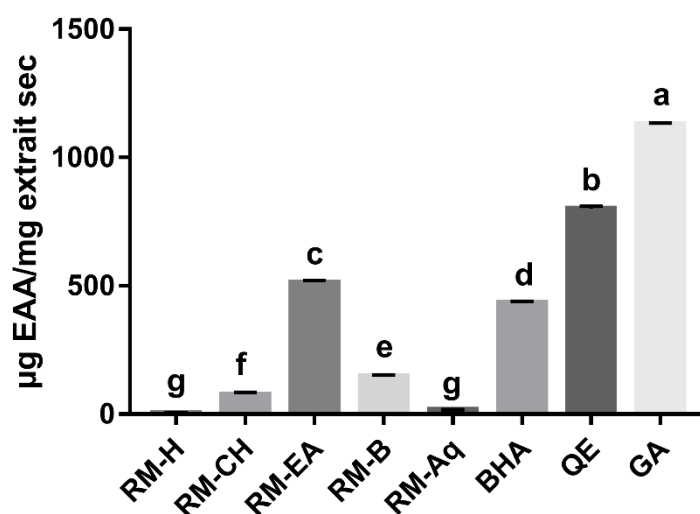


Figure 22 : Pouvoir réducteur des différentes fractions de *R. macrophyllus* Desf et des standards. RM-H : Fraction hexane ; RM-CH : Fraction chloroforme ; RM-EA : Fraction acétate éthyle ; RM-B : Fraction butanol ; RM-Aq : Fraction aqueuse ; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique ; BHA : Hydroxyanisole butylé. Les bars avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

Bhatti et al., (2015) ont étudié le pouvoir réducteur de l'extrait hydro-méthanolique de *R. arvensis* et l'ont trouvé également modéré ($283,9$ $\mu\text{g EAA} / \text{mg}$ d'extrait). Le pouvoir

réducteur affiché par les différentes fractions pourrait être dû à la présence de réducteurs dans nos fractions.

3.2.3.4. Capacité antioxydants totale

La capacité antioxydants totale (TAC) des différentes fractions des parties aériennes de *R. macrophyllus* Desf. a été évaluée en utilisant la méthode du phosphmolybdène (**Figure 23**). La fraction acétate d'éthyle a présenté une puissante capacité antioxydants total (TAC) de 447 ± 7 $\mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$, ce qui est nettement supérieur au TAC présenté par les composés de référence BHA, BHT et quercétine, mais elle reste nettement inférieure au TAC d'acide gallique (754 ± 7 $\mu\text{g EAA} / \text{mg d'acide gallique}$). La fraction butanol a montré un TAC plus élevé que la quercétine, tandis que l'effet de la fraction chloroforme était similaire à celui de la quercétine. Les fractions hexane et aqueuses ont montré un TAC modéré avec $158,17 \pm 4,92$ et $118,83 \pm 1,89$ $\mu\text{g EAA} / \text{mg d'extrait}$.

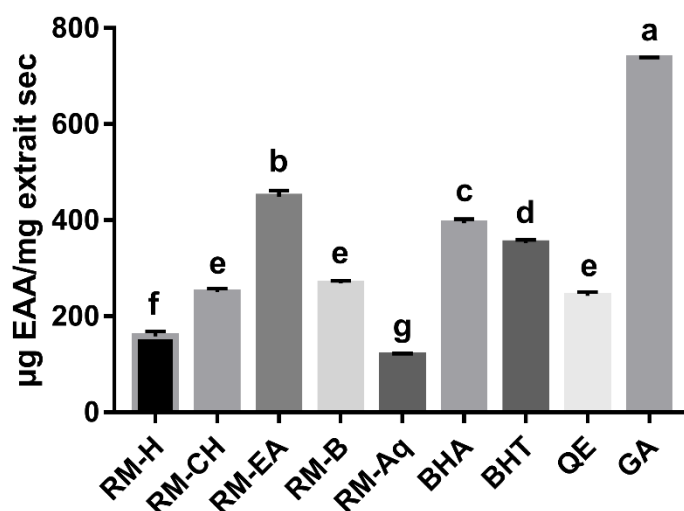


Figure 23 : Capacité antioxydants totale des différentes fractions de *R. macrophyllus* Desf et des standards. RM-H : Fraction hexane ; RM-CH : Fraction chloroforme ; RM-EA : Fraction acétate éthyle ; RM-B : Fraction butanol ; RM-Aq : Fraction aqueuse ; QE : Quercétine ; GA : Acide gallique ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; BHT : Hydroxytoluène butylé. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ ET des triplicatas. Les bars avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

3.2.3.5. Test de blanchiment du β -carotène

L'activité antioxydants des fractions et des différents standards a été évaluée sur la base de leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique dans le système β -carotène / acide linoléique (système de type lipidique) (Figure 24).

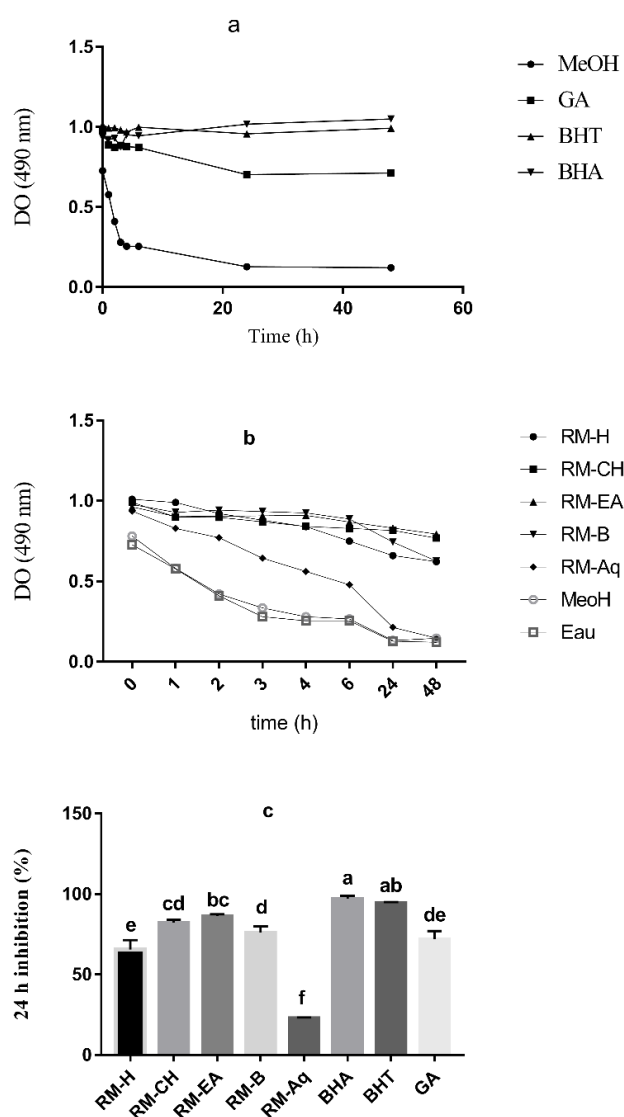


Figure 24 : Test de blanchiment au β -carotène des parties aériennes de *R. macrophyllus* Desf, (a) Cinétique du blanchiment au β -carotène pour le BHA, le BHT, l'acide gallique (GA) et le méthanol (MeOH). (b) Cinétique du blanchiment au β -carotène pour différentes fractions, le méthanol et l'eau. (c) Inhibition du blanchiment au β -carotène après 24 h pour les fractions, les standards et le méthanol (MeOH). RM-H : fraction hexane ; RM-CH : fraction chloroforme ; RM-EA : fraction acétate éthylique ; RM-B : fraction butanol ; RM-Aq : fraction aqueuse ; GA : acide gallique ; BHA : hydroxyanisole butylé ; BHT : hydroxytoluène butylé. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ ET des triplicatas. Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Les résultats présentés dans la **Figure 24.c** ont montré que la meilleure inhibition du blanchiment du β -carotène est présentée par la fraction d'acétate d'éthyle avec $86,2 \pm 1,1\%$ après 24 h d'incubation. Un effet similaire a été obtenu par la fraction chloroforme avec une inhibition légèrement inférieure de $82,3 \pm 1,8\%$. La fraction butanol a montré une inhibition de $76,2 \pm 3,7\%$ et l'inhibition de la fraction hexane était de $65,5 \pm 5,9\%$, tandis que l'inhibition de la fraction aqueuse a chuté de manière drastique après 24 heures à $22,9 \pm 0,4\%$. La cinétique des différentes fractions, standards et contrôles est représentée sur la **figure 24.a et 24.b**. Les antioxydants standards, BHA et BHT ont produit le même effet avec les inhibitions suivantes $97 \pm 2 \%$ et $94,5 \pm 0,6 \%$, respectivement. Cet effet est nettement meilleur que celui de toutes nos fractions et l'acide gallique, ce dernier n'a montré qu'une inhibition modérée, $72 \pm 5\%$, celle-ci est similaire à la fraction hexane mais significativement inférieure à l'effet des fractions acétate d'éthyle, butanol et chloroforme.

3.2.3.6. Etude de Corrélation

Le **Tableau X** présente les résultats de corrélation entre les différentes activités et les composés bioactifs des parties aériennes de *R. macrophyllus* Desf.

L'ABTS s'est avéré être significativement corrélé avec le contenu en polyphénols totaux ($r : 0,93$), alors que le DPPH était plutôt corrélé avec les flavonoïdes ($r : 0,88$) et les flavanols totaux ($r : 0,97$). La corrélation de l'ABTS avec les flavonoïdes et les flavanols totaux et le DPPH avec polyphénols totaux reste très élevé mais non significative. Bien que, le peroxyde d'hydrogène n'a montré aucune corrélation significative avec les composés bioactifs quantifiés, il a tout de même une corrélation élevée avec les tannins condensé ($r : 0,78$), les triterpènes ($r : 0,77$) et les polyphénols totaux ($r : 0,76$), ce qui peut indiquer que cette activité est le résultat d'une synergie entre les différentes classes de composés bioactifs. En générale, l'étude de corrélation a révélé que les composés phénoliques sont les majeurs contributeurs à

l'activité antiradicalaire de nos fractions ce qui explique aussi les différentes performances des fractions dans les différents tests.

Tableau X : Etude de corrélation entre les différentes activités des fractions des parties aériennes et les composés bioactifs

	DPPH	ABTS	H ₂ O ₂	Chélation	FRAP	TAC	B-Carotène
TPC	0,80	0,93*	0,76	-0,99*	0,87	0,96*	0,76
TFC	0,88*	0,81	0,60	-0,99*	0,87	0,91*	0,66
FOL	0,97*	0,82	0,57	-0,98*	0,93*	0,88*	0,48
TTC	-0,58	-0,47	0,04	0,53	-0,50	-0,41	0,12
CTC	0,52	0,53	0,78	-0,61	0,59	0,68	0,83
TC	0,33	0,38	0,77	-0,22	0,42	0,44	0,55

*Corrélation significative

Pour la chélation du fer l'étude a révélé une corrélation négative significative avec TPC, TFC et FOL et une corrélation modérée avec les TTC ($r : 0,53$). Comme expliqué précédemment pour les fractions des racines de *R. macrophyllus* Desf. tous les composés phénoliques ne sont pas dotés de la capacité de lier les ions de fer puisqu'elle dépend fortement de la structure du composé lui-même, par exemple la présence de groupements hydroxyle sur les cycles A et C des flavonoides renforce cette activité, alors que dans le cas des acides hydroxy benzoïques, le groupe carboxylique directement lié au cycle benzénique peut réduire cette activité (**Andjelković et al., 2006**). L'activité antioxydants *in vitro*, évaluée par la méthode du molybdène, était significativement corrélée avec les polyphénols totaux ($r : 0,96$), les flavonoïdes ($r : 0,91$) et les flavonols ($r : 0,88$), ce qui suggère que ces composés sont les principaux contributeurs à cette activité. Les résultats sont conformes avec ceux de **Palakkal et al., (2017)** ; **Kasangana et al., (2015)** et **Abdel-Hameed, (2009)**.

La corrélation du pouvoir réducteur avec les composés phénoliques était élevée avec les polyphénols totaux et les flavonoïdes, mais n'était significative qu'avec la teneur en flavonols ($r : 0,93$), ceci est en accord avec les résultats d'autres études comme **Vieito et al., (2018)** ;

Makris et al., (2007) ; Skotti et al., (2014) et Palakkal et al., (2017) mais contredisent celles d'**Amessis-Ouchemoukh et al., (2014)** qui ont trouvé une corrélation négative avec le contenu phénolique.

Une corrélation positive mais non significative a été trouvée entre le test du β -carotène et les différentes classes de composés bioactifs, la meilleure corrélation a été enregistrée avec les tanins condensés totaux avec $r = 0,83$, suivi du contenu phénolique total ($r = 0,76$), plusieurs auteurs comme **Maisarah et al., (2013); Khan et al., (2012) et Nickavar and Esbati, (2012)** indiquent aussi l'absence d'une corrélation significative entre l'inhibition du blanchiment du β -carotène et les composés phénoliques, tandis que **Goulas and Manganaris, (2012)** ont trouvé une bonne corrélation avec les flavonoïdes totaux (0,88). L'activité antioxydants telle que évaluée par les différents tests a montré une bonne corrélation, bien que non significative, avec les triterpènes et les tanins condensés, tandis que la corrélation était faible à négative avec la teneur en tanins totaux.

3.2.4. Analyse cLC-DAD et LC-MS / MS des composés phénoliques

Une méthode combinant la chromatographie liquide capillaire haute performance en phase inversée avec détection photodiodes (cLC-DAD) et LC-MS/MS a été utilisée pour identifier les composés phénoliques dans les parties aériennes de *R. macrophyllus* Desf. Les polyphénols ont été déterminés par cLC-DAD et les résultats obtenus ont été analysés à l'aide de plusieurs outils chimio-métriques (**Tableau XI**). Les flavonols comme la rutine, la quercétine, la myricétine et le kaempférol, les flavonoïdes comme l'héspéridine, les acides hydroxibenzoïques comme l'acide gallique et les acides hydroxycinnamiques comme les acides *p*-coumarique, *trans*-férulique, chlorogénique et caféique ont été retrouvés et quantifiés dans différentes fractions de l'extrait brut méthanolique de *R. macrophyllus* Desf. La myricétine et la quercétine étaient les polyphénols les plus abondants retrouvés dans la fraction d'acétate d'éthyle avec des concentrations de 70 ± 4 mg / g d'extrait sec et de 61 ± 9

mg / g d'extrait sec, respectivement. La myricétine a été détectée exclusivement dans la fraction d'acétate d'éthyle tandis que l'acide caféique a été retrouvé uniquement dans la fraction butanolique qui contenait également de la rutine comme principal composé avec $10,86 \pm 1,7$ mg / g d'extrait sec. La fraction chloroforme ne contenait que du kaempférol, de la quercétine et de l'hespéridine en tant que composé principal ($50,84 \pm 8,60$ mg / g d'extrait sec). Aucun des composés étudiés n'a été identifié dans la fraction aqueuse, tandis que seule la quercétine a été identifiée dans la fraction hexane.

L'activité antioxydants *in vitro* semble être liée à la teneur phénolique des fractions étudiées (Skotti et al., 2014). L'analyse chromatographique a révélé la richesse des fractions en différentes classes de composés phénoliques notamment les fractions d'acétate d'éthyle et de butanol, des composés comme la rutine, l'hespéridine, la myricétine, le resvératrol et le kaempférol, retrouvés dans les fractions, sont connus pour être d'excellents antioxydants. Généralement, leurs activités peuvent s'expliquer par leurs interactions avec les radicaux DPPH[•] ou les ions métalliques et leur action comme des donneurs d'électrons ou d'hydrogène qui réduisent les radicaux libres et arrêtent la génération de nouveaux radicaux (Skotti et al., 2014 ; Pereira et al., 2009).

En se basant sur les résultats obtenus et l'étude de corrélation, il apparaît que les composés phénoliques peuvent être des contributeurs majeurs à l'activité antioxydants globale des extraits de la plante d'intérêt mais, ils pourraient ne pas être les seuls acteurs et la présence d'autres antioxydants non-phénoliques tels que les triterpènes bioactifs doit être soupçonnée, de plus il peut y avoir des interactions antagonistes ou synergiques entre les composés phénoliques et d'autres composés comme les glucides, les protéines, etc. (Odabasoglua et al., 2005).

Tableau XI : Polyphénols identifiés et quantifiés dans les différentes fractions de *R. macrophyllus* Desf. en utilisant cLD-DAD et LC-MS / MS

	cLC-DAD		RM-H	RM-CH	RM-EA	RM-B	RM-Aq
Compound	RT (min)	UV ^a (nm)	Quantité extraite (mg/g extrait sec)				
A. gallique	2,9	292	-	-	10 ± 1	1,7 ± 0,4	-
A. Chlorogénique	6,4	260	-	-	8 ± 3	2,0 ± 0,9	-
A. Caféique	8,9	310	-	-	-	1,3 ± 0,2	-
A. <i>p</i> -coumarique	10,2	310	-	-	9,7 ± 0,7	2,16 ± 0,04	-
A. Férulique	11,	310	-	-	9,1 ± 1,2	0,90 ± 0,02	-
Rutine	13,8	365	-	-	44 ± 5	11 ± 2	-
Myricétine	14,5	365	-	-	69 ± 4	-	-
Hesperidine	14,6	292	-	51 ± 9	47 ± 6	5,0 ± 0,3	-
Resveratrol	15,3	310	-	-	7,5 ± 0,9	0,24 ± 0,08	-
Quercétine	17,1	365	8 ± 2	6,2 ± 0,6	61 ± 8	-	-
Kaempferol	18,6	365	-	6,7 ± 1,3	1,09 ± 0,14	-	-

^a Longueur d'onde utilisée pour la quantification. RM-H : Fraction hexane ; RM-CH : Fraction chloroforme ; RM-EA : Fraction acétate éthylique ; RM-B : Fraction butanol ; RM-Aq : Fraction aqueuse; RT: Temps de rétention

3.2.5. Analyse des composantes principales

Pour mieux résumer tous les résultats et relier les activités aux composés et aux solvants d'extraction, une analyse chimio-métrique a été menée en utilisant l'analyse des composantes principales (**Figure 25**).

En conséquence, trois composantes principales expliquent 100% de la variance totale des données (PC1 73,9%, PC2 15% et PC3 11,1%). La **figure 25** montre le biplot 3D de la relation entre les fractions des différents solvants et les variables évaluées. Comme on peut l'observer, chaque fraction apparaît dans une zone différente du biplot. La fraction acétate d'éthyle (RM-EA) a montré la plus grande quantité de resvératrol, quercétine, myricétine, acide chlorogénique, acide trans-férulique, acide *p*-coumarique et acide gallique, ainsi que les valeurs les plus élevées de FRAP, 1 / DPPH IC₅₀, CTC (tanins condensés) et TTC (tanins

totaux).

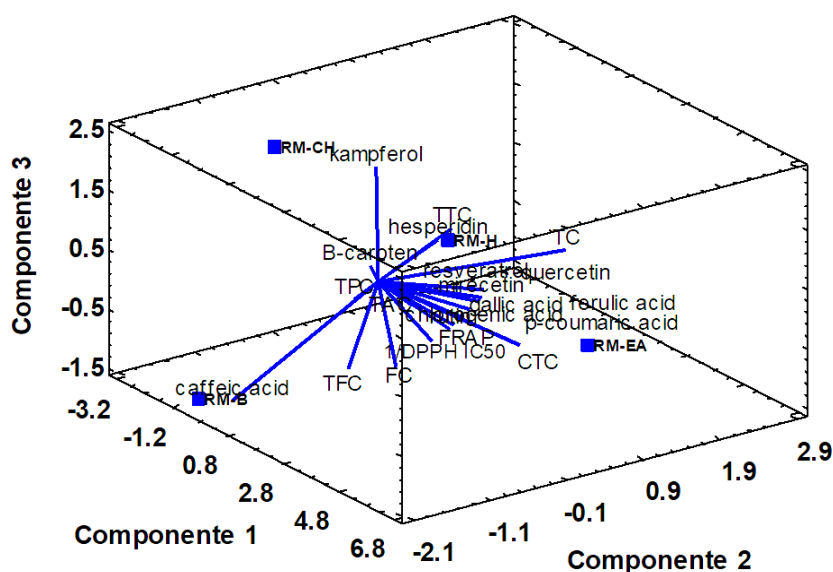


Figure 25 : Biplot de l'évaluation simultanée de la relation des différentes fractions et charges (activité antioxydants, triterpénoïdes totaux et polyphénols totaux et polyphénols individuels). TPC (teneur totale en polyphénols), TFC (teneur totale en flavonoïdes), FC (teneur en flavonols), TTC (teneur totale en tanins), CTC (teneur en tanins condensés), TC (teneur en triterpénoïdes), TAC (capacité antioxydants totale), 1 / DPPH IC₅₀ (puissance antiradicalaire).

De plus, la fraction butanol (RM-B) a montré de grandes quantités d'acide caféique et des valeurs élevées d'indice TFC (flavonoïdes totaux). La fraction chloroforme (RM-CH) a été regroupée dans la direction opposée aux autres variables (polyphénols, composés individuels, FC (teneur en flavonols), teneur en CTC, activité antioxydants FRAP et 1 / DPPH IC₅₀ et a présenté le kaempférol comme polyphénol le plus extrait par rapport aux autres fractions. D'autre part, la fraction hexane (RM-H) se distingue par les teneurs les plus élevées en TC (teneur totale en triterpènes).

Suite au fractionnement bio-guidé et aux résultats obtenus, les fractions acétate d'éthyle (RM-EA) et de *n*-butanol (RM-B) ont été sélectionnées comme les fractions les plus actives et seront sélectionnées par conséquent pour plus d'études en détails dans les prochaines parties de ce travail.

3.3. Etudes toxicologiques

3.3.1 Effet larvicide

La toxicité générale du mélange de composés identifiés dans RM-B et RM-EA a d'abord été testée sur les larves des crevettes de saumure (*Artemia salina*) qui est un simple organisme invertébré marin (**Tableau XII**), ce test est fiable, peu coûteux, facile et couramment utilisé pour tester le potentiel toxique des extraits de plantes et d'autres produits chimiques (**Al-Saeedi et al., 2017**). RM-EA et RM-B ont présenté une forte toxicité dose-dépendante envers les larves de crevettes saumurées. De 1 à 50 µg / mL, RM-EA était considérée comme non larvicide, avec un taux de mortalité inférieur à 50%. Un effet larvicide élevé a été observé à une concentration de 100 µg / mL, tandis qu'à 500 et 1 000 µg / mL, RM-EA était extrêmement larvicide pour les larves de l'Artémie (**Choi, 2017**). En se basant sur l'effet dose-dépendant de RM-EA, la CL₅₀ obtenue était de 59,7 ± 9,1 µg/mL.

De même la fraction RM-B a aussi présenté une toxicité dose-dépendante mais à moindre échelle sur les larves d'*Artemia salina*. De 1 à 100 µg / mL, la RM-B était considérée comme non larvicide, avec un taux de mortalité inférieur à 50%. Un effet larvicide élevé a été observé à une concentration de 500 µg / mL, tandis qu'à 1 000 µg / mL, RM-B était extrêmement larvicide pour les larves d'*Artemia salina*, la CL₅₀ obtenue était de 164,0 ± 8,3 µg/ mL. Statistiquement RM-EA est significativement plus larvicide que RM-B.

Les extraits méthanoliques et éthanoliques de *R. constantinapolitanus* et l'extrait d'acétate d'éthyle de *R. isthmicus* n'étaient pas actifs sur les larves de l'artémie (CL₅₀> 1000 µg / mL) (**Erdoğan, 2008**). Alors que la CL₅₀ de différents extraits de *R. arvensis* était entre 384 et plus de 1000 µg / mL, montrant une toxicité modérée à faible pour les larves d'*Artemia salina* (**Bhatti et al., 2015b**). L'effet larvicide des fractions peut être attribué à la présence de composés cytotoxiques tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les lactones sesquiterpéniques et les terpénoïdes. Certains polyphénols (naringine et quercétine) se sont

révélés non larvicides pour les crevettes de saumure, néanmoins, un mélange des mêmes composés s'est révélé hautement larvicide indiquant l'action synergique possible des polyphénols dans nos fractions (**Choi, 2017**). La différence entre les fractions peut être expliquée par la diversité de composition chimique des deux fractions ; RM-EA contient plus de flavonoïdes et d'acides phénoliques que la fraction RM-B.

Tableau XII : Effet larvicide des fractions RM-EA et RM-B de *R. macrophyllus* Desf sur les larves d'*Artemia salina*

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	RM-EA		RM-B	
	Mortalité %	LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Mortalité %	LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
1	16 $\pm$ 6,1		23 $\pm$ 1,9	
10	20 $\pm$ 2,8		34 $\pm$ 7,1	
50	38 $\pm$ 6,1	59,7 ^a $\pm$ 9,1	41 $\pm$ 3,2	164,8 ^b $\pm$ 8,3
100	71 $\pm$ 5,7		44 $\pm$ 0,0	
500	100 $\pm$ 0,0		81 $\pm$ 12,8	
1000	100 $\pm$ 0,0		100 $\pm$ 0,0	

3.3.2. Toxicité aigue

Comprendre le profil de toxicité des extraits peut fournir des informations clés aux professionnels de la santé, aux industries alimentaires et pharmaceutiques, afin de maximiser leurs effets bénéfiques tout en minimisant le risque pour les utilisateurs. Dans ce contexte la toxicité aiguë des fractions choisies a été estimée en testant une dose limite de 2000 mg / kg p.c. L'ingestion des espèces du genre *Ranunculus* peut causer une irritation des muqueuses buccales, des vomissements, des coliques, de l'anorexie, de la diarrhée, des tremblements musculaires et des convulsions (**Poppenga and Puschner, 2014**). Néanmoins, l'administration orale de RM-EA et RM-B à haute dose n'a provoqué aucun signe visible de toxicité ou de mortalité et n'a pas altéré le taux de croissance des souris traitées, suggérant l'innocuité des fractions testées. La toxicité des espèces *Ranunculus* est principalement liée à

la présence du composé vésicant protoanémonine (**Poppenga and Puschner, 2014; Zhang et al., 2020**). Au cours du processus de séchage, ce composé peut subir une polymérisation qui conduit à son inactivation et à la formation d'anémonine (**Prieto et al., 2003; Kocak et al., 2016; Zhang et al., 2020**), ce qui peut expliquer l'absence de symptômes accompagnant l'ingestion d'espèces *Ranunculus* puisque nous avons utilisé *R. macrophyllus* Desf. séchée pour l'extraction. Selon la ligne directrice 423 de l'OCDE on peut ainsi conclure que la DL₅₀ est supérieure à 2500 mg / kg. Cela est en accord avec les résultats obtenus lors du test sur l'artémie. En effet il existe une forte corrélation entre les CL₅₀ obtenues lors du test larvicide et les DL₅₀ de la toxicité aigüe. Une CL₅₀ > 25 µg/ml correspond généralement à une DL₅₀ entre 2500 et 8000 mg/kg (**Parra et al., 2001 ; Sahgal et al., 2010**)

L'effet des deux fractions sur les paramètres biochimiques reflétant les fonctions hépatique et rénale est présenté dans le **tableau XIII**. L'augmentation des taux d'aminotransférases (AST et ALT) indique une atteinte hépatique et plus spécifiquement l'intégrité des hépatocytes. Les taux d'AST reflètent une lésion hépatique générale et l'augmentation des taux d'ALT est associée à une nécrose des cellules hépatiques, tandis que l'élévation des taux d'ALP est liée à des lésions hépatobiliaires, à une cirrhose, ou à une à une cholestase hépatite (**Gowda et al., 2009 ; Righi et al., 2020**). Les niveaux de créatinine et d'urée reflètent des lésions rénales, les deux paramètres sont utilisés pour évaluer le taux de filtration glomérulaire et la fonction d'excrétion rénale, une concentration élevée des deux reflète un dysfonctionnement rénal (**Gowda et al., 2009**).

Tableau XIII : Effet des fractions d'acétate d'éthyle (RM-EA) et de n-butanol (RM-B) de *R. macrophyllus* Desf à 2000 mg / kg pc sur les paramètres de la fonction hépatique et rénale des souris.

	Fonction hépatique U/L			Fonction rénale	
	AST	ALT	ALP	Urée mg/dl	Créatinine mmol/L
RM-EA	71.16±4.69 ^{ns}	41.70±2.78 ^{ns}	96.54±1.9 ^{ns}	25.83±4.90 ^{ns}	40.99±2.56 ^{ns}
RM-B	69.12±5.34 ^{ns}	28.29±3.43 ^{ns}	100.91±16.75 ^{ns}	29.22±3.08 ^{ns}	38.43±4.43 ^{ns}
Control	71.36±3.63	38.79±7.0	83.41±8.10	27.97±0.84	29.46±1.28

PAL : Phosphatase alcaline; AST: Aspartate aminotransférase ; ALT: Alanine aminotransférase; ns: non significatif par rapport au contrôle (valeur $p > 0,05$). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n = 6). Les valeurs sont considérées significativement différentes par rapport au contrôle au seuil : $P < 0,05$.

Les paramètres de la fonction hépatique, AST et ALT n'ont pas montré de variation significative par rapport au groupe témoin tandis qu'une légère augmentation des taux d'ALP a été observée pour les deux fractions mais elle reste non significative par rapport au groupe non traité. Les paramètres de la fonction rénale aussi n'ont pas varié de manière significative par rapport au groupe témoin. Comme pour les taux d'ALP, ceux de la créatinine, ont enregistré une augmentation dans les groupes traités mais ce n'était pas significative par rapport au groupe témoin. On peut conclure que les fractions n'ont causé aucune lésion hépatique ou rénale pouvant conduire à une augmentation des paramètres biochimiques liés à ces organes.

L'analyse histopathologique des foies et des reins du groupe non traité a révélé une architecture générale conservée des tissus et aucune altération au niveau cellulaire. Par contre les foies des souris traitées par les fractions RM-EA et RM-B à la dose limite ont montré des architectures générales conservées avec quelques hépatocytes altérés. Pour RM-B les altérations consistent en une hypertrophie des hépatocytes avec œdème intracellulaire, et clarification et/ou vacuolisation cytoplasmique qui peut bien indiquer des lésions dégénératives mais pas de nécrose cellulaire ou d'infiltrats inflammatoires (**Figure 26**).

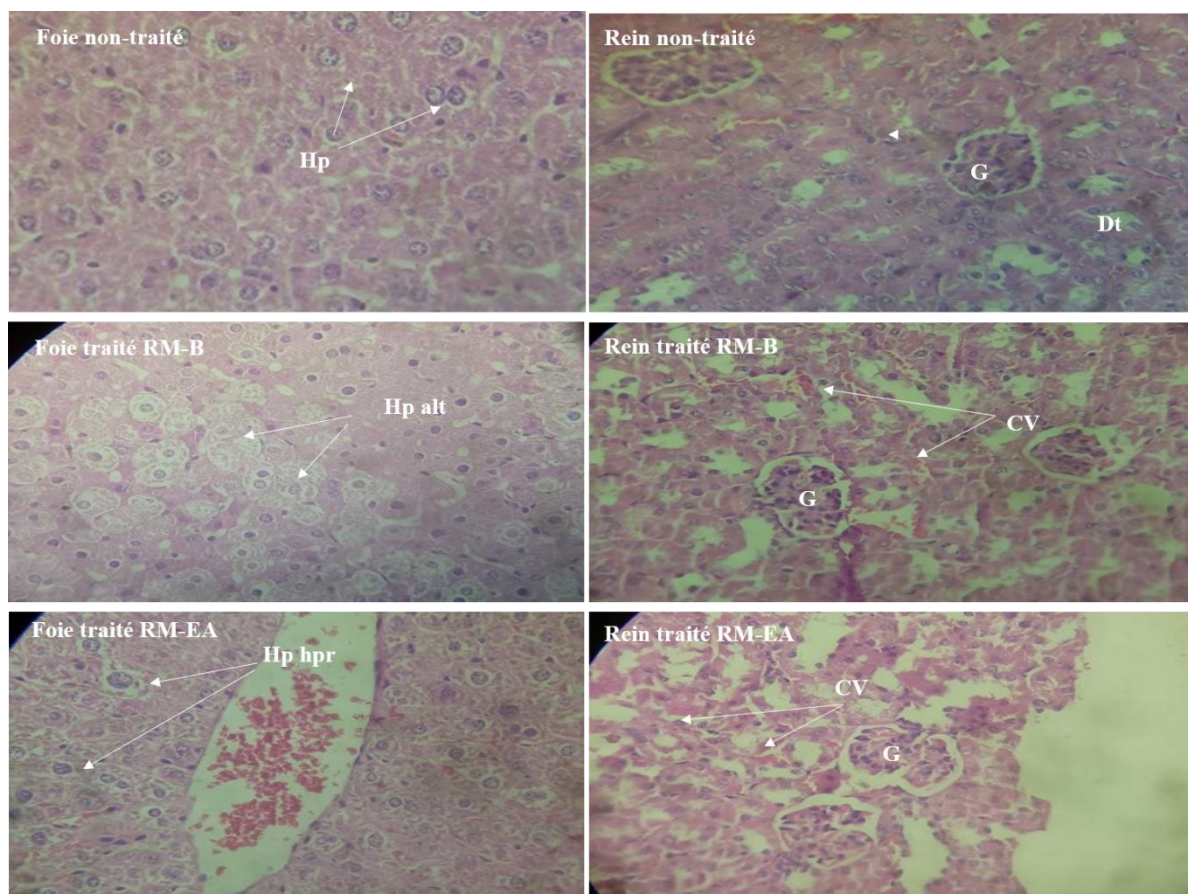


Figure 26 : Coupes histopathologiques des foies et des reins des groupes traités et du contrôle. Hp : hépatocytes ; Hp alt : hépatocyte altéré ; Hp hpr : hépatocyte hypertrophié ; G : glomérule ; Dt : tubule distale ; CV : congestion vasculaire

Les souris traitées par RM-EA ont montré des hépatocytes caractérisés par des noyaux hypertrophiés. L'hypertrophie est une augmentation adaptative de la masse d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe. L'exemple le plus courant d'hypertrophie en pathologie toxicologique est l'induction xénobiotique des systèmes enzymatiques métabolisants des hépatocytes, qui conduit à l'expansion du cytoplasme des hépatocytes et souvent à des noyaux agrandis (Walling and Janovitz, 2018).

Pour les deux fractions les altérations observées peuvent refléter des lésions réversibles induites par une réponse hépatique métabolique adaptative causée par les traitements par RM-EA et RM-B et qui se traduit par une suractivité fonctionnelle des cellules hépatiques. Le résultat de cette suractivité fonctionnelle est une augmentation de la synthèse des enzymes

responsables de la métabolisation et de l'élimination de nos fractions (**Hall et al., 2012**). Cette hypothèse est soutenue par l'absence de nécrose cellulaire et les résultats des analyses biochimiques (niveau normale d'ALT et AST) qui montrent que l'intégrité des hépatocytes est restée intacte. Bien qu'il faut mentionner que ces lésions peuvent conduire à des dégâts irréversibles et la mort cellulaire sur une période de traitement plus longue ou par une administration répétée. Les coupes histopathologiques des reins des groupes traités n'ont montré aucune altération comparée au groupe non-traité à part des congestions vasculaires minimes.

3.4. Hémolysse oxydative

La capacité des fractions à inhiber l'hémolyse des globules rouge murins, induite par les radicaux peroxydes, générés par la décomposition thermique du AAPH a été évaluée et les résultats sont montrés dans la **figure 27**.

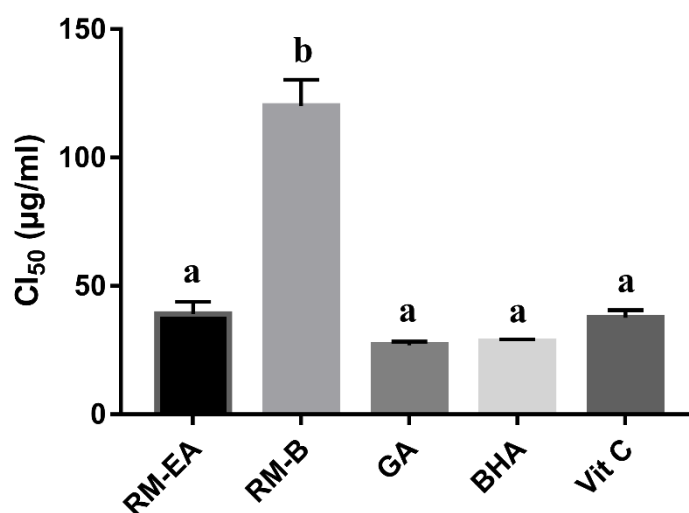


Figure 27 : Activité anti-hémolyse oxydative des fractions RM-EA, RM-B de *R. macrophyllus* Desf et des différents standards. GA : Acide gallique ; BHA : Hydroxyanisole butylé ; BHT : Hydroxytoluène butylé. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ ET des triplicatas. Les barres avec une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Les deux fractions ont montré une capacité dose dépendante à inhiber l'hémolyse oxydative, bien que la capacité de RM-EA ($39,0 \pm 4,4 \mu\text{g/mL}$) soit significativement supérieure à celle de RM-B ($120,0 \pm 10,2 \mu\text{g/mL}$), elle reste similaire à celles de l'acide gallique ($26,8 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$), BHA ($28,4 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) et vitamine C ($37,6 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$).

Dans ce test les fractions sont testées dans un milieu similaire au milieu physiologique, Les deux fractions ont réussi à empêcher l'hémolyse des globules rouges des souris. Près de cinquante pour cent des acides gras dans la membrane des globules rouges (GR) sont insaturés (**Çimen, 2008**). Les radicaux peroxydes générés ciblent les acides gras insaturés dans la membrane des GR provoquant une réaction, en chaîne, de peroxydation lipidique qui conduit à la perte de son intégrité, à la libération d'hémoglobine et à la mort cellulaire (**Banerjee et al., 2008**). Pour éviter l'hémolyse cellulaire oxydative, les composés phénoliques, présents dans nos fractions, peuvent directement neutraliser les radicaux peroxydes générés ou réduire les radicaux d'acides gras résultants en espèces non réactives par transfert d'atomes d'hydrogène et ainsi préserver l'intégrité de la membrane cellulaire (**Banerjee et al., 2008**). Les flavonoïdes tels que l'hespéridine et la rutine, identifiés comme des composés majeurs de la RM-B, et la quercétine, myricétine et le kaempférol de la RM-EA ont montré une capacité à inhiber l'hémolyse des globules rouges en arrêtant la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique (**Elavarasan et al., 2012**). Les résultats démontrent l'activité anti-peroxydation lipidique des fractions et confirment les résultats du test de blanchiment du β -carotène.

3.5. Activité anti-inflammatoire

3.5.1. Stabilisation membranaire

Des modèles *ex vivo* de Stabilisation membranaire ont été utilisés pour tester la capacité de nos fractions à stabiliser la membrane cellulaire sous différentes conditions hypotonique et thermique et les résultats sont illustrés dans la **figure 28**.

Les deux fractions, RM-EA et RM-B, ont inhibé de manière significative l'hémolyse des globules rouges, induite par hypotonie, de façon dose-dépendante et ont présenté une inhibition maximale de $33 \pm 2\%$ et $45 \pm 1\%$, respectivement, à $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ (**Figure 28.a**). RM-EA et RM-B étaient également capables d'inhiber la lyse des globules rouges pendant le traitement thermique d'une manière plus forte (**Figure 28.b**). L'inhibition a atteint $74 \pm 2\%$ pour RM-EA et $51,9 \pm 0,1\%$ pour RM-B à $100 \mu\text{g} / \text{mL}$. L'inhibition produite par l'aspirine © à la même dose était encore inférieure aux fractions testées. L'aspirine © n'a enregistré que $24 \pm 2\%$ et $13,1 \pm 0,4\%$ pour l'hémolyse hypotonique et l'hémolyse thermique respectivement. L'activité modérée de l'aspirine © a également été signalée par **Brown et al., (1967)** et **Shinde et al., (1999)**.

Le milieu hypotonique, la chaleur et les médicaments (méthotrexate, hydroxychloroquine) peuvent entraîner une hémolyse des globules rouges (**Murugesan et al., 2020**). La similitude entre la membrane des GR et la membrane lysosomale fait des GR un excellent modèle pour le dépistage d'éventuels substances anti-inflammatoires. Au cours de la réponse inflammatoire, les neutrophiles activés peuvent se décomposer et libérer leur contenu lysosomale au site de l'inflammation, ce qui exacerbe l'inflammation et les dégâts au site tissulaire avec divers autres troubles (**Russo, 2000**).

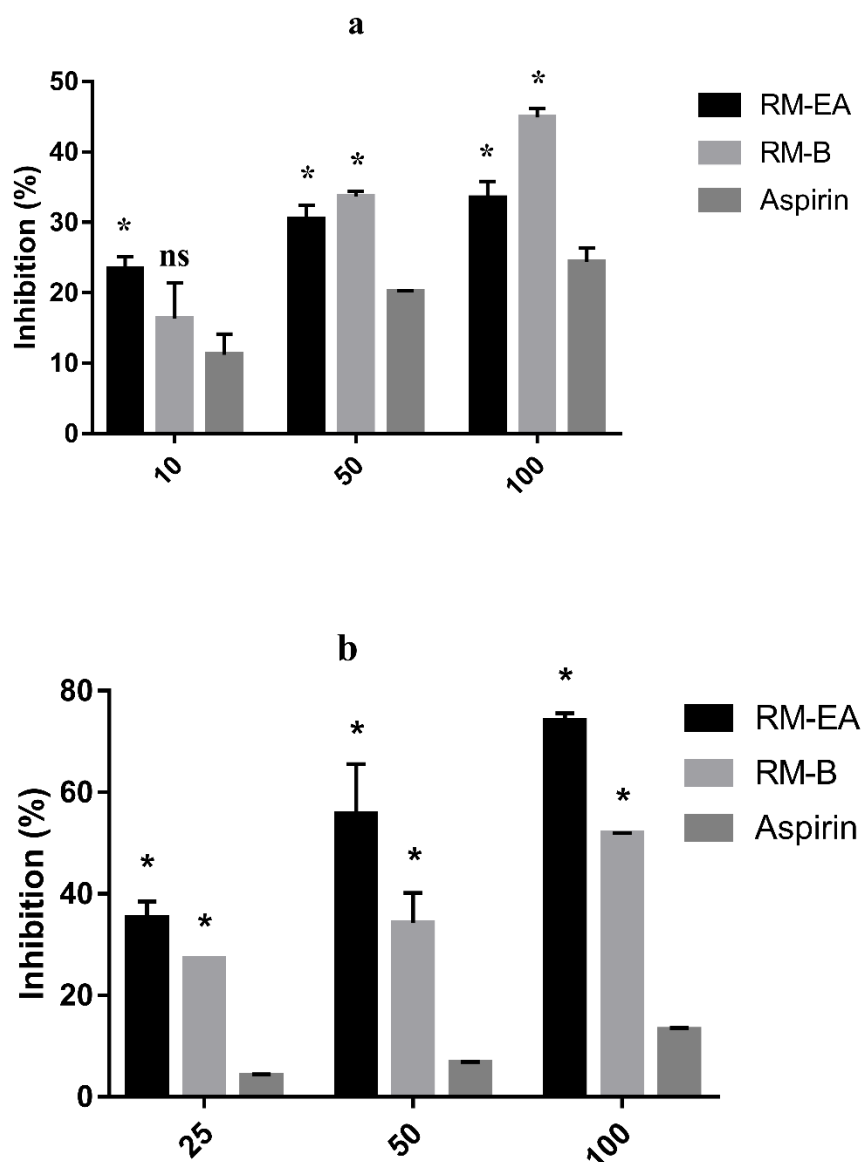


Figure 28 : Effet des fractions d'acétate d'éthyle (RM-EA), de la fraction n-butanol (RM-B) de *R. macrophyllus* Desf et d'aspirine sur l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges. a: Hémolyse induite par hypotonie; b: Hémolyse induite par la chaleur. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type ($n = 3$). Pour chaque dose l'effet est comparé à l'aspirine. * : Différences statistiquement significatives par rapport à l'aspirine ($p < 0,05$).

Les composés ayant une activité de stabilisation de la membrane agissent donc comme des médicaments anti-inflammatoires en limitant la libération d'enzymes lysosomales telles que la phospholipase qui induit la synthèse d'autres médiateurs pro-inflammatoires (**Yesmin, 2017**). Les AINS ont montré la capacité de stabiliser la membrane des lysosomes et d'empêcher la libération d'enzymes lysosomales qui endommagent les tissus dans le site d'inflammation (**Russo, 2000**). L'activité de RM-EA et RM-B suggère la présence de composés bioactifs qui ont une activité similaire aux anti-inflammatoires de type AINS. L'effet de stabilisation membranaire peut être expliquée par une altération de la perméabilité membranaire ou l'augmentation du rapport surface / volume de la cellule (**Shinde et al., 1999**). L'augmentation de la proportion de la surface cellulaire par rapport à son volume peut être causée par l'intercalation des polyphénols dans la membrane, ce qui modifie aussi sa fluidité (**Pawlikowska-Pawlega et al., 2003**). On a constaté que la quercétine et d'autres polyphénols pouvaient interagir avec les protéines membranaires entraînant des modifications de la forme et de la taille des érythrocytes, leurs permettant de s'adapter aux conditions hémolytiques (**Pawlikowska-Pawlega et al., 2003**). La flexibilité des GR et le volume cellulaire sont aussi étroitement liés à la teneur en calcium intracellulaire. Par conséquent, on peut spéculer que l'effet cyto-protecteur sur la membrane cellulaire peut être dû à la capacité des fractions à altérer la libération intracellulaire du calcium (**Shinde et al., 1999**).

3.5.2. Œdème de l'oreille induit par le xylène

L'activité anti-inflammatoire des fractions RM-EA et RM-B, des parties aériennes de *R. macrophyllus* Desf. a été étudiée à l'aide d'un modèle *in vivo*: œdème auriculaire induit par le xylène. Il s'agit d'un modèle d'inflammation cutanée aiguë dans l'oreille de souris, rapide, simple et qui donne des résultats reproductibles. Après application d'un irritant (xylène) sur l'oreille de souris, l'étendue de l'œdème est mesurée en pondérant le tissu auriculaire pris des groupes traités et témoins (**Gábor, 2013**).

Comme on peut le voir sur la **figure 29**, les deux fractions ont réduit considérablement l'œdème cutané dans l'oreille après une heure d'application du xylène de manière dose-dépendante, l'acétate d'éthyle a présenté une inhibition de l'œdème plus élevée que la fraction *n*-butanol, dans toutes les doses testées, mais la différence entre les deux fractions n'étaient pas statistiquement significatives.

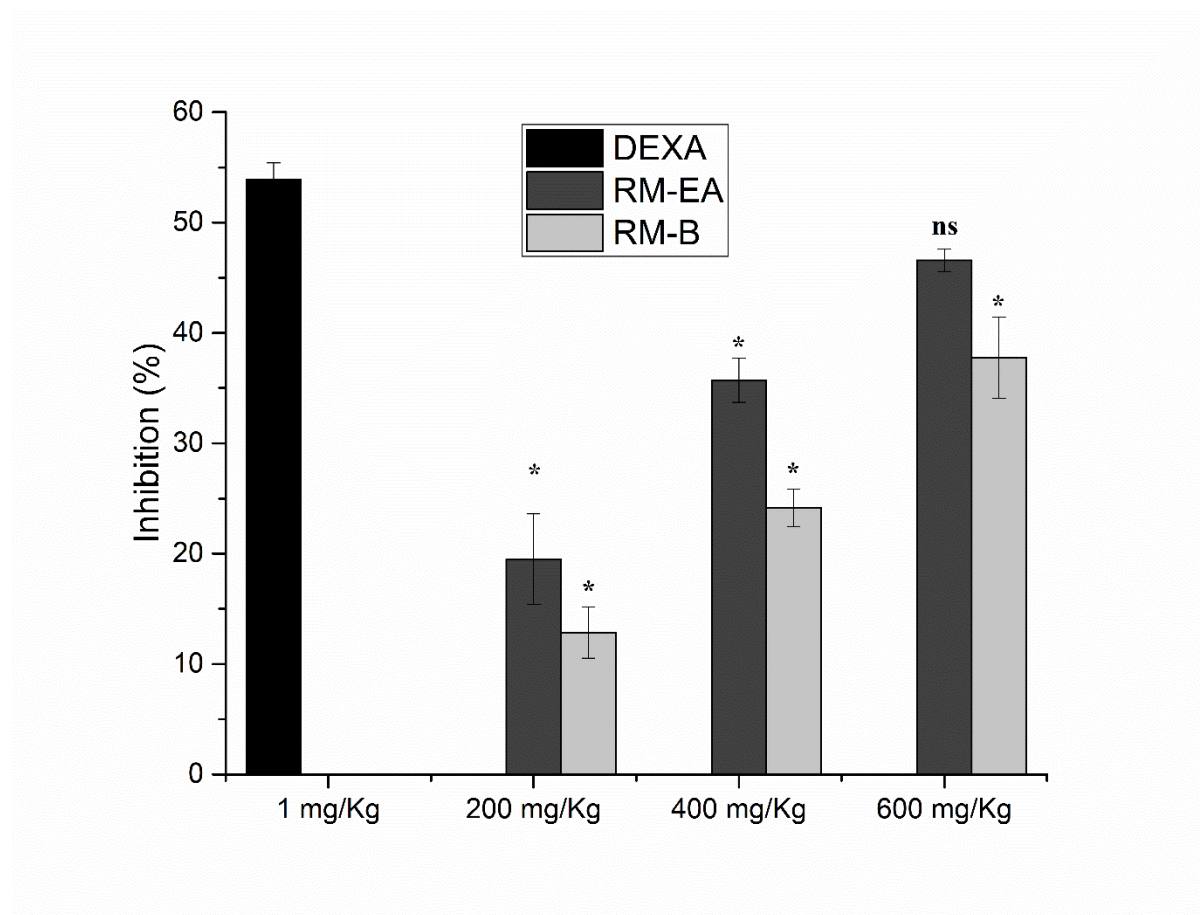


Figure 29 : Effet de la fraction acétate d'éthyle (RM-EA), de la fraction *n*-butanol (RM-B) (200, 400, 600 mg / kg p.c) de *R. macrophyllus* Desf et de la dexaméthasone (Dexa) (1 mg / kg) sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n = 7). * indiquent des différences significatives par rapport à la dexaméthasone ($p < 0,05$).

L'inhibition à la dose 600 mg / kg était de $37,75 \pm 3,7\%$ et $46,58 \pm 1,01\%$ pour RM-B et RM-EA, respectivement, tandis que la dexaméthasone a donné $53,93 \pm 1,47\%$ à 1 mg / kg. À la dose la plus élevée, l'effet de la fraction RM-EA est similaire à celui de l'agent anti-inflammatoire standard dexaméthasone, qui est un anti-inflammatoire stéroïdien.

L'œdème auriculaire induit par le xylène est un modèle d'inflammation aiguë, adapté à l'évaluation des substances d'origine végétale, administrées par voie topique et systémique, et utilisé pour détecter les composés antiphlogistiques inhibant la phospholipase A2 (**Akindele and Adeyemi, 2007; Bribi et al., 2017; Gábor, 2013**). Ainsi, l'activité observée suggère un effet antiphlogistique qui peut être attribué à la capacité de nos fractions à inhiber la Phospholipase A2. De nombreux composés bioactifs peuvent agir comme inhibiteurs de la phospholipase A2, tels que les polyphénols (**Da Silva et al., 2009**) et les triterpénoïdes (**Attur-Rahman, 2000**). Dans la présente étude, nous avons montré la présence de différentes classes de composés phénoliques et de triterpénoïdes en quantités importantes dans les fractions testées. Nous pouvons suggérer que l'action de RM-EA et RM-B peut être attribuée à leur teneur en composés phénoliques, comme la quercétine, le kaempférol, la myricétine, l'hespéridine et la rutine, présents dans les fractions testées (**Da Silva et al., 2009**). Des études sur un extrait méthanolique de *R. sceleratus* ont confirmé la présence d'inhibiteurs de la phospholipase A2 (**Prieto et al., 2003**). Dans la même étude, les fractions d'acétate d'éthyle et de *n*-butanol ont également réduit l'œdème de l'oreille même lorsqu'il est induit par un autre irritant (TPA). L'inflammation causée par le xylène peut aussi être déclenchée par l'action des médiateurs tels que l'histamine, la bradykinine et les prostaglandines, avec la libération de neuropeptides provoquant une inflammation neurogène. L'un des neuropeptides (substance P) est un vasodilatateur puissant qui agit en libérant de l'oxyde nitrique des cellules endothéliales, ce qui provoque une vasodilatation et une exsudation plasmatique, induisant la formation de l'œdème. Les fractions testées pourraient bien stabiliser la membrane des vaisseaux sanguins inhibant la vasodilatation et l'exsudation (**Torres-Rêgo et al., 2016**). Dans ce contexte il faut mentionner que l'hespéridine et la rutine améliorent la résistance et l'intégrité des parois des vaisseaux sanguins (**Hou et al., 2018 ; Torres-Rêgo et al., 2016**). L'effet des fractions peut également résulter de l'inhibition d'autres médiateurs pro-

inflammatoires présents dans le site d'inflammation, mais le mécanisme d'action exact reste à élucider.

3.6. Bioaccessibilité des Fractions RM-EA et RM-B

Les polyphénols sont des composés fonctionnels importants dotés de diverses bio activités, y compris des activités antioxydants, anti carcinogènes et anti-inflammatoires (**Barros and Junior, 2019**). Cependant, pour exercer ces activités, les polyphénols doivent atteindre les tissus cibles à la concentration adéquate. Par conséquent, il ne suffit pas de connaître la quantité d'un composé dans un complément alimentaire ou un produit fonctionnel, la quantité du composé qui sera disponible pour l'absorption dans la circulation systémique doit également être déterminée. Dans ce contexte nous avons étudié l'effet de la digestion gastro-intestinale sur la bio accessibilité des composés phénoliques de RM-EA et RM-B et l'effet sur leur activité antioxydants.

3.6.1. Teneur en polyphénols

Des méthodes colorimétriques ont été utilisées pour quantifier les différents types de composés phénoliques dans la fraction d'acétate d'éthyle (RMEA) et de *n*-butanol (RM-B) avant et après la digestion *in vitro* comme le montre le **tableau XIV**.

Avant la digestion, la fraction acétate d'éthyle a présenté une teneur totale élevée en polyphénols de $344,2 \pm 1,4$ μg EAG / mg d'extrait, dont la teneur en flavonoïdes et en flavonols représentait respectivement $63,9 \pm 1,1$ μg EQ / mg d'extrait et $158,4 \pm 3,7$ μg ER / mg d'extrait, tandis que la quantité de tanins condensés était de $20,0 \pm 1,0$ μg EC / mg d'extrait. La fraction RM-B a montré un taux de polyphénols égal à $106,3 \pm 3,8$ μg EAG / mg d'extrait, comportant de $14,4 \pm 0,0$ μg EQ / mg d'extrait de flavonoïdes, $40,1 \pm 0,5$ ER / mg d'extrait de flavonols et $5,4 \pm 0,5$ μg CE / mg d'extrait de tannins condensés. Ces valeurs confirment les résultats obtenus lors du screening initial qui montre que la fraction RM-EA

est plus riche en polyphénols. **Djenidi et al., (2020)** ont identifié les polyphénols et flavonoïdes totaux dans 19 légumes et 14 fruits couramment consommés en Algérie. À l'exception pour les haricots (*Vicia faba* L.) (360 mg EAG / g d'extrait) (**Djenidi et al., 2020**), RM-EA a montré la teneur en polyphénols la plus élevée. Alors que RM-B a montré une teneur plus élevée que la plupart des échantillons étudiés. La teneur en flavonoïdes dans la même étude a varié de 0,04 pour les bananes à 34 mg EQ / mg d'extrait pour la Corète potagère (*Corchorus olitorius* L.), encore une fois, RM-EA a présenté la plus grande quantité de flavonoïdes, tandis que RM-B a montré une valeur moyenne. Nous pouvons donc suggérer que RM-EA est une source riche et rentable de polyphénols et de flavonoïdes bénéfiques.

La digestion gastro-intestinale simulée *in vitro* a affecté de manière significative les différents composés phénoliques de différentes manières dans les deux fractions. Lors de la digestion orale simulée, une légère perte de 6,8% des polyphénols totaux a été enregistrée pour RM-EA, alors que pour RM-B, une augmentation de 24 % a été enregistrée de façon similaire aux résultats de **Dou et al., (2019)** qui rapporte l'augmentation du taux de polyphénols de *Moringa Oleifera* durant la même étape. Les flavonoïdes totaux ont été les polyphénols les plus affectés à cette étape pour RM-EA, avec une perte de 76% pour les flavonoïdes et de 63% pour les flavonols. RM-B a perdu uniquement 5 % et 7 % des flavonoïdes et flavonols, respectivement dans la même étape. Une augmentation des tannins condensés a été observée pour les deux fractions, RM-EA (27 %) et RM-B (92 %), bien que cette augmentation reste non significative par rapport aux échantillons non digérés pour la fraction RM-EA.

Nos résultats sont conformes à ceux de **Chaalal et al., (2018)** qui ont rapporté une grande perte de flavonoïdes après digestion orale de trois variétés différentes de figue de barbarie. De plus, de nombreuses études ont montré que les flavonoïdes peuvent être soumis à des transformations et au métabolisme à partir de la digestion orale, ce qui peut entraîner une diminution de leur bio accessibilité (**Ahn-Jarvis et al., 2019**).

Tableau XIV : Contenance phénoliques des fractions RM-EA et RM-B de *R. macrophyllus* Desf avant et après la digestion gastro-intestinale simulée in vitro

	RM-EA				RM-B			
	TPC	TFC	FOL	CTC	TPC	TFC	FOL	CTC
ND	344.2 ^b ± 1.4	63.8 ^a ± 1.0	158.4 ^a ± 3.7	20.0 ^c ± 1.0	106.3 ^c ± 3.8	14.4 ^a ± 0.0	40.1 ^a ± 0.5	5.4 ^d ± 0.5
OD	320.8 ^c ± 5.1	15.2 ^b ± 0.0	58.4 ^b ± 1.7	25.5 ^c ± 1.2	132.4 ^a ± 1.0	13.6 ^b ± 0.0	37.2 ^b ± 0.6	15.8 ^c ± 0.7
GD	312.9 ^c ± 4.2	11.3 ^c ± 0.0	31.1 ^c ± 2.1	34.8 ^b ± 3.1	118.4 ^b ± 0.0	10.7 ^c ± 0.1	28.1 ^c ± 0.4	25.9 ^b ± 1.1
ID	374.7 ^a ± 1.9	10.2 ^c ± 0.15	36.6 ^c ± 1.6	41.7 ^a ± 3.5	111.4 ^c ± 1.8	9.6 ^d ± 0.1	28.2 ^c ± 0.3	31.1 ^a ± 1.3

TPC: polyphénols totaux ; TFC : flavonoides totaux ; FOL : flavonols totaux ; CTC : tannins condensés ; ND : Non digéré ; OD : Digestion orale ; GD : Digestion gastrique ; ID : Digestion intestinale. Les chiffres dans la même colonne avec des lettres en exposants différents sont statistiquement différents ($P < 0,05$).

Tout au long de l'étape gastrique, la diminution des polyphénols totaux n'était pas significative par rapport à l'étape précédente pour RM-EA, alors que RM-B a enregistré une diminution significative des polyphénols par rapport à l'étape précédente, mais leurs taux restent plus élevés que dans l'échantillon initial. Des travaux précédents, ont rapporté la stabilité des polyphénols dans le pH gastrique acide (**Pinacho et al., 2015**). En revanche, d'autres études ont montré une diminution drastique de la teneur en polyphénols au cours de la même étape (**Ait chait et al., 2020**). Pour RM-EA La quantité de tanins condensés a significativement augmenté de 74% dans cette étape, alors que 82% de flavonoïdes et 80% de flavonols étaient déjà perdus lors de cette étape. Pour RM-B, le taux des tanins condensés a augmenté de 279 %, alors que les flavonoïdes et les flavonols ont diminué de 25 % et 29 % respectivement. Cela n'était pas surprenant, car la bio accessibilité des flavonoïdes est très faible par rapport aux autres composés phénoliques (**Ait chait et al., 2020**).

Les polyphénols totaux et les autres classes ont montré une excellente stabilité lors de la digestion intestinale simulée. Les polyphénols totaux dans la fraction RM-EA ont significativement augmenté de 8,9% par rapport à la digestion gastrique, tandis que les flavonoïdes et flavonols n'ont subi aucune perte supplémentaire par rapport à la digestion gastrique. La même chose a été observée pour RM-B qui a montré un taux de polyphénols similaire à l'échantillon initial avec une perte significative de 33 % des flavonoïdes et un taux stable de flavonols.

La perte de flavonoïdes lors de la digestion orale et gastrique est étayée par de nombreuses études, mais l'étape intestinale semble affecter davantage leur bio accessibilité. La perte de flavonoïdes au cours de cette étape pourrait être attribuée à leur sensibilité au pH alcalin qui peut entraîner une modification de la structure, de même que l'interaction avec les enzymes digestives et les sels biliaires pourrait réduire leur bio accessibilité (**Spínola et al., 2019**).

La quantité de tanins condensés a augmenté de 108% par rapport à l'échantillon non digéré à cette étape pour RM-EA et de 375 % pour RM-B. **Campos-Vega et al., (2015)** ont également rapporté la libération des tanins condensés lors de la digestion intestinale. De plus, les tanins condensés sont des catéchines oligomériques ou polymériques, des flavanes ou des flavan-3-ols; ils sont davantage soumis à une dégradation sous l'effet des enzymes digestives et du pH alcalin. Ces molécules sont clivées pour produire plus d'unités monomérique ou dimérique (**Adarkwah-yiadam and Duodu, 2017**). Le dosage de la vanilline étant sensible aux monomères et dimères produits au cours du processus de digestion, cela peut conduire à une augmentation de leur réactivité, donnant des valeurs plus élevées dans la détermination analytique colorimétrique des tanins condensés (**Sun et al.,1998**). Malgré ces faits, **Gong et al., (2019)** ont quand même signalé une augmentation de certains composés phénoliques lors de la digestion intestinale par rapport aux échantillons non digérés. Dans tous les cas, la bio accessibilité des composés phénoliques reste régie par de nombreux facteurs dont leur propre structure, leurs propriétés physico-chimiques et leur interaction avec les enzymes digestives et la pancréatine / sels biliaires (**Gayoso et al., 2016; Seraglio et al., 2017**). Bien que RM-B a montré moins de polyphénols que RM-EA, elle a dévoilé une meilleure bio accessibilité que RM-EA et ça pour tous les composés phénoliques dosés.

3.6.2. Activité antioxydants

L'activité antioxydants des fractions RME-A et RM-B a été évaluée contre DPPH[•], ABTS^{•+} et les radicaux peroxydes générés par AAPH dans le test ORAC avant et après la digestion gastro-intestinale *in vitro*. Les résultats ont été comparés à l'activité antioxydants des fruits et légumes couramment consommés. L'effet de la digestion *in vitro* sur l'activité antioxydants des fractions est illustré dans la **figure 30**.

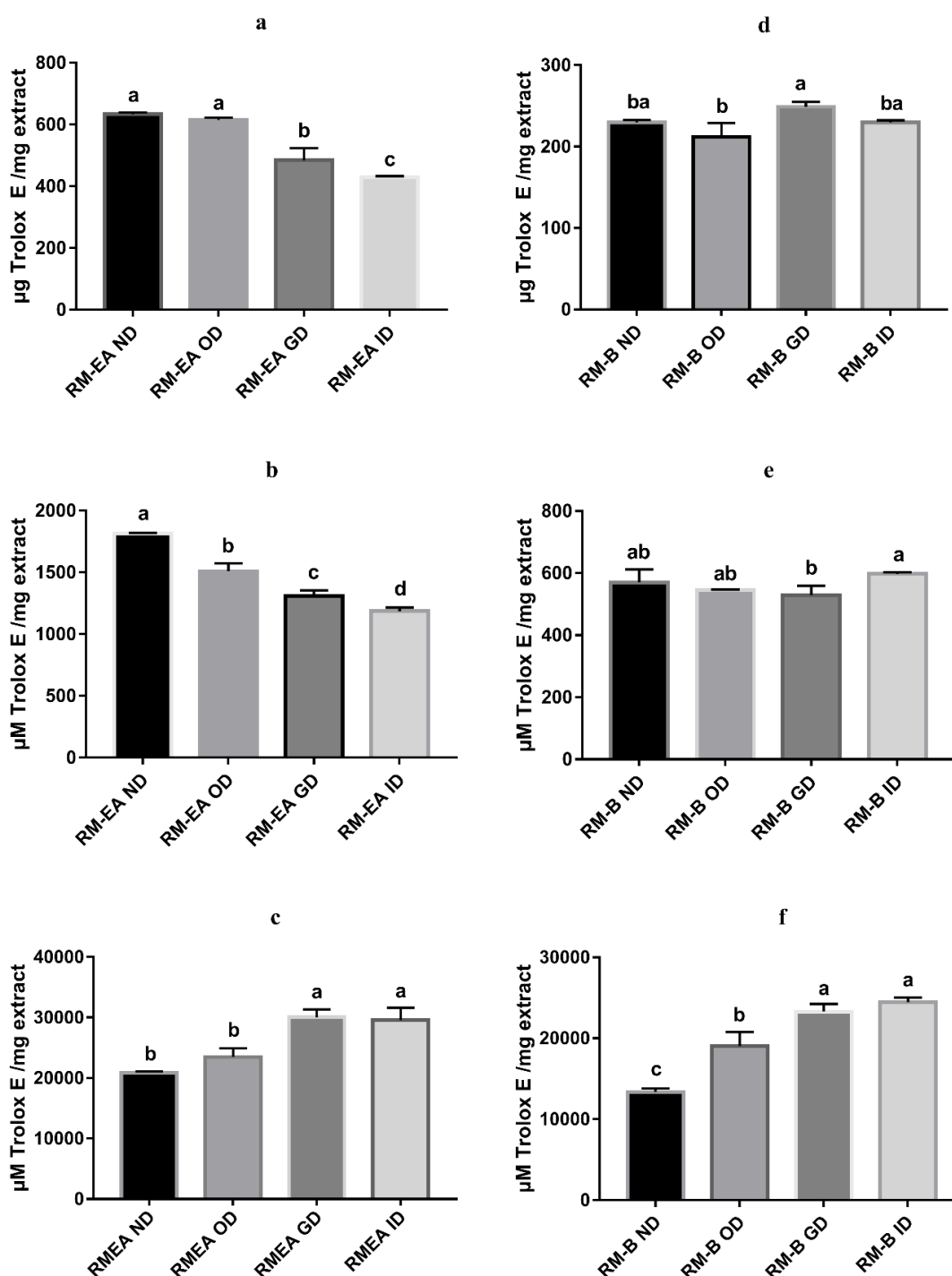


Figure 30 : Effet de la digestion *in vitro* sur l'activité antioxydants des fractions RM-EA et RM-B de *R. macrophyllus* Desf. a : DPPH RM-EA ; b : ABTS RM-EA ; c : ORAC RM-EA; d : DPPH RM-B ; e : ABTS RM-B ; f : ORAC RM-B.

RM-EA a montré une excellente capacité de piégeage des radicaux DPPH[•] ($633,1 \pm 6,0$ mg E trolox / mg extrait), ABTS^{•+} ($1815,5 \pm 3,2$ mM E trolox / mg extrait) et les radicaux

peroxydes ($20885,0 \pm 197,9$ mM E trolox / mg extrait). Cette activité est statistiquement supérieure à celle de RM-B qui a donné 230 ± 3 mg E trolox /mg extrait contre DPPH[•], $570,6 \pm 41,2$ mM E trolox / mg extrait contre ABTS^{•+} et $13350,1 \pm 452,2$ mM E trolox / mg extrait dans le test ORAC.

La capacité des fractions RM-EA ($1238,1 \pm 2,2$ mM E trolox / 100 g poids sec) et RM-B ($1534,9 \pm 110,8$ mM E trolox / 100 g poids sec) à neutraliser le radical ABTS^{•+} était plus élevée que la capacité des extraits de légumes et de fruits consommés quotidiennement comme le brocoli, les épinards, l'aubergine, le piment, la fraise, le citron, le cili (*Rosa roxburghii*) et l'orange, dont l'activité a varié de 1,6 à 108,1 mM E Trolox / 100 g de poids sec (Yang et al., 2020). L'activité antioxydante de la RM-EA et RM-B contre la DPPH[•] était également supérieure à celle de plusieurs fruits et légumes consommés en Algérie et testés dans l'étude de Djenidi et al., (2020). On peut attribuer la capacité de piégeage des radicaux des fractions testées dans notre travail à leurs teneurs en polyphénols, car les polyphénols sont les principaux antioxydants des extraits de plantes (Righi et al., 2020). De plus, la capacité de piégeage des radicaux des fractions RM-EA et RM-B étaient également fortement corrélée à leurs teneurs en polyphénols.

La digestion gastro-intestinale simulée *in vitro* a affecté l'activité antioxydante des deux fractions de manière différente (figure 30). La capacité de RM-EA et RM-B à inhiber le radical libre DPPH[•] (Figure 30.a et d) n'a pas été significativement affectée par la digestion orale, cela peut être expliqué par la stabilité des polyphénols des deux fractions durant cette étape (Tableau XIV). Durant l'étape de la digestion gastrique, une diminution de 23% de l'activité de l'échantillon a été enregistrée pour RM-EA, alors que, l'activité de RM-B, dans la même étape, a augmenté de 8 % mais de façon non significative. Après la digestion

intestinale, l'activité de RM-EA a diminué de 32% ($p < 0,05$), mais celle de RM-B est restée inchangée.

L'activité antiradicalaire de RM-B contre $ABTS^{+•}$ (**Figure 30.e**) et même contre le DPPH, n'a pas été affectée par les différentes étapes de la digestion gastro-intestinale simulée ce qui est en accord avec les résultats du dosage des polyphénols totaux, cela a été aussi observé pour plusieurs jus de fruits et légumes (**Wootton-Beard et al., 2011**). Alors que pour la fraction RM-EA, l'effet de la digestion *in vitro* sur l'inhibition du radical $ABTS^{+•}$ (**Figure 30.b**) a suivi la même tendance que pour le DPPH, où la digestion orale a légèrement diminué cette activité, la digestion gastrique et intestinale ont significativement affecté l'inhibition $ABTS^{+•}$, avec une perte maximale de 34% après la digestion intestinale ($p < 0,05$). Les effets de piégeage de $DPPH^{•}$ et $ABTS^{+•}$ de la fraction RM-EA ont été trouvés fortement corrélés avec les flavonoïdes et en particulier avec la teneur en flavonols (r entre 0,68 et 0,74) ($p > 0,05$), alors qu'ils étaient négativement corrélés avec les polyphénols totaux et la teneur en tanins condensés. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Yang et al., (2016)** et **Seraglio et al., (2017)**, qui ont également rapporté une diminution de l'activité antioxydants des extraits de basilic et de gingembre après digestion *in vitro*.

Au contraire du $DPPH^{•}$ et $ABTS^{+•}$, l'activité antioxydants testée par le test ORAC a augmenté après chaque étape de la digestion pour atteindre une augmentation totale de 43% (RM-EA) (**Figure 30.c**) et de 74 % (RM-B) (**Figure 30.f**) au niveau de la digestion gastrique. L'augmentation de la valeur ORAC pour la fraction RM-EA, malgré la diminution des flavonoïdes totaux et la stabilité relative des polyphénols, peut être attribuée à l'augmentation observée des quantités de tanins condensés. Dans la présente étude, nous avons constaté que les valeurs ORAC étaient significativement corrélées avec la teneur en tanins condensés ($r = 0,94$). Nous pouvons également émettre l'hypothèse que les fractions peuvent également

contenir d'autres composés non phénoliques qui provoquent l'augmentation de la valeur ORAC (**Pavan et al., 2014**). **Yang et al., (2016)** ont également rapporté que la digestion *in vitro* affectait l'activité antioxydants du gingembre et du basilic lorsqu'elle était testée par ABTS^{••} et FRAP, mais qu'elle n'avait pas d'effet significatif lorsqu'elle était testée avec le test ORAC, tandis que **Burgos-edwards et al., (2017)** ont rapporté que l'effet de la digestion gastro-intestinale simulée sur l'activité antioxydants dépend du test utilisé montrant des valeurs supérieures ou inférieures, les différentes méthodes utilisées peuvent ne pas détecter la transformation structurelle des polyphénols et leur activité associée de la même manière (**Pavan et al., 2014**). De plus, l'effet du pH du milieu ainsi que l'effet des enzymes digestives sur les activités antioxydants restent des facteurs clés à étudier (**Pavan et al., 2014**).

Même après tout le processus de digestion, l'activité antioxydants résiduelle, des fractions RM-EA et RM-B, était encore supérieure à l'activité antioxydants des fruits et légumes étudiés et rapportée par **Yang et al., (2020)** et **Djenidi et al., (2020)**.

De façon générale, les résultats montrent que RM-B a montré une meilleure stabilité que RM-E-A durant la digestion gastro-intestinale simulée, que ça soit sur le plan des composés phénoliques ou l'activité antioxydants. Cette différence peut être attribuée à la matrice dans laquelle se trouvent les polyphénols puisque les interactions avec d'autres composés, dans la matrice d'extrait peuvent influencer et altérer la stabilité des composés phénoliques pendant la digestion (**Pinacho et al., 2015**).

3.7. Innocuité de la fraction RM-B

Les résultats suggèrent que *R. macrophyllus* Desf peut être utilisé pour le développement de nouveaux aliments fonctionnels, qui peuvent exercer une action antioxydants même après la digestion gastro-intestinale, en particulier la fraction RM-B qui a montré une stabilité élevée durant la digestion. Cependant pour qu'on puisse l'utiliser régulièrement à des fins

alimentaire ou fonctionnelle une étude de son innocuité à moyen terme est indispensable. À cause du rendement très faible de la fraction RM-EA, seule RM-B a été testée pour sa toxicité à moyen terme.

3.7.1. Observations *in vivo*

L'administration orale de RM-B, à des souris à trois doses différentes (50, 100 et 200 mg / kg poids corporel) pendant 21 jours consécutifs n'a entraîné aucune mortalité dans les groupes traités, le groupe traité à la Vit C a également survécu. Au cours de la phase expérimentale, les souris des trois groupes traités n'ont présenté aucun changement de comportement ou signe de toxicité visible, notamment douleur aiguë, détresse, diarrhée, troubles de la motilité, convulsions, hypoactivité, douleur abdominale, coma, excitation ou troubles respiratoires. Les groupes traités par RM-B ont enregistré un gain de poids corporel similaire à celui des groupes Vit C et témoins (**Tableau XV**). De même, le poids relatif des reins n'a enregistré aucune modification, tandis que le poids relatif du foie pour les doses de RM-B 50 et 100 mg / kg pc a augmenté de manière significative par rapport aux groupes Vit C et témoins (**Tableau XV**).

Le poids des organes est un indicateur important de lésions des organes cibles et de troubles physiologiques, une diminution du poids des organes peut indiquer une nécrose tandis que l'augmentation peut indiquer une hypertrophie.

Fait intéressant, à 50 et 100 mg / kg de poids corporel mais non à 200 mg / kg de poids corporel, une augmentation significative du poids relatif du foie a été observée, reflétant une hypertrophie hépatique. L'hypertrophie hépatique peut être induite par de nombreux facteurs, notamment l'altération de l'état redox, l'altération du métabolisme lipidique et l'altération de la morphologie hépatocellulaire cytoplasmique et nucléaire (**Hall et al., 2012**).

Tableau V: Gain de poids corporel et poids relatif des organes pour les groupes traités, Vit C et témoins

	Augmentation du poids (g)	Poids relatifs des organes (g/Kg bw)	
		Foie	Rein
RM-B 50	11,5 ^a ± 1,7	58,0 ^a ± 6,4	11,3 ^a ± 2,7
RM-B 100	8,3 ^a ± 2,2	59,1 ^a ± 9,9	11,8 ^a ± 2,8
RM-B 200	10,5 ^a ± 0,9	52,3 ^{ac} ± 4,8	12,4 ^a ± 1,1
Vit C 100	8,8 ^a ± 3,2	42,5 ^b ± 3,1	11,0 ^a ± 1,0
Control	9,0 ^a ± 2,7	44,4 ^{bc} ± 4,5	13,2 ^a ± 1,6

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type de trois répétitions. Les valeurs de la même colonne avec des lettres, en exposant, différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

Cependant, dans notre étude, l'augmentation du poids relatif du foie n'était pas dose dépendante et ne s'est accompagnée d'aucune augmentation significative des taux d'ALT ou de lésions hépatobiliaires (augmentation des taux d'AST et d'ALP). Par conséquent, nous pouvons suggérer que l'augmentation du poids relatif du foie dans ce cas n'est pas un effet indésirable du traitement par RM-B mais peut-être une réponse métabolique adaptative hépatique à un xénobiotique (RM-B dans cette étude) (**Hall et al., 2012**). Cela a été corroboré par les résultats de pathologie clinique du **tableau XVI**.

3.7.2. Pathologie clinique

L'effet de l'administration répétée de RM-B sur le foie et les reins a été étudié et les paramètres biochimiques sériques reflétant leurs fonctions ont été déterminés. Le **tableau XVI** montre que le traitement quotidien des animaux avec RM-B n'a pas affecté les activités des enzymes qui reflètent la fonction hépatique (AST, ALT, ALP) par rapport au groupe non traité. La dose la plus élevée (200 mg / kg pc) a enregistré les niveaux les plus bas d'ALT (47 ± 3 U / L) et d'AST (66 ± 3 U / L). De même, aucun changement significatif n'a été observé dans les paramètres rénaux (urée et créatinine) par rapport au groupe non traité. Spécifiquement, le groupe traité à la vitamine C a enregistré les niveaux les plus élevés

d'AST (109 ± 17 U / L) et de créatinine (38 ± 4 mM / L) avec les niveaux les plus bas d'ALP (91 ± 6 U / L), mais les valeurs n'étaient pas significativement différentes du groupe non traité. Les protéines totales des homogénats hépatiques ont été déterminées et les résultats sont également présentés dans le **tableau XVI**. Aucun changement significatif n'a été observé dans les protéines hépatiques totales pour 50 mg / Kg p.c ($115 \pm 7,5$ mg / g tissu) et 100 mg / Kg p.c ($135 \pm 12,4$ mg / g de tissu) par rapport au groupe témoin ($98 \pm 6,8$ mg / g de tissu). De même, le groupe traité à la vitamine C a enregistré une augmentation non significative des niveaux hépatiques de protéines totales. Une augmentation significative des taux de protéines hépatiques totales a été observée pour le groupe traité à 200 mg / kg p.c ($146,4 \pm 13,3$ mg / g de tissu).

Tableau 1 : Effet de *R. macrophyllus* Desf. Fraction butanolique sur les paramètres biochimiques sériques.

	Paramètres hépatiques				Paramètres rénaux (mM/L)	
	Total protéines (mg/g tissu)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Urea	Creatinine
RM-B (50 mg/kg)	$115^b \pm 7.5$	$94^a \pm 9$	$56^{ab} \pm 5$	$125^b \pm 9$	$5.3^a \pm 0.5$	$33^a \pm 6$
RM-B (100 mg/kg)	$135^b \pm 12.4$	$97^a \pm 12$	$60^b \pm 4$	$149^b \pm 9$	$6.2^a \pm 0.6$	$25^a \pm 6$
RM-B (200 mg/kg)	$146,4^a \pm 13,3$	$66^a \pm 3$	$47^{ab} \pm 3$	$125^b \pm 6$	$6,0^a \pm 0,2$	$22^a \pm 2$
Vit C (100 µg /kg)	$138^b \pm 10,7$	$109^a \pm 17$	$42^a \pm 4$	$91^a \pm 6$	$7,0^b \pm 0,4$	$38^a \pm 4$
Control	$98^b \pm 6,8$	$89^a \pm 10$	$51^{ab} \pm 4$	$141^b \pm 8$	$4,3^a \pm 0,6$	$26^a \pm 2$

RM-B: *Ranunculus macrophyllus* fraction butanolique; AST: Aspartate aminotransférase ALT: Alanine aminotransférase; ALP: Phosphatase alcaline; Vit C: Vitamine C. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (n = 8). Les nombres sur la même colonne avec des lettres en exposant différentes indiquent des différences significatives ($p < 0,05$).

Dans le présent travail, l'administration orale répétée de RM-B pendant 21 jours n'a induit aucune modification des taux d'aminotransférases ou des taux de créatinine et d'urée. Ce qui indique que l'intégrité des hépatocytes est restée intacte pendant l'étape de traitement. Alors que l'AST et l'ALT reflètent l'intégrité des hépatocytes, les protéines hépatiques totales reflètent la fonction hépatique (Ugwah-ogwejiofor et al., 2019). Un signe d'hépatotoxicité

courant dû à des produits chimiques hépatotoxiques est la diminution des protéines hépatiques totales (**Kebièche et al., 2011 ; Sajitha et al., 2010**). Cette diminution peut refléter une fonction synthétique hépatique réduite (**Ugwah-oguejiofor et al., 2019**), une protéolyse accrue ou une inhibition de la synthèse des acides nucléiques (**Begum and Vijayaraghavan, 1995**). Aucun des groupes traités n'a présenté de diminution des taux de protéines totales. L'augmentation observée, à la dose la plus élevée, peut être expliquée par l'augmentation de la synthèse de certaines protéines comme la catalase et le glutathion réduit (**figure 31.b et 31.c**). De plus, l'augmentation progressive des protéines totales peut être expliquée par une élévation des enzymes métabolisant les médicaments responsables de la transformation métabolique et de l'excrétion de RM-B (**Ennulat et al., 2010**). Pris ensemble, les résultats suggèrent fortement l'innocuité de RM-B aux doses étudiées, nous pouvons émettre l'hypothèse que, au moins au niveau de la pathologie clinique, RM-B n'a causé aucun dommage au foie ou aux reins pouvant conduire à une altération des paramètres biochimiques associés. Ces résultats nous permettent de suggérer que les composés de RM-B ne présentent aucune toxicité même à la dose administrée la plus élevée (200 mg / kg p.c).

3.7.3. État redox hépatique

L'effet *in vivo* de RM-B sur l'état redox hépatique a été déterminé en estimant les niveaux hépatiques de catalase (CAT) et du glutathion réduit (GSH). Comme l'illustre la **Figure 31.a**, l'administration orale de RM-B, à différentes doses, a progressivement augmenté les niveaux de CAT pour atteindre un maximum de $44,5 \pm 0,9$ UI / mg de protéine à 200 mg / kg / jour de RM-B. C'est presque deux fois plus élevé que les niveaux de catalase dans le groupe non traité ($25,7 \pm 1,7$ UI / mg de protéine) et similaire à celui du groupe traité à la Vit C ($43,0 \pm 2,1$ UI / mg de protéine). Une augmentation dose-dépendante des taux de GSH dans les groupes testés a été observée (**Figure 31.b**), mais seul le traitement avec 200 mg / kg p.c était significatif ($53,3 \pm 5,8$ nmol / g de tissu) par rapport au groupe non traité ($28,5 \pm 0,7$ nmol / g

de tissu). Le groupe traité à 200 mg / kg p.c a présenté également des niveaux de GSH plus élevés que le groupe traité à la vitamine C ($40,8 \pm 2,6$ nmol / g de tissu). En outre, l'administration quotidienne de RM-B a réussi à réduire les niveaux de Malondialdéhyde (MDA) dans les groupes traités par rapport au groupe témoin (26 ± 4 nmol / g de tissu) (Figure 31.c).

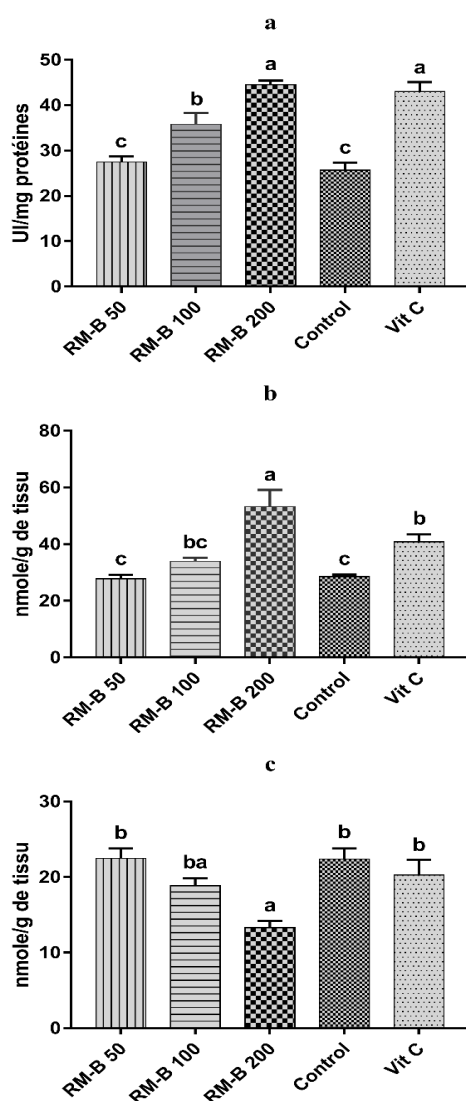


Figure 31 Effet de la fraction butanolique de *R. macrophyllus* (RM-B) (50, 100, 200 mg / kg p.c) et de la vitamine C (100 mg / kg p.c) sur l'état redox hépatique. a: Activité de catalase. b: Taux de glutathion réduit (GSH). c: Taux de malondialdéhyde (MDA). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (N = 8). Les barres avec des lettres différentes indiquent des différences significatives ($p < 0,05$)

Le taux de MDA a été réduit de 50% pour atteindre $13,3 \pm 0,8$ nmol / g de tissu après traitement avec 200 mg / kg p.c de RM-B, tandis que pour les autres doses et les groupes Vit C, la diminution des taux de MDA n'était pas significative par rapport au groupe contrôle.

3.7.4. Capacité antioxydants du plasma

L'effet de l'administration répétée de RM-B sur la capacité antioxydants du plasma a été estimé à l'aide du test de piégeage des radicaux DPPH[•] et du test du pouvoir réducteur (FRAP). Les résultats sont illustrés sur les **figures 32.a et b** ; comme on peut l'observer, le traitement quotidien des souris avec différentes doses de RM-B a considérablement amélioré la capacité antioxydants du plasma par rapport au groupe témoin. RM-B a augmenté la capacité de piégeage des radicaux du plasma d'une manière dose-dépendante pour atteindre $19,9 \pm 0,3\%$ à la dose la plus élevée (200 mg / kg p.c), ce qui est presque 3 fois plus élevé que la capacité de piégeage du DPPH[•] du groupe non traité (**Figure 32.a**). Le groupe traité à la vitamine C a enregistré la capacité de piégeage du DPPH[•] la plus élevée ($34 \pm 2\%$ à 100 mg / kg p.c). L'augmentation des valeurs FRAP (**Figure 32.b**) des groupes traités par RM-B était dose-dépendante aussi, mais elle n'était significative qu'à la dose de 200 mg / kg p.c, avec une valeur FRAP égale à 572 ± 8 μ mol FeSO₄ / mL plasma. À cette dose, l'augmentation était similaire à celle de la vitamine C, ce qui indique l'efficacité de RM-B (**figure 32.b**).

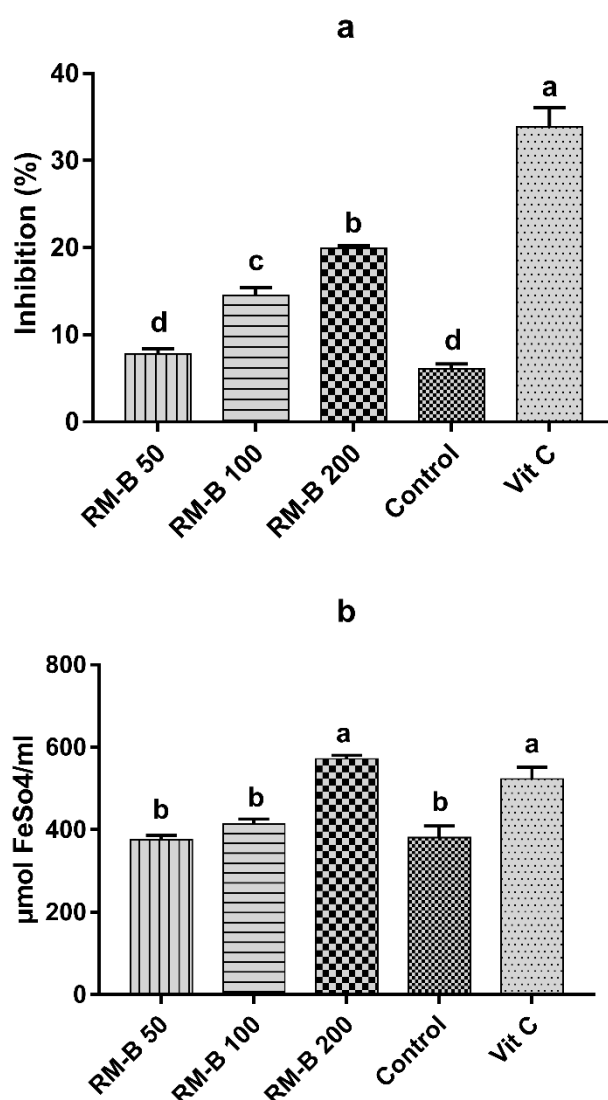


Figure 32 : Effet de la fraction butanolique de *R. macrophyllus* (RM-B) (50, 100 et 200 mg / kg p.c) et de la vitamine C (100 mg / kg) sur la capacité antioxydants du plasma. A: Test de piégeage des radicaux DPPH. B: Capacité de réduction ferrique du plasma (FRAP). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (N = 8). Les barres avec des lettres différentes indiquent des différences significatives (valeur $p < 0,05$).

Le stress oxydant est un signe majeur de la toxicité des substances hépatotoxiques, comme en témoigne l'augmentation de la génération de radicaux libres, la peroxydation des lipides et l'épuisement du glutathion réduit et des enzymes antioxydants (Stickel et al., 2005). Par exemple, l'hépatite et la cirrhose hépatique sont liées à une régulation négative de CAT, GSH et SOD et à une augmentation des taux de MDA. En conséquence, dans cette étude, la catalase (antioxydant enzymatique), le glutathion réduit (antioxydant non enzymatique) et le

MDA (produit secondaire de peroxydation lipidique) (**Zhang et al., 2018**) ont été utilisés pour évaluer l'effet de l'administration de RM-B sur l'état d'oxydoréduction hépatique chez les souris.

Pour tous les groupes traités par RM-B, nous n'avons détecté aucune diminution des niveaux de CAT et de GSH, au contraire, nous avons remarqué une augmentation dose-dépendante des niveaux de CAT et de GSH et une diminution des niveaux de MDA, nous pouvons suggérer que RM-B aux différentes doses n'a induit aucune lésion hépatique suite à une augmentation du stress oxydant. Cela peut être considéré comme une amélioration du statut antioxydants du foie. La catalase et le glutathion réduit sont des composants importants du système antioxydants cellulaire, ils sont des piègeurs efficaces de radicaux libres et le GSH peut également régénérer d'autres antioxydants oxydés. L'amélioration du statut antioxydants du foie peut être attribuée aux composés phénoliques fournis par l'administration de RM-B, car les composés phénoliques sont d'excellents piègeurs de radicaux libres (**Zhang and Tsao, 2016**), ils peuvent également moduler les états redox cellulaires, les activités enzymatiques, prolifération cellulaire et les voies de signalisation (**Luca et al., 2020**). Par exemple, l'hespéridine, la rutine et le resvératrol, sont capables de fournir une protection cellulaire contre les dommages oxydatifs en augmentant les niveaux de CAT et de GSH hépatiques en plus d'autres antioxydants endogènes (**Jagdish et al., 2010; Elavarasan et al., 2012; Wu et al., 2015**). Le mécanisme d'action peut inclure l'activation d'un facteur de transcription (Nrf2) qui conduira à la fin aux transcriptions de différents gènes codant pour des enzymes antioxydants et d'autres antioxydants cellulaires (**Elavarasan et al., 2012; Zhang and Tsao, 2016**). Il semble que les effets bénéfiques de RM-B n'étaient pas limités au foie, comme en témoigne l'amélioration de la capacité de piégeage des radicaux du plasma et sa capacité de réduction par rapport au groupe non traité. Cela reflète l'effet systémique du RM-B qui peut

être attribué à la présence de composés phénoliques ou de leurs métabolites dans le plasma des groupes traités.

La membrane cellulaire est riche en acides gras polyinsaturés, ce qui la rend vulnérable à la peroxydation des lipides, entraînant des dommages oxydatifs et une perte d'intégrité cellulaire **(Banerjee et al., 2008)**. La présence des niveaux élevés de produits secondaires de peroxydation lipidique comme le MDA reflète l'étendue des lésions oxydatives hépatiques **(Zhang et al., 2018)**. RM-B a réduit les niveaux de MDA pour tous les groupes traités, ce qui signifie des niveaux de peroxydation lipidique plus faibles et une protection de l'intégrité cellulaire comme le montrent également les résultats de la pathologie clinique (taux d'AST, d'ALT et d'ALP inchangés). Nous pensons que RM-B peut fournir une protection contre la peroxydation lipidique en améliorant le système antioxydants endogènes comme en témoigne l'étude *in vivo*.

Le traitement par RM-B, en particulier à 200 mg / kg de poids corporel, était non seulement aussi bénéfique que la Vit C, mais a également présenté de meilleurs effets sur le foie. Les polyphénols extrait de *R. repens* **(Kebièche et al., 2011)** et *R. scleratus* **(Zhang et al., 2020)**, ont présenté des propriétés hépato-protectrices similaires et ont été aussi capables de moduler l'état redox hépatique en augmentant les niveaux d'antioxydants endogènes et en réduisant la peroxydation lipidique.

Conclusion

Les aliments fonctionnels d'origine végétale suscitent un intérêt croissant en raison de leur innocuité et de leurs propriétés médicinales. La présente étude a permis de mettre en évidence les différentes fonctionnalités de *Ranunculus macrophyllus* Desf. (une plante médicinale et un aliment traditionnel). En effet le fractionnement bio-guidé des parties aériennes et des racines a révélé la richesse des fractions d'acétate éthylique (racines et parties aériennes) et de butanol (parties aériennes) en composés bioactifs (Polyphénols et triterpènes). Ces fractions ont montré une activité antioxydants similaire ou supérieur aux antioxydants standards (pures et synthétiques). L'analyse chromatographique a montré la présence de quantités importantes d'acides phénoliques (acide dhihydroxybenzoïque et trans-férulique) et de flavonoïdes (rutine et hespéridine).

L'étude de la toxicité aigüe des fractions d'acétate d'éthyle et de butanol a montré qu'elles appartiennent à la catégorie 5 des substances ayant une toxicité aigüe relativement faible. Elles ont dévoilé une capacité importante à inhiber l'hémolyse oxydative des globules rouges et à protéger leurs membranes contre différents types de stress (hypotonique et thermique). De plus, ces fractions ont efficacement réduit l'inflammation induite chimiquement chez les souris.

En plus des activités biologiques, les composés phénoliques des fractions se sont montrés résistants à la digestion gastro-intestinale en montrant des activités antioxydants résiduelles très importantes, qui reflètent une bio accessibilité élevée. L'administration répétée de la fraction butanolique, à différentes doses aux souris, n'a révélé aucun effet toxique visible et a montré un effet hépato protecteur important en renforçant le système de défense antioxydants endogène des hépatocytes.

L'ensemble des résultats suggère que *Ranunculus macrophyllus* Desf. est une source sûre de composés bioactifs à effet antioxydants et anti-inflammatoires, qui peuvent exercer leurs activités même après digestion gastro-intestinale. Les résultats ont non seulement permis de montrer le potentiel des racines en tant que source de polyphénols, mais ils offrent également une excellente opportunité d'utiliser une matière première autrement gaspillée (les parties aériennes) dans les industries alimentaires, nutraceutiques et pharmaceutiques modernes dans le but de développer de nouveaux produits à valeur ajoutée tels que des aliments fonctionnels ou des ingrédients alimentaires bénéfiques pour la santé humaine.

Bien que cette étude procure d'amples informations sur la composition chimique et les activités biologiques de *Ranunculus macrophyllus* Desf. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour :

- Elucider le mécanisme précis de l'effet anti-inflammatoire de cette plante en étudiant son effet sur des enzymes inflammatoires (cyclooxygénases et lipoxygénases), des médiateurs pro-inflammatoires (IL1 β et TNF α) et les voies de signalisations (NF- κ B) impliquées dans la genèse de molécules pro inflammatoires.
- Déterminer avec précision la bio accessibilité individuelle des composés phénoliques identifiés, étudier leur biodisponibilité par des méthodes *in vivo* et identifier leurs métabolites présents dans le plasma et qui sont les vrais responsables des activités biologiques.
- Etudier les activités biologiques *in vivo* des fractions digérées (activités antioxydants, anticancéreuse, antidiabétique etc...).

Références bibliographiques

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Tufail, T., Bashir, M. S., & Ishtiaq, A. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
- Abdel-Hameed, E.-S. S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry*, 114, 1271–1277. <https://doi.org/doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.005>
- Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*, 11(5), 627–635. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>
- Adarkwah-yiadom, M., & Duodu, K. G. (2017). Effect of extrusion cooking and simulated *in vitro* gastrointestinal digestion on condensed tannins and radical scavenging activity of type II and type III whole grain sorghum. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 2282–2294. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13510>
- Adwas, A. A., Ibrahim, A. S., Elsayed, Azab, A. E., & Fawzia Amhimmid, Q. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 6(1), 43–47. <https://doi.org/10.15406/jabb.2019.06.00173>
- Aguilar, T. A. F., Hernández, B. C. N., & Pérez, J. A. M. (2016). Endogenous antioxidants: A review of their role in oxidative stress. In J. A. Morales-Gonzalez (Ed.), *A master regulator of oxidative stress - the transcription factor Nrf2* (p. 13). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Ahmed, A. U. (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*, 6(4), 274–281. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1123-9>
- Ait Chait, Y., Gunenc, A., Bendali, F., & Hosseinian, F. (2020). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of carob polyphenols: Bioaccessibility and bioactivity. *Lwt*, 117(October 2018), 108623. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108623>
- Akindele, A. J., & Adeyemi, O. O. (2007). Anti-inflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. *Fitoterapia*, 78, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.09.002>
- Akkol, E. K., Süntar, I., Erdogan, T. F., Keles, H., Gonenc, T. M., & Kıvcak, B. (2012). Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.037>

- Aklima, J., Mojumder, S., & Sikdar, D. (2014). Total phenolic content, reducing power, antioxidative and anti-amylase activities of five Bangladeshi fruits. *International Food Research Journal*, 21(1), 119–124.
- Al-Saeedi, A. H., Al-Ghafri, M. T. H., & Hossain, M. A. (2017). Brine shrimp toxicity of various polarities leaves and fruits crude fractions of *Ziziphus jujuba* native to Oman and their antimicrobial potency. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5(December 2016), 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.03.003>
- Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidah, I. M., Quirantes-Piné, R., Madani, K., & Segura-Carretero, A. (2014). Phytochemical profiling, *in vitro* evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 61, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.049>
- Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., & Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 98(1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.044>
- Antonelli, M., & Kushner, I. (2017). It 's time to redefine inflammation. *The FASEB Journal*, 31(5), 1787–1791. <https://doi.org/10.1096/fj.201601326R>
- Aoki, T., & Narumiya, S. (2016). Prostaglandins in chronic inflammation. In M. Miyasaka & K. Takatsu (Eds.), *Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation* (pp. 3–18). Springer Japan.
- Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., & Kumar, S. S. (2016). Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 15. <https://doi.org/10.1155/2016/5276130>
- Ashley, N. T., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2012). Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 385–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530>
- Ashraf, A., Bhatti, I. A., Sultana, B., & Jamil, A. (2016). Study of variations in the extraction yield, phenolic contents and antioxidant activities of the bark of *F. religiosa* as a function of extraction procedure. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 12, 8–13.
- Aslam, M. S., Choudhary, B. A., Uzair, M., & Ijaz, A. S. (2012). The genus *Ranunculus*: A phytochemical and ethnopharmacological review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(5), 15–22.
- Atta-ur-Rahman. (2000). Bioactive Natural Products (Part C). In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 22). Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/bioactive-natural-products-part-c/atta-ur-rahman/978-0-444-50588-0>

- Balík, J., Kyseláková, M., Vrchotová, N., Tříška, J., Kumšta, M., Veverka, J., ... Lefnerová, D. (2008). Relations between polyphenols content and antioxidant activity in vine grapes and leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, 26.
- Banerjee, A., Kunwar, A., Mishra, B., & Priyadarsini, K. I. (2008). Concentration dependent antioxidant / pro-oxidant activity of curcumin Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chemico-Biological Interactions*, 174, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.009>
- Barros, H. D. de F. Q., & Junior, M. R. M. (2019). Phenolic compound bioavailability using *in vitro* and *in vivo* models. In M. R. S. Campos (Ed.), *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (pp. 113–126). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00006-2>
- Bayliak, M. M., Burdyliuk, N. I., & Lushchak, V. I. (2016). Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs. *Open Life Science*, 11, 298–307. <https://doi.org/10.1515/biol-2016-0040>
- Begum, G., & Vijayaraghavan, S. (1995). *In vivo* toxicity of dimethoate on proteins and transaminases in the liver tissue of fresh water fish *Clarias batrachus* (Linn). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 370–375.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Ana Huđek, Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. In C. M. Galanakis (Ed.), *Polyphenols: Properties, recovery and applications* (pp. 1–44). United Kingdom: WoodHead Publishing.
- Ben Haj Koubaier, H., Snoussi, A., Essaidi, I., Chaabouni, M. M., Thonart, P., & Bouzouita, N. (2014). Betalain and phenolic compositions, antioxidant activity of Tunisian red beet (*Beta vulgaris* L. conditiva) roots and stems extracts. *International Journal of Food Properties*, 17(9), 1934–1945. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.772196>
- Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., & El Hady, S. (2013). Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2013.07.002>
- Bhatti, M. Z., Ali, A., Ahmad, A., Saeed, A., & Malik1, S. A. (2015a). Antioxidant and phytochemical analysis of *Ranunculus arvensis* L. extracts. *BMC Research Notes*, 8, 279–287. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1228-3>
- Bhatti, M. Z., Ali, A., Saeed, A., & Saeed, A. (2015b). Antimicrobial, antitumor and brine shrimp lethality assay of *Ranunculus arvensis* L. extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(3), 945–949.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

- Bondy, S. C. (2016). Metal toxicity, inflammation and oxidative stress. In S. C. Bondy & A. Campbell (Eds.), *Inflammation , Aging , and Oxidative Stress* (pp. 3–16). Springer International Publishing.
- Bribi, N., Belmouhoub, M., & Maiza, F. (2016). Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract of *Fumaria capreolata*. *Phytothérapie*, 15(4), 211–216. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1035-6>
- Brown, J. H., Mackey, H. K., & Riggil, D. A. (1967). A Novel in vitro Assay for Anti-Inflammatory Agents Based on Stabilization of Erythrocytes. *Experimental Biology and Medicine*, 125(3), 837–843. <https://doi.org/10.3181/00379727-125-32219>
- Burgos-edwards, A., Jiménez-aspee, F., Thomas-valdés, S., Schmeda-hirschmann, G., & Theoduloz, C. (2017). Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 237, 1073–1082. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.060>
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastro-intestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77(2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>
- Camps, J., & García-Heredia, A. (2014). Oxidation and inflammation, a molecular link between non-communicable diseases. In J. Camps (Ed.), *Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases-Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics* (dvances in, pp. 1–4). Springer.
- Carbonell-Capella, J. M. M. B., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, and A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 155–171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>
- Chaalal, M., Ydjedd, S., Harkat, A., Namoune, H., & Kati, D. E. (2018). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on antioxidant potential of three prickly pear variety extracts. *Acta Alimentaria*, 47(3), 333–339. <https://doi.org/10.1556/066.2018.47.3.9>
- Chai, T.-T., Mohan, M., Ong, H.-C., & Wong, F.-C. (2014). Antioxidant, iron-chelating and anti-glucosidase activities of *Typha domingensis* Pers (Typhaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 67–72. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i1.10>
- Chang, C. L., Lin, C. S., & Lai, G. H. (2012). Phytochemical Characteristics, Free Radical Scavenging Activities, and Neuroprotection of Five Medicinal Plant Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/984295>
- Chatterjee, S. (2016). Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In T. Dziubla & D. A. Butterfield (Eds.), *Oxidative stress and biomaterials* (pp. 35–58). Academic Press.

- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Choi, J. (2017). Larvicidal effects of grapefruit seed extract (GSE) on brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 9, 209–214. <https://doi.org/10.1007/s13530-017-0322-4>
- Çimen Burak M Y. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 390, 1–11.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In R. A. Greenwald (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 283–284). Boca Raton: CRC press.
- Counet, C., Callemien, D., & Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*, 98(4), 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.030>
- Crascì, L., Lauro, M. R., Puglisi, G., & Panico, A. (2018). Natural antioxidant polyphenols on inflammation management: Anti-glycation activity Vs metalloproteinases inhibition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(6), 1–50. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1229657>
- Cuendet, M., Hostettmann, K., & Potterat, Ol. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagvaea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144–1152.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Da Silva, S. L., Calgarotto, A. K., Maso, V., Damico, D. C. S., Baldasso, P., Veber, C. L., Villar, J. A. F. P., Oliveira, A. R. M., Comar Jr, M., Oliveira, K. M. T., & Marangoni, S. (2009). Molecular modeling and inhibition of phospholipase A2 by polyhydroxy phenolic compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.02.043>
- Da-Cheng, H. (2018). Biodiversity, chemodiversity, and pharmacotherapy of *Ranunculus* medicinal plants. In H. Da-Cheng (Ed.), *Ranunculales medicinal plants: biodiversity, chemodiversity and pharmacotherapy* (pp. 357–383). London: Academic Press.
- Dénes, A., Papp, N., Babai, D., Czúcz, B., & Molnár, Z. (2012). Wild plants used for food by Hungarian ethnic groups living in the Carpathian Basin. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(4), 381–396.
- Deng, K., Xiong, Y., Zhou, B., Guan, Y., & Luo, Y. (2013). Chemical constituents from the roots of *Ranunculus ternatus* and their inhibitory effects on *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules*, 18, 11859–11865. <https://doi.org/10.3390/molecules181011859>

- Di meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Didry, N., Dubreuil, L., & Pinkast, M. (1993). Microbiological Properties of Protoanemonin Isolated from *Ranunculus bulbosus*. *Phytotherapy Research*, 7, 21–24.
- Djenidi, H., Khennouf, S., & Bouaziz, A. (2020). Antioxidant activity and phenolic content of commonly consumed fruits and vegetables in Algeria. *Progress in Nutrition*, 22(1), 224–235. <https://doi.org/10.23751/pn.v22i1.7701>
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2013). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Dou, Z., Chen, C., & Fu, X. (2019). Bioaccessibility, antioxidant activity and modulation effect on gut microbiota of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. leaves during digestion and fermentation *in vitro*. *Food & Function*, 10(8), 5070–5079. <https://doi.org/10.1039/C9FO00793H>
- Durazzo, A., Caiazzo, E., Lucarini, M., Cicala, C., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221–2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F., & Bekhradnia, A. R. (2008). Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7(18), 3188–3192. <https://doi.org/10.5897/AJB08.476>
- Elavarasan, J., Velusamy, P., Ganesan, T., Ramakrishnan, S. K., Rajasekaran, D., & Periandavan, K. (2012). Hesperidin-mediated expression of Nrf2 and upregulation of antioxidant status in senescent rat heart. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64, 1472–1482.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 82, 70–77.
- Engwa, G. A. (2018). Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases. In *Phytochemicals Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention* (Toshiki As, pp. 50–73).
- Ennulat, D., Walker, D., Clemo, F., Magid-slav, M., Ledieu, D., Graham, M., & Botts, S. (2010). Effects of hepatic drug-metabolizing enzyme induction on clinical pathology

- parameters in animals and man. *Toxicologic Pathology*, 38, 810.
<https://doi.org/10.1177/0192623310374332>
- Erdoğan, T. (2008). Brine shrimp lethality bioassay on some *Ranunculus* species. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 37(3), 171–177.
- Fullerton, J. N., & Gilroy, D. W. (2016). Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature Review: Drug Discovery*, 15(8), 551–567.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2016.39>
- Gábor, M. (2003). Models of acute inflammation in the ear. In *Methods in molecular biology* (Vol. 225, pp. 129–137). <https://doi.org/10.1385/1-59259-374-7:129>
- Gayoso, L., Claerbout, A.-S., Calvo, M. I., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2016). Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the *in vitro* gastrointestinal digestion models. *Journal of Functional Foods*, 26, 428–438.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.003>
- Gayoso, L., Roxo, M., Cavero, R. Y., Calvo, M. I., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Wink, M. (2018). Bioaccessibility and biological activity of *Melissa officinalis*, *Lavandula latifolia* and *Origanum vulgare* extracts: Influence of an *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 44(January), 146–154.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.003>
- Gebicki, J. M. (2016). Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.10.021>
- Gómez-Maqueo, A., Escobedo-Avellaneda, Z., Cano, M. P., & Welte-Chanes, J. (2018). Phenolic compounds in food. In L. M. L. Nollet & J. A. Gutierrez-Uribe (Eds.), *Phenolic compounds in food characterization and analysis* (pp. 33–52). <https://doi.org/10.1201/9781315120157>
- Gong, L., Li, Y., Zhang, Y., Wang, J., & Sun, B. (2019). *In vitro* evaluation of the bioaccessibility of phenolic acids in different whole wheats as potential prebiotics. *LWT - Food Science and Technology*, 100, 435–443.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.071>
- González-Burgos, E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2012). Terpene compounds in nature: A review of their potential antioxidant activity. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 5319–5341.
- Goulas, V., & Manganaris, G. A. (2012). Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of *Citrus* fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*, 131, 39–47.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.007>
- Gowda, S., Desai, P. B., Hull, V. V, Math, A. A. K., & Sonal, N. (2009). A review on laboratory liver function tests. *Pan African Medical Journal*, 3(November), 17.

- Guarrera, P. M., & Savo, V. (2016). Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 202–234. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.050>
- Hachelaf, A., Zellagui, A., & Touil, A. (2013). Chemical composition and analysis of antifungal properties of *Ranunculus Arvensis*. *Pharmacophore*, 4(3), 89–91.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 809–812. <https://doi.org/10.1021/jf60218a027>
- Hajimahmoodi, M., Sadeghi, N., Jannat, B., Oveisi, M. R., Madani, S., Kiayi, M., Akrami, M. R., & Ranjbar, A. M. (2008). Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of Iranian Olive cultivar. *Journal of Biological Sciences*, 8(4), 779–783. <https://doi.org/10.3923/jbs.2008.779.783>
- Hall, A. P., Elcombe, C. R., Foster, J. R., Harada, T., Kaufmann, W., Knippel, A., Kuttler, K., Malarkey, D. E., Maronpot, R. R., Nishikawa, A., Nolte, T., Schulte, A., Strauss, V., & York, M. J. (2012). Liver Hypertrophy: A Review of Adaptive (Adverse and Non-adverse) Changes — Conclusions from the 3rd International ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology*, 40, 971–994. <https://doi.org/10.1177/0192623312448935>
- Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486, 10–13. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9)
- Hou, B.-Y., Zhang, L., Wang, I.-H., & Du, G.-H. (2018). Rutin. In G.-H. Du (Ed.), *Natural Small Molecule Drugs from Plants* (pp. 145–150). Springer.
- Hu, B., Liu, X., Zhang, C., & Zeng, X. (2017). Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.004>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. P. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Hussain, J., Hussain, H., Shinwari, Z. K., Ahmad, I., Hussain, S. T., & Ahmad, V. U. (2009). Antibacterial activity of the chemical Constituents from *Ranunculus laetus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(5), 720–721.
- Jagdish, K., Mehul, S., & Nehal, S. (2010). Effect of hesperidin on serum glucose, hba1c and oxidative stress in myocardial tissue in experimentally induced myocardial infarction in diabetic rats. *Pharmacognosy Journal*, 2(7), 185–189.
- Jan, S., Khan, M. R., Rashid, U., & Bokhari, J. (2013). Assessment of antioxidant potential, total phenolics and flavonoids of different solvent fractions of *Monothea Buxifolia* fruit. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 4(5), 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2013.09.003>

- Kasangana, P. B., Haddad, P. S., & Stevanovic, T. (2015). Study of polyphenol content and antioxidant capacity of *Myrianthus arboreus* (Cecropiaceae) root bark extracts. *Antioxidants*, 4, 410–426. <https://doi.org/10.3390/antiox4020410>
- Kaurinovic, B., & Vastag, D. (2019). Flavonoids and phenolic acids as potential natural Antioxidants. In Emad Shalaby (Ed.), *Antioxidants* (pp. 1–20). <https://doi.org/10.5772/intechopen.83731>
- Kaya, G. İ., Somer, N. Ü., Konyalıoğlu, S., & Yalçın, H. T. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of *Ranunculus marginatus* var . trachycarpus and *R . sprunerianus*. *Turkish Journal of Biology*, 34, 139–146. <https://doi.org/10.3906/biy-0809-13>
- Kebièche, M., Lakroun, Z., Mraïhi, Z., & Soulimani, R. (2011). Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothérapie*, 9(5), 274–282.
- Khalid, S., Alia, A., Shrivastava, P. N., Nasir, B., & Bhat, B. A. (2016). *Ranunculus laetus*: evaluation of its total phenol content, total flavonoid content and reducing power assay (antioxidant property). *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(11), 453–457.
- Khan, M. Z., Jan, S., Khan, F. U., Noor, W., Khan, Y. M., Shah, A., Chaudhary, M. I., Ali, F., Khan, K., Ullah, W., & Sabil, N. (2017). Phytochemical screening and biological activities of *Ranunculus arvensis*. *International Journal of Biosciences*, 11(1), 15–21. <https://doi.org/10.12692/ijb/11.1.15-21>
- Khan, R. A., Khan, M. R., Sahreen, S., & Ahmed, M. (2012). Assessment of flavonoids contents and *in vitro* antioxidant activity of *Launaea procumbens*. *Chemistry Central Journal*, 6, 43–55. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-43>
- Khan, W. N., Ali, I., Gul, R., & Choudhary, M. I. (2008). Xanthine oxidase inhibiting compounds from *Ranunculus repens*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(1), 74–75.
- Khan, W. N., Lodhi, M. A., Ali, I., Azhar-Ul-haq, Malik, A., Bilal, S., Gul, R., & Choudhary, M. I. (2006). New natural urease inhibitors from *Ranunculus repens*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21(1), 17–19. <https://doi.org/10.1080/14756360500319210>
- Kibar, B., & Temel, S. (2016). Evaluation of mineral composition of some wild edible plants growing in the eastern Anatolia region grasslands of Turkey and consumed as vegetable. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(1), 56–66. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12583>
- Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Geroval, D., & Galunska, B. (2006). Correlation between the *in vitro* antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian Herbs. *Phytotherapy Research*, 20, 961–965. <https://doi.org/10.1002/ptr.1985>

- Kocak, A. O., Saritemur, M., Atac, K., Guclu, S., & Ozlu, I. (2016). A rare chemical burn due to *Ranunculus arvensis*: Three case reports. *Annals of Saudi Medicine*, 36(1), 89–91. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2016.89>
- Kruk, J., Aboul-enein, H. Y., Kładna, A., & Jacquelyn, E. (2019). Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. *Free Radical Research*, 53(5), 497–521. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1612059>
- Kubitzki, K. (1993). *The families and genera of vascular plants* (K. Kubitzki, G. Rohwer, & V. Bittrich, Eds.). Berlin: Springer-Verlag.
- Kumar, S., Sandhir, R., & Ojha, S. (2014). Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. *BMC Research Notes*, 7, 560–569. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-560>
- Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.011>
- Le, K., Chiu, F., & Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.063>
- León-González, M. E., Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., & Madrid-Albarrán, Y. (2018). Residual brewing yeast as a source of polyphenols: Extraction, identification and quantification by chromatographic and chemometric tools. *Food Chemistry*, 267, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.141>
- Li, T., Shen, P., Liu, W., Liu, C., Liang, R., Yan, N., & Chen, J. (2014). Major polyphenolics in pineapple peels and their antioxidant interactions. *International Journal of Food Properties*, 17(8), 1805–1817. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.732168>
- Li, X., Wu, X., & Huang, L. (2009). Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of *Radix Angelicae sinensis* (Danggui). *Molecules*, 14, 5349–5361. <https://doi.org/10.3390/molecules14125349>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(March), 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Loganayaki, N., Siddhuraju, P., & Manian, S. (2013). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 687–695. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0389-x>

- Lou, S. N., Hsu, Y. S., & Ho, C. T. (2014). Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.020>
- Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Krystyna, S.-W., Aprotosoiaie, A. C., & Trifan, A. (2020). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(4), 1–34. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546669>
- Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., & Liaudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological Chemistry*, 395(2), 203–230. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0241>
- Mailloux, R. J. (2019). Cysteine switches and the regulation of mitochondrial bioenergetics and ROS production. In J. Nunnari & A. Suomalainen (Eds.), *Mitochondria: In sickness and in health* (Vol. 1158, pp. 197–216). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
- Maire, R. (1964). *Flore de l'Afrique du nord*(Maroc,Algérie,Tunisie,Tripolitaine,Cyrénaïqueet Sahara) (P. le Chevalier, Ed.). Paris.
- Maisarah, A. M., Asmah, R., & Fauziah, O. (2013). Antioxidant analysis of different parts of *Carica papaya*.*International Food Research Journal*, 20(3), 1043–1048. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000267>
- Makris, D. P., Boskoub, G., & Andrikopoulosb, N. K. (2007). Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.04.010>
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. A., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45, 31–34.
- Miki, M., Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y., & Nikit, E. (1987). Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258(2), 373–380.
- Minihane, A. M., Vinoy, S., Russell, W. R., Baka, A., Roche, H. M., Tuohy, K. M., Teeling, J. L., Blaak, E. E., Fenech, M., Vauzour, D., McArdle, H. J., Kremer, B.H.A., Sterkman, L., Vafeiadou, K., Benedetti, M. M., Williams, C. M., &Calder, P. C. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: Current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*, 114(7), 999–1012. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002093>
- Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>

- Mojzer, E. B., Hrnčič, M. K., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21, 901. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Moussa, Z., Zaher M.A., J., & Saleh A., A. (2019). Nonenzymatic exogenous and endogenous antioxidants. In K. K. Das, S. Das, M. S. Biradar, V. Bobbarala, & S. S. Tata (Eds.), *Free Radical Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87778>
- Mrduljaš, N., Krešić, G., & Bilušić, T. (2017). Polyphenols: Food sources and health benefits. In M. C. Hueda (Ed.), *Functional food - Improve health through adequate food* (pp. 23–41). <https://doi.org/10.5772/intechopen.68862>
- Murugesan, S., Venkateswaran, M. R., Jayabal, S., & Periyasamy, S. (2020). Evaluation of the antioxidant and anti-arthritic potential of *Zingiber officinale* Rosc. by *in vitro* and *in silico* analysis. *South African Journal of Botany*, 130, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.019>
- Mutai, C., Abatis, D., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C., & Roussis, V. (2007). Lupane triterpenoids from *Acacia mellifera* with cytotoxic activity. *Molecules*, 12, 1035–1044. <https://doi.org/10.3390/12051035>
- Nabi, S. (2014). *Toxic effects of mercury*. New Delhi: Springer.
- Nagar, E. E., Okun, Z., & Shpigelman, A. (2019). Digestive fate of polyphenols: updated view of the influence of chemical structure and the presence of cell wall material. *Current Opinion in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.009>
- Nakaya, S., Usami, A., Yorimoto, T., & Miyazawa, M. (2015). Characteristic chemical components and aromaactive compounds of the essential oils from *Ranunculus nipponicus* var. *submersus* used in Japanese traditional food. *Journal of Oleo Science*, 64(6), 595–601. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14265>
- Neag, T., Toma, C.-C., Olah, N., & Ardelean, A. (2017). Polyphenols profile and antioxidant activity of some Romanian *Ranunculus* species. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Seria Chimia*, 3, 75–88.
- Nićiforović, N., Tomaž Polak, Makuc, D., Ulrih, N. P., & Abramovič, H. (2017). A kinetic approach in the evaluation of radical-scavenging efficiency of sinapic acid and its derivatives. *Molecules*, 22, 375–392. <https://doi.org/10.3390/molecules22030375>
- Nickavar, B., & Esbati, N. (2012). Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 5(3), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.03.003>
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5, 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>

- Nunes, A. C. F. (2020). Introductory chapter: Overview of the cellular and molecular basis of inflammatory process. In A. C. F. Nunes (Ed.), *Translational studies on inflammation* (pp. 1–5). intechopen.
- Odabasoglua, F., Aslanb, A., Cakirc, A., Suleymand, H., Karagoza, Y., Bayira, Y., & Halicia, M. (2005). Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, 76, 216–219. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.05.012>
- OECD, & (OECD), O. for E. C. and D. (2011). *Guidelines for the testing of chemicals. Acute Oral Toxicity - AcuteToxic Class Method, Test no. 423,*.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351–358.
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Vassiliki, O. (2019). Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. In R. R. Watson (Ed.), *Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation* (2nd ed., pp. 243–259). Academic Press.
- Ouarghidi, A., Martin, G. J., Powell, B., Esser, G., & Abbad, A. (2013). Botanical identification of medicinal roots collected and traded in Morocco and comparison to the existing literature. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9, 59–72. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-59>
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Ozcan, A., & Ogun, M. (2015). Biochemistry of reactive oxygen and nitrogen species. In S. J. T. Gowder (Ed.), *Basic principles and clinical significance of oxidative stress* (pp. 37–58). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
- Palakkal, L., Hukuman, N. H. Z., & Mullappally, J. (2017). Antioxidant activities and chemical composition of various crude extracts of *Lepidagathis keralensis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(06), 182–189. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70626>
- Parra, A. L., Yhebra, R. S., Sardiñas, I. G., & Buela, L. I. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400.
- Paudel, B., Bhattarai, H. D., Kim, I. C., Lee, H., Sofronov, R., Ivanova, L., Poryadina, L., &Yim, J. H. (2014). Estimation of antioxidant, antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of plants collected from Oymyakon region of the Republic of Sakha (Yakutia), Russia. *Biological Research*, 47, 10–16. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-10>
- Pavan, V., Sancho, A. R. S., & Pastore, G. M. (2014). The effect of in vitro digestion on the antioxidant activity of fruit extracts (*Carica papaya*, *Artocarpus heterophyllus* and

- Annona marcgravii*). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1247–1251. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.040>
- Pawlikowska-Pawlega, B., Gruszecki, W., Misiak, L., & Gawron, A. (2003). The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochemical Pharmacology*, 66, 605–612.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14, 2202–2211. <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pinacho, R., Caverio, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., & Calvo, M. I. (2015). Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*, 19, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.015>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- Poppenga, R. H., & Puschner, B. (2014). Toxicology. In *Equine Emergencies* (Fourth Edi, pp. 580–606). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0892-5.00034-9>
- Prieto, J. M., Recio, M. C., Giner, R. M., Máñez, S., & Rios, J. L. (2003). Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 131–137. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00271-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00271-X)
- Prieto, J. M., Recio, M. C., Giner, R. M., Schinella, G. R., Máñez, S., & Ríos, J. L. (2008). In vitro and in vivo effects of *Ranunculus peltatus* subsp. *Baudotii* methanol extract on models of eicosanoid production and contact dermatitis. *Phytotherapy Research*, 22, 297–302. <https://doi.org/10.1002/ptr.2309>
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3273–3279. <https://doi.org/10.1021/jf0262256>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
<https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396–3402.
- Rafińska, K., Pomastowski, P., Rudnicka, J., Krakowskaa, A., Maruška, A., Narkute, M., & Buszewski, B. (2019). Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts. *Food Chemistry*, 289, 16–25.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.025>
- Rai, M., Acharya, D., & Ríos, J. L. (2011). *Ethnomedicinal Plants: Revitalization of Traditional Knowledge of Herbs*. Enfield, NH, USA: CRC press.
- Ramawat, K. G., & Mérillon, J.-M. (2013). *Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Righi, N., Boumerfeg, S., Fernandes, P. A. R., Deghima, A., Baali, F., Coelho, E., Cardoso, S. M., Coimbra, M. A., & Baghiani, A. (2020). *Thymus algeriensis* Bioss & Reut: Relationship of phenolic compounds composition with *in vitro* / *in vivo* antioxidant and antibacterial activity. *Food Research International*, 136, 109500.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109500>
- Rivera, D., Obón, C., Heinrich, M., Inocencio, C., Verde, A., & Fajardo, J. (2006). Gathered Mediterranean food plants – ethnobotanical investigations and historical development. In M. Heinrich, W. E. Müller, & C. Galli (Eds.), *Local Mediterranean Food Plants and Nutraceuticals* (Vol. 59, pp. 18–74). Basel: Karger.
- Ruch, R. J., Cheng, S. J., & Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10, 1003–1008.
- Russo, G. (2000). Nonsteroidal anti-Inflammatory drugs and topical anti-Inflammatory agents. In L. E. Millikan (Ed.), *Drug Therapy in Dermatology* (p. 103).
<https://doi.org/10.1201/b14006>
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M. N., & Ismail, S. (2010). Brine shrimp lethality and acute oral toxicity studies on *Swietenia mahagoni* (Linn.) Jacq. seed methanolic extract. *Pharmacognosy Research*, 2(4), 215–220.
<https://doi.org/10.4103/0974-8490.69107>
- Sajitha, G. R., Jose, R., Andrews, A., Ajantha, K. G., Augustine, P., & Augusti, K. T. (2010). Garlic oil and Vitamin E prevent the adverse effects of lead acetate and ethanol

- separately as well as in combination in the drinking water of rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25(3), 280–288. <https://doi.org/10.1007/s12291-010-0042-x>
- Santos, D. I., Manuel, J., Saraiva, A., Vicente, A. A., & Moldão-martins, M. (2019). Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients. In *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds* (pp. 23–54). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00002-0>
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In Emad Shalaby (Ed.), *Antioxidants* (pp. 1–29). <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Sarikurkcü, C., Targan, S., Ozer, M. S., & Tepe, B. (2017). Fatty acid composition, enzyme inhibitory, and antioxidant activities of the ethanol extracts of selected wild edible plants consumed as vegetables in the Aegean region of Turkey. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 560–572. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1168837>
- Schett, G., & Neurath, M. F. (2018). Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. *Nature Communications*, 9(1), 3261. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05800-6>
- Seeman, P., & Weinstein, J. (1966). Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. *Biochemical Pharmacology*, 15, 1737–1752. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(66\)90081-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(66)90081-5)
- Seraglio, S. K. T., Valese, A. C., Daguer, H., Bergamo, G., Azevedo, M. S., Nehring, P., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Oliveira Costa, A. C. (2017). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys. *Food Research International*, 99(April), 670–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.024>
- Shahid, S., Riaz, T., & Asghar, M. N. (2015). Screening of *Ranunculus sceleratus* for enzyme inhibition, antibacterial and antioxidant activities. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10, 436–442. <https://doi.org/10.3329/bjp.v10i2.22805>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67–103. <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>
- Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X., & Li, P. (2010). Antioxidant activity in vitro of the selenium-contained protein from the Se-enriched *Bifidobacterium animalis* 01. *Anaerobe*, 16, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.006>

- Shinde, U. A., Phadke, A. S., Nair, A. M., A A Mungantiwar, Dikshit, V. J., & Saraf, M. N. (1999). Membrane stabilizing activity: a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, 70, 251–257. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00030-1)
- Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2144–2155. <https://doi.org/10.1021/jf020444+>
- Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks. In H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress* (pp. 1–8). London: Academic Press.
- Sies, H. (2019). Oxidative Stress: Eustress and distress in redox homeostasis. In George Fink (Ed.), *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (pp. 153–163). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8>
- Sies, H. (2020). Oxidative eustress and oxidative distress: Introductory remarks. In *Oxidative Stress* (pp. 3–12). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818606-0.00001-8>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11(December 2016), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 25.1-25.34.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.013>
- Spínola, V., Pinto, J., Llorent-martínez, E. J., & Castilho, P. C. (2019). Changes in the phenolic compositions of *Elaeagnus umbellata* and *Sambucus lanceolata* after *in vitro* gastrointestinal digestion and evaluation of their potential anti-diabetic properties. *Food Research International*, 122(January), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.030>
- Sroka, Z., Fecka, I., & Cisowski, W. (2005). Antiradical and anti-H₂O₂ properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 60, 826–832.
- Stickel, F., Patsenker, E., & Schuppan, D. (2005). Herbal hepatotoxicity. *Journal of Hepatology*, 43, 901–910. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.08.002>

- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267–4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W.-P.-P., & Rahman, H. S. (2018). Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9(October), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01162>
- Tangney, C. C., & Rasmussen, H. E. (2013). Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 15, 324. <https://doi.org/10.1007/s11883-013-0324-x>
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., & Sokmen, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.013>
- Torres-Rêgo, M., Furtado, A. A., Bitencourt, M. A. O., Lima, M. C. J. de S., Castro de Andrade, R. C. L., Pereira de Azevedo, E., Soares, T. da C., Tomaz, J. C., Lopes, N. P., Antônio da Silva-Júnior, A., Zucolotto, S. M., Fernandes-Pedrosa, M. de F. (2016). Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *Complementary and Alternative Medicine*, 16, 275. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1259-x>
- Ugwah-oguejiofor, C. J., & Ogbonna, C. (2019). Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Caralluma dalzielii* N. E. Brown in mice and rats. *Heliyon*, 5(January), e01179. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01179>
- Vieito, C., Fernandes, É., Velho, M. V., & Pires, P. (2018). The effect of different solvents on extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of extracts from Pine Bark (*Pinus pinaster* subsp. atlantica). *Chemical Engineering Transactions*, 64.
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., Roberto, M., & Junior, M. (2019). Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. In M. R. S. Campos (Ed.), *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (1st editio, pp. 33–50). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>
- Wallig, M. A., & Janovitz, E. B. (2018). Morphologic manifestations of toxic cell injury. In *Fundamentals of Toxicologic Pathology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809841-7.00005-8>
- Ward, P. A. (2010). Acute and chronic inflammation. In C. n. Serhan, P. a. Ward, & derek W. Gilroy (Eds.), *Fundamentals of inflammation* (pp. 1–28). New York: Cambridge University Press.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-

- Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.033>
- Wu, P., Ma, G., Li, N., Deng, Q., Yin, Y., & Huang, R. (2015). Investigation of *invitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. *Food Chemistry*, 173, 194–202.
- Xu, Q., Wang, Y., Guo, S., Shen, Z., Wang, Y., & Limei Yang a, B. (2014). Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 152, 540–545. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.037>
- Yang, M., Hardin, R., Ogutu, S., Verghese, M., & Boateng, J. (2016). Preliminary analysis of *in vitro* digestion and bioactivity assessment of basil and ginger in human liver cancer cell line. *Journal of Biological Sciences*, 16(6–7), 202–214. <https://doi.org/10.3923/jbs.2016.202.214>
- Yang, Q., Zhang, D., Kabeer, A., Yang, X., Li, H., Kong, K., ... Gan, R. (2020). Phytochemicals, essential oils, and bioactivities of an underutilized wild fruit Cili (*Rosa roxburghii*). *Industrial Crops & Products*, 143(October 2019), 111928. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111928>
- Yesmin, R., Karmakar, P. C., Ali, H., & Biswas, K. K. (2017). Membrane stabilizing and thrombolytic activities of methanolic extract of *Trichosanthes dioica* Roxb. Shoot. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 2500–2502.
- Zhang, C., Wang, N., Xu, Y., Tan, H., Li, S., & Feng, Y. (2018). Molecular mechanisms involved in oxidative stress-associated liver injury induced by Chinese herbal medicine: An experimental evidence-based literature review and network pharmacology study. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2745. <https://doi.org/10.3390/ijms19092745>
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>
- Zhang, Z., Miao, Y., Xu, M., Cheng, W., Yang, C., She, X., Geng, Q., & Zhang, Q. (2020). TianJiu therapy for α -naphthyl isothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis in rats treated with fresh *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 248(February), 112310. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112310>
- Zhang, Z., Jin, Q., Lv, G., Fan, L., Pan, H., & Fan, L. (2013). Comparative study on antioxidant activity of four varieties of *Flammulina velutipes* with different colour. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(5), 1057–1064. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12062>
- Zhao, H., Zhang, H., & Yang, S. (2014). Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese Jujube. *Food Science and Human Wellness*, 3, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.12.005>

Publications internationales



Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. Roots: Quantification, identification and antioxidant activity

Amirouche Deghima^{a,*}, Nadjat Righi^b, Noelia Rosales-Conrado^c,
María Eugenia León-González^c, Esther Gómez-Mejía^c, Yolanda Madrid^c, Faiza Baali^b,
Fatiha Bedjou^a

^a Laboratoire de Biotechnologies végétales et Ethnobotanique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria

^b Department of Biological Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, University Bordj Bou-Arraridj, 34000, Algeria

^c Departamento de Química Analítica, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

ARTICLE INFO

Article History:

Received 5 January 2020

Revised 21 March 2020

Accepted 26 March 2020

Available online xxx

Edited by J Grúz

Keywords:

Ranunculus macrophyllus Desf.

Roots

Polyphenols

Antioxidant

Antiradical

Triterpenoids

ABSTRACT

Ranunculus macrophyllus Desf. is an Algerian medicinal plant whose roots are used in traditional medicine to cure feminine infertility and other diseases, however there are no studies regarding its phytochemistry and biological activities. The aim of this work is to study the phytochemical composition and antioxidant activity of different solvents fractions from the roots of *Ranunculus macrophyllus* Desf. Spectrophotometric and chromatographic methods were used to study the phytochemical composition; while antiradical, iron chelating ability, reducing power and lipid peroxidation were studied *in-vitro*. The ethyl acetate fraction showed the highest values of total phenolic compounds ($271.0 \pm 0.2 \mu\text{g GAE/mg dry extract (d.e)}$), flavonols ($24 \pm 5 \mu\text{g RE/mg d.e}$) and condensed tannins ($129 \pm 10 \mu\text{g CE/mg d.e}$), while the hexane fraction contained the highest amount of triterpenoids ($91 \pm 7 \mu\text{g UAE/mg d.e}$). The highest radical scavenging ability was recorded for the ethyl acetate fraction against DPPH ($\text{IC}_{50} = 3.7 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$) and ABTS ($\text{IC}_{50} = 81 \pm 3 \mu\text{g/mL}$) whereas the hexane fraction had the best hydrogen peroxide radical scavenging ($\text{IC}_{50} = 380 \pm 4 \mu\text{g/mL}$). The ethyl acetate fraction had the best total antioxidant capacity ($\text{TAC} = 361 \pm 1 \mu\text{AAE/mg extract}$) and reducing power ($310 \pm 2 \mu\text{AAE/mg extract}$). The β -carotene bleaching was inhibited at high rate even after 24 h by the ethyl acetate fraction ($81.0 \pm 0.5 \%$). All activities were correlated with the polyphenolic content of the fractions. Capillary LC-DAD and LC-MS/MS analysis of ethyl acetate fraction revealed high amounts of gallic acid ($9.3 \pm 0.6 \text{ mg/g d.e}$), dihydroxybenzoic acid ($8.1 \pm 0.2 \text{ mg/g d.e}$) and hesperidin ($5.9 \pm 0.6 \text{ mg/g d.e}$). With such high amounts of polyphenols and strong antioxidant activity *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots could have a potential use in pharmaceutical and nutraceutical industries.

© 2020 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Humans have always relied on plants to fulfil their basic needs, like food, and also to cure diseases (Huy et al., 2018; Du, 2018). The use of medicinal plants to cure diseases and relieve pain is still relevant, even with the great advancements in modern medicine, medicinal plants still largely contribute to general health care. In this context, 11% from the basic and essential drugs are exclusively from plant origin, additionally many synthetic drugs come from natural precursors (Pandey et al., 2019). The increasing interest in medicinal plants is mainly driven by the thoughts that natural products are

more effective than synthetic ones, also having less side effect. They are also an economical alternative to conventional pharmacological treatments, especially in developing countries (Alamgir, 2018; Pandey et al., 2019). Crude drugs and their products are of economic importance and profitable commercial products (Shah and Seth, 2010). In addition to the therapeutic use of natural products deriving from medicinal plants, they are also used in other industries, beverages, condiments, spices, cosmetics, in confectioneries and as technical products (Shah and Seth, 2010; Du, 2018). The medicinal plants market is expected to reach the 5 trillion USD mark by 2050 (Alamgir, 2018). On the other hand, the efficiency of medicinal plants is due to their richness in bioactive compounds. Among these phytochemicals, polyphenols are the most distributed and structurally diverse group of bioactive compounds in the medicinal plants. Multiple biological activities have been ascribed to polyphenols, particularly well-known to be excellent antioxidants (Lingua et al., 2016; Alamgir, 2018). Their antioxidant ability enables them to scavenge the harmful free

* Corresponding author.

E-mail addresses: a.deghima@univ-biskra.dz (A. Deghima), n.righi@univ-bba.dz (N. Righi), noerosales@quim.ucm.es (N. Rosales-Conrado), leongon@ucm.es (M.E. León-González), egomez03@ucm.es (E. Gómez-Mejía), ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid), Faizabaali@univ-bba.dz (F. Baali).

radicals, and to protect cells from the devastating effects of oxidative stress caused by high levels of free radicals (Belščak-Cvitanović et al., 2018). The latter was associated with the pathology of several diseases, including cancer, diabetes mellitus, atherosclerosis, neurodegenerative and inflammatory diseases, psychiatric disorders and/or aging process (Rodrigo, 2009; Zdeňka, 2014). Due to their several health promoting benefits, there is still an increasing demand on polyphenols in the market, which reached 1.28 billion USD in 2018 with a compound annual growth rate of 7.2% from 2019 to 2025 (Grand View Research, 2019).

On the other hand, members of the genus *Ranunculus* have been reported to have interesting biological activities, such as anti-cancer (*Ranunculus sieboldii*), anti-inflammatory (*Ranunculus pedatus*), antioxidant (*Ranunculus auricomus*), antibacterial (*Ranunculus muricatus*) and anti-hypertensive (*Ranunculus japonicus*) (Da-Cheng, 2018). The wide range of bioactivities exhibited by members of the genus *Ranunculus* is mainly attributed to their content of bioactive phytochemicals, specially polyphenols, flavonoids, triterpenoids and saponins, alkaloids and volatile compounds (Aslam et al., 2012).

Particularly, *Ranunculus macrophyllus* Desf. is one of the 50 *Ranunculus* species found in Algeria (Hachelaf et al., 2013). Its leaves are used for the treatment of certain skin diseases (Rai et al., 2011), while roots are traditionally used to treat feminine infertility and to gain weight (Rivera et al., 2006; Ouarghidi et al., 2013). Despite the frequent use of *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots in traditional medicine, there is a dearth of scientific information on their chemical composition and bioactivity. Thus, the aim of this work is to elucidate for the first time the phytochemical composition of *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots both quantitatively and qualitatively. In addition, the antioxidant activity of their different solvent extracts was estimated *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All chemicals and solvents were of analytical grade, and purified water from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used. For LC-MS/MS analysis, methanol, water and formic acid were of OptimaTM LC/MS grade (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH) of gradient HPLC quality were provided by Scharlab (Barcelona, Spain). Hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, folin-ciocalteu, sodium bicarbonate, aluminum chloride, bovine serum albumin, sodium dodecyl sulfate (SDS), triethanolamine (TEA), tannic acid, vanillin, acetic acid, perchloric acid, ursolic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate, hydrogen peroxide, disodium hydrogen phosphate, sodium phosphate monobasic dihydrate, ferrous chloride, ferrozine, EDTA, trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride, Potassium hexacyanoferrate(III), ammonium molybdate tetrahydrate, sulphuric acid, β -carotene, linoleic acid, tween 40, butylated hydroxyanisole (BHA), ascorbic acid (vitamin C) and trifluoroacetic acid (TFA, 99%), were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Plant material

The Roots of *Ranunculus macrophyllus* Desf. were gathered from Ras El Oued- Bordj Bou Arreridj province north-east Algeria in May 2018. The plant was identified by Dr. Bouadam from the department of physico-chemical biology of the university of Bejaia and a voucher specimen (AB-108) has been deposited at the herbarium of the life and natural science department, M'sila university. The roots were well washed with milli-Q water then air dried for one month and powdered with an electric grinder.

2.3. Extraction and fractionation

The extraction of the plant powder was conducted according to Prieto et al. (2003). The first step consisted in a solid-liquid extraction, in which an amount of 100 g of root powder was macerated at room temperature, three times, with 500 mL of pure methanol. The combined filtrates were evaporated under low pressure using a rotary evaporator (40° C), yielding the crude methanolic extract. The latter was dissolved in 100 mL of an aqueous methanol solution (10%, v) and subjected to a liquid-liquid extraction in a separating funnel as a second step. The crude extract was sequentially extracted using solvents of increasing polarity; hexane (HR), chloroform (CR), ethyl acetate (EAR) and *n*-butanol (BR) to provide 4 fractions. The remaining aqueous phase was designed as the fifth fraction (AR).

2.4. Total polyphenols content (TPC)

The total phenolic content of the plant fractions was estimated by the method of Singleton and Rossi (1965). A volume of 200 μ L of the sample was mixed with 1 mL of 10% (v) Folin-Ciocalteu reagent and incubated for 4 min. Then 800 μ L of 7.5% (w) sodium carbonate was added. The resulting mixture was finally incubated for 2 h and the absorbance was measured at 765 nm against the corresponding blank. Gallic acid was used as standard and a calibration curve was prepared in the same conditions of samples. The results were expressed as μ g of gallic acid per mg of dried extract (μ g GAE/mg d.e).

2.5. Total flavonoids content (TFC)

The total flavonoids content was evaluated following the aluminum trichloride method. A volume of 0.50 mL of each extract was mixed with the same volume of aluminum trichloride (2%, w) and then incubated during 15 min. The absorbance was measured at 430 nm. Quercetin was used to obtain a calibration curve under same conditions. The results were expressed as μ g of quercetin per mg of dried extract (μ g QE/mg d.e) (Djeridane et al., 2006).

2.6. Total tannins content (TTC)

The total tannins content of all sample fractions was estimated according to the method based on their ability to precipitate proteins. One volume of sample was mixed with two volumes of BSA (1mg/mL), and then incubated during 15 min at room temperature. The mixture was centrifuged for 15 min at 3000g and the supernatant was discarded. In a second step the platelets remaining in the test tube were dissolved in 4 mL SDS/TEA solution (1% SDS, 5% v/v TEA in distilled water), and 1 mL of FeCl₃ was added. The mixture was then incubated again for 15 min and the absorbance was measured at 510 nm. A blank solution was prepared by mixing 1 mL of FeCl₃ and 4 mL of the SDS/TEA solution. Tannic acid was used as reference compound and the results were expressed as μ g of TEA per mg of dried extract (μ g TEA/mg d.e) (Hagerman and Butler, 1978).

2.7. Flavonols content (FOL)

To evaluate flavonols content of plant fractions, 1 mL of sample extract and 1 mL of aluminum trichloride (2%, w) were mixed with 1.5 mL of 5% aqueous sodium acetate (w) and incubated at 25°C for 2.5 h. The absorbance was then registered at 440 nm and the results were expressed as μ g of rutin per mg of dried extract (μ g RE/mg d.e) using the calibration curve prepared with rutin standard (Kumaran and Karunakaran, 2007).

2.8. Condensed tannins content (CTC)

The estimation of condensed tannins was performed according to the optimizations of Sun et al. (1998). A volume of 250 μL of each extract (1 mg/mL in methanol) was mixed with 625 μL of 1% (w) vanillin (prepared in methanol) and 625 μL of 10% (v) sulphuric acid (in methanol). The mixture was incubated at room temperature for 15 min and the absorbance was measured at 500 nm. A calibration curve was prepared using catechin as standard, and the results were expressed as μg of catechin per mg of dried extract ($\mu\text{g E/mg d.e.}$).

2.9. Triterpenoid content (TC)

For the triterpenoid estimation, 30 μL of the plant extracts, 50 μL of 5% (w) of vanillin prepared in acetic acid, and 100 μL of perchloric acid were mixed. The resulting mixture was incubated at 60°C for 45 min and cooled in an ice-water bath. Then, 450 μL of acetic acid was added. The absorbance was measured at a wavelength of 548 nm. Ursolic acid was used as standard to prepare the calibration curve and the results were expressed as μg of ursolic acid per mg of dried extract ($\mu\text{g UAE/mg d.e.}$) (Chang et al., 2012).

2.10. Chromatographic analysis of phenolic compounds

2.10.1. Capillary LC-DAD analysis

The method described by León-González et al. (2018) was adopted to analyze the phenolic content of the plant ethyl acetate fraction using an Agilent cLC instrument Mod. 1100 Series (Agilent Technologies, Madrid, Spain), equipped with a G1376A binary capillary pump, a G1379A degasser and a G1315B diode array detector (500 nL, 10 mm pathlength). Reversed-phase high-performance liquid chromatography was performed on a SynergiTM Fusion 4 μm C18 (150 mm $\times$ 0.3 mm I.D.) capillary analytical column supplied by Phenomenex (Torrance, CA, USA), which was maintained at room temperature. An external stainless-steel loop of a volume of 10 μL was placed into a Rheodyne[®] injection valve. Detection was made using a diode array HP8543 UV/Vis detector (Agilent Technologies), connected to HP Chemstation software. The Agilent Chemstation software package for Microsoft Windows was used to acquire and analyze data.

The composition of the mobile phase consisted in a mixture of two solvents; acetonitrile (A) and TFA aqueous solution 0.1% (v) at pH 3.2 (B). The gradient composition was 8% (v) A for 3 min, followed by a linear increase to 34% (v) A during 11 min, an isocratic step at 34% (v) A for 7 min, and then a linear decrease to 8% (v) A, which was maintained until the end of the analysis. The mobile phase flow rate was set at 10 $\mu\text{L/min}$.

Polyphenols were detected at 220, 260, 292, 310 and 365 nm and identified on the basis of their retention times and UV absorption in comparison to that of pure standards. Compounds were quantified at their maximum absorption wavelength; 260 nm for 4-dihydroxybenzoic acid, 292 nm for gallic acid, naringin and hesperidin, 365 nm for rutin, quercetin, myricetin and kaempferol, and 310 nm for chlorogenic acid, *trans*-ferulic, *p*-coumaric acid, caffeic acid and resveratrol, by using their respective external calibration curves. Linear ranges were within 10–310 $\mu\text{g/L}$ for gallic acid, 10–75 $\mu\text{g/L}$ for 3,4-dihydroxybenzoic acid, 40–400 $\mu\text{g/L}$ for chlorogenic acid, 20–400 $\mu\text{g/L}$ for *p*-coumaric and 15–200 $\mu\text{g/L}$ for *trans*-ferulic acids, 30–200 $\mu\text{g/L}$ for rutin, 15–60 $\mu\text{g/L}$ for naringin, 10–60 $\mu\text{g/L}$ for resveratrol, 5–60 $\mu\text{g/L}$ for quercetin, 12–60 $\mu\text{g/L}$ for kaempferol and 100–500 $\mu\text{g/L}$ for hesperidin. Linearity was evaluated in terms of the squared correlation coefficients (r^2). All r^2 values were higher than 0.95 for the polyphenol calibration curves. For on-column focusing purposes, all injection solutions were prepared in 0.1% (v) TFA aqueous solution adjusted at pH 3.2, containing 1% (v) of pure acetonitrile.

The quality parameters of the capillary LC-DAD method, including detection and quantitation limits, linearity range, run-to-run precision and day-to-day precision can be found in the studies performed by León-González et al., (2018), Gómez-Mejía et al., (2019) and Ramón-Gonçalves et al., (2019).

2.10.2. LC-MS/MS analysis

The identities of compounds were corroborated by LC-MS/MS in negative electrospray ionization (ESI) mode, using a Shimadzu LC-MS-8030 triple quadrupole system (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) equipped with a Nexera LC-30AD solvent delivery unit, a Nexera SIL-30AC autosampler with temperature-controlled tray, and a CTO-20AC column oven. A SynergiTM C18 Fusion-RP 80 Å analytical column from Phenomenex (150 $\times$ 3 mm I.D., 4 μm) at room temperature was used as stationary phase. Data were acquired and processed with the LabSolutions LC-MS software provided by Shimadzu. The MS/MS equipment used nitrogen as both nebulizing (1.5 L/min) and drying (15.0 L/min) gas. Fragmentation was performed using argon as the collision gas at a pressure of 230 kPa in the collision cell, and the collision energy voltages applied were in the range 10–55 eV. ESI for ionization voltage was set at –4.5 kV. The interface current was fixed at 6.2 μA , and the detector voltage at 1.84 kV.

A mixture of methanol (solvent A) and 0.2% (v) formic acid aqueous solution (solvent B) was used as mobile phase: 5% (v) A was maintained for 0.1 min, then a linear increase to 40% A (v) within 25 min, and finally a linear increase to 70% (v) A within another 10 min. This condition was held for 2 min, then changed to the initial conditions (5% A) within 1 min and equilibrated for 2 min. The flow rate was 0.50 mL/min. The injection solution was prepared as follows; 40 μL of plant extracts were added to 2.5 mL of methanol containing 0.2% (v) formic acid then diluted to 5 mL with LC/MS grade water. A volume of 20 μL of this mixture was injected into the chromatograph. For quantification purposes, calibration curves were performed using external calibrations. Linearity ranges were within 30–130 $\mu\text{g/L}$ for gallic acid, 10–80 $\mu\text{g/L}$ for dihydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, hesperidin, caffeic acid and resveratrol, 10–100 $\mu\text{g/L}$ for chlorogenic acid, 20–80 $\mu\text{g/L}$ for *trans*-ferulic acid and kaempferol, 20–100 $\mu\text{g/L}$ for naringin and rutin, 5–50 $\mu\text{g/L}$ for quercetin and myricetin, and 15–130 $\mu\text{g/L}$ for catechin (Gómez-Mejía et al., 2019).

3. In-vitro antioxidant activity

3.1. DPPH scavenging assay

A mixture of 0.5 mL of 0.1 mM methanolic DPPH solution and 1.5 mL of sample extracts was incubated in the dark for 30 min, and the absorbance was measured at 517 nm (Shen et al., 2010). BHT, BHA (synthetic antioxidant), and gallic acid and quercetin (pure compounds) were used as reference compounds. The inhibition of the DPPH radical was calculated by using the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Ac} - \text{At}/\text{Ac}) * 100$$

Where Ac is the absorbance of the control and At is the absorbance of the test.

The calculated inhibition percentages were plotted against sample concentrations and the resulting plots were used to calculate the IC₅₀ (concentration of the sample that reduce 50% of DPPH free radical initial concentration).

3.2. ABTS scavenging assay

The radical scavenging activity was also evaluated using the stable cation radical ABTS, as described by Re et al. (1999). ABTS radical was generated by mixing the ABTS solution (7 mM) with 13.24 mg of potassium persulfate for 16 h. The resulting solution was refrigerated,

then diluted to reach an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. A volume of 100 μL of sample was mixed with 1.9 mL of ABTS^{••} solution, and then incubated. After 7 min, the absorbance was measured at 734 nm. BHA, BHT, gallic acid and quercetin were used as standard compounds. The ABTS inhibition was calculated using the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Ac} - \text{At}/\text{Ac}) * 100$$

Where Ac is the absorbance of the control and At is the absorbance of the test.

The estimated inhibition percentages were plotted against sample concentrations and the resulting plots were used to calculate the IC_{50} (concentration of the sample that reduce 50% of the ABTS initial concentration).

3.3. Hydrogen peroxide scavenging assay

Hydrogen peroxide scavenging activity of the plant fractions was assessed based on the method proposed by Ruch et al. (1989). A volume of 0.50 mL of the sample was dissolved in PBS (pH 7.4) and mixed with 1 mL of freshly prepared 20 μmol H_2O_2 solution. The mixture was incubated in the dark for 10 min, and then the absorbance was measured at 240 nm. A blank control was prepared for each concentration, by adding PBS instead of the sample extract. Gallic acid (GA) and BHA were used as reference compounds. The percentage inhibition of hydrogen peroxide was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Ac} - \text{At}/\text{Ac}) * 100$$

Where Ac is the absorbance of the control and At is the absorbance of the test.

The inhibition percentages were plotted against sample concentrations and the resulting plots were used to calculate the IC_{50} (concentration of the sample that reduce 50% of the H_2O_2 initial concentration)

3.4. Reducing power assay

The reducing power of the extracts was evaluated according to Oyaizu (1986). Briefly, equal volumes of the sample extract, potassium hexacyanoferrate (1%, w) and phosphate buffer (0.2 M at pH 6.6) were mixed and incubated at 50°C for 20 min. The same volume of TCA (10%, w) was immediately added and the mixture was centrifuged at 700 rpm for 10 min. A supernatant volume of 1.25 mL was then mixed with 1.25 mL of milli-Q water and 0.5 mL of FeCl_3 (0.1%, w). The mixture was vortexed and the absorbance was registered at 700 nm. BHA, BHT, gallic acid and quercetin were used as standard compounds. A calibration curve using ascorbic acid was prepared in the same conditions that samples and the results were expressed as ascorbic acid equivalents per mg of dried extract (μg AAE/mg d.e).

3.5. Iron chelating capacity

To estimate the iron chelation ability of plant samples, 500 μL of the extract was mixed with 100 μL of FeCl_2 (0.6 mM) and 900 μL methanol. After 5 min, a volume of 100 μL of ferrozine (5mM) was added to the mixture. The reaction mixture was stirred and incubated for 10 min, and the absorbance was measured at 562 nm (Le et al., 2007). A blank solution was prepared by following the same procedure, except for the addition of the sample extract. EDTA was used as reference compound and the percent of chelation was calculated using the formula:

$$\% \text{ Chelation} = (\text{Ac} - \text{At}/\text{Ac}) * 100$$

Where Ac is the absorbance of the control and At is the absorbance of the sample.

The calculated chelation percentages were plotted against sample concentrations and the resulting plots were used to calculate the

IC_{50} (concentration of the sample that chelate the 50% of the initial iron concentration).

3.6. Total antioxidant capacity

The total antioxidant activity of plant fractions was determined using the phosphomolybdenum method. A sample volume of 0.1 mL was mixed with 1 mL of the reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate), and then incubated at 95°C for 90 min. The absorbance was measured at 695 nm against a blank containing methanol instead of the sample extract (Prieto et al., 1999). Standard compounds such as BHA, BHT, gallic acid and quercetin were used for comparison purposes. The results were expressed as ascorbic acid equivalents per mg of dried extract (μg AAE/mg d.e), using the ascorbic acid calibration curve elaborated in the same conditions.

3.7. β -Carotene bleaching assay

β -Carotene bleaching assay was used to establish the potential anti-lipid peroxidation effect of the sample extracts. As stated by Tepe et al. (2005), the β -carotene emulsion was prepared by mixing 0.5 mg of β -carotene, 1 mL of chloroform and 25 μL of linoleic acid. Then, an amount of 200 mg of tween 20 were added to the mixture. The solvent chloroform was evaporated under reduced pressure, and 100 mL of oxygen saturated milli-Q water was added and vigorously shaken. A volume of 2.5 mL of the previously prepared β -carotene solution was added in test tubes and mixed with 350 μL of sample extract. The same procedure was repeated with BHA, BHT and gallic acid as positive controls (2 mg/mL), while methanol and water were used as negative controls. The absorbance was measured at 490 nm after 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h and 48 h of incubation under the dark at room temperature. The inhibition of the β -carotene bleaching after 24 h was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Inhibition}_{(24 \text{ h})} = (\text{AE}/\text{AB}) * 100$$

Where AE is the absorbance in presence of the extract or standards at 0 h and AB is the absorbance in presence of the sample extracts or standards after 24 h.

4. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and data were analysed using the software GraphPad prism 7.00. The results were expressed as mean values and standard deviation (SD). Mean values were compared statistically by using one way-ANOVA and significant differences (p -values < 0.05) were found. In order to analyse the difference pattern among means, Tukey test was applied (α = 0.05). Pearson linear correlation was calculated to evaluate the correlation between total bioactive components and antioxidant activity results.

5. Results and discussions

5.1. Extraction yield

The methanolic extraction of *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots provided a gummy yellowish extract that represented $(15.3 \pm 1.0) \%$ (w/w) of the initial root powder. The liquid-liquid fractionation of the methanolic crude extract with solvents of increasing polarity afforded 5 fractions. The yield of the obtained fractions is presented in Fig. 1.

The aqueous fraction (AR) is the most important part of the methanolic crude extract, which represents $(58 \pm 10) \%$ (w/w), followed by the butanolic fraction (BR) with $(12 \pm 1) \%$ (w/w) and the hexane fraction (HR) with $(5.5 \pm 0.6) \%$ (w/w), while chloroform fraction (CR) and ethyl acetate fraction (EAR) represent only $(1.6 \pm 0.4) \%$ (w/w) and $(1.3 \pm 0.5) \%$ (w/w), respectively. Khan et al. (2006) reported a

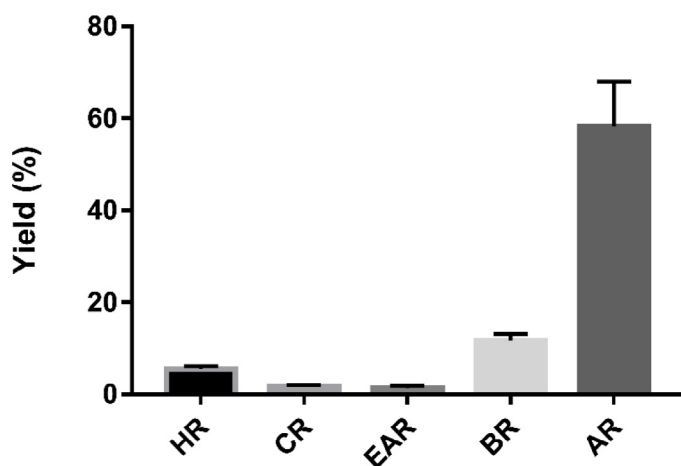


Fig. 1. Yields obtained for the different solvents fractions from the methanolic extract of *Ranunculus macrophyllus* Desf. HR (hexane fraction), CR (chloroform fraction), EAR (ethyl acetate fraction), BR (butanolic fraction) and AR (aqueous fraction).

lower yield for the methanolic crude extract of *Ranunculus repens*. In the same study, the chloroform fraction presented 13% (w/w) of the crude methanolic extract, being this result higher than the obtained one in the present study. The yield of the hydro-ethanolic extract from roots of *Ranunculus ternatus* as found by Deng et al. (2013) was similar to that reported in this work (16%, w/w). The same research also reported a comparable yield for the aqueous fraction (64.5%, w/w).

The extraction yield is affected by several factors. In fact, in addition to the inter-species variation, there is also intra-species variation. The first one could be explained by genetic and environmental factors (Siddhuraju and Becker, 2003), while the latter could be explained by the extraction method and the conditions in which the procedure is performed (temperature, pH, extraction time) (Do et al., 2013).

5.2. Spectrophotometric studies of bioactive compounds

Polyphenols and triterpenoids were characterized and quantified using spectrophotometric methods as described in the experimental Section. The obtained results are shown in Table 1.

The EAR fraction contains the highest amount of total polyphenols (TPC), total flavonoids (TFC) and flavonols (FOL). Total tannins (TTC) were distributed equally between EAR and CR, while the other fractions contained only small tannins amounts. The condensed tannins (CTC) are present in all fractions at similar amounts, except for the EAR fraction, which contains a significantly greater amount than the other fractions analysed. Regarding triterpenoids, the estimated amounts decrease with the increase of the solvent polarity. Thus, the highest amount is found in the HR fraction, while the lowest amount is observed in both AR and BR fractions. Total polyphenol content of different fractions from aerial parts of *Ranunculus sceleratus*, studied by Shahid et al. (2015), showed the same general distribution of polyphenols between the solvents, though different amounts. The

polyphenol content in chloroform, ethyl acetate and butanol reported in this study were lower than our estimated polyphenol content for the same fractions, while hexane and aqueous fractions showed higher TPC values than our corresponding fractions. The presence of flavonoids, tannins and terpenoids were reported for *Ranunculus arvensis* as well as other species, although they were not quantified (Hachlaf et al., 2013; Khan et al., 2017).

For the same extraction conditions (temperature, extraction time, pH and others), the extraction yield (whether expressed as w/w or as amount of metabolite extracted) is mainly affected by two important factors: the solvent nature and the chemical properties (polarity) of the molecules to be extracted (Do et al., 2013). Polar molecules will be more soluble in a polar solvent, whilst a non-polar solvent will more likely extract non-polar compounds (Ramawat and Mérillon, 2013). Methanol is an appropriate solvent for the quantitative extraction of polyphenolic compounds, allowing the extraction of different groups of polyphenols and terpenoids (Oreopoulou et al., 2019). Solvent fractionation of increasing polarities may allow the separation of polyphenol compounds into separate groups (Rafińska et al., 2019). It has been reported that ethyl acetate fraction is able to dissolve phenolic diterpenes and flavonoids aglycones (Oreopoulou et al., 2019), while triterpenoids are often extracted with non-polar solvents (Mutai et al., 2007).

5.3. In vitro antioxidant activity

5.3.1. Radical scavenging activity

The radical scavenging activity of the different fractions was evaluated against, DPPH, ABTS and hydrogen peroxide. The obtained results are presented in Table 2.

The ethyl acetate fraction exhibited a strong radical scavenging activity, with very low IC₅₀ value for both, DPPH (3.7 ± 0.1) µg/mL and ABTS (80.7 ± 3) µg/mL. This activity was similar to that of synthetic antioxidants (BHA and BHT) as well as to pure standard compounds (quercetin and gallic acid), used as reference drugs. The

Table 2

Radical scavenging and iron chelation activities of different fractions from *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots.

	DPPH	ABTS	H ₂ O ₂	Iron chelation
IC ₅₀ (µg/mL)				
HR	81 ^d ± 5	9081 ^c ± 112	380 ^c ± 4	2366 ± 84
CR	19 ^b ± 1	369 ^b ± 19	709 ^f ± 6	4978 ± 54
EAR	3.7 ^a ± 0.1	81 ^a ± 3	645 ^e ± 5	> 5000
BR	58 ^c ± 2	1228 ^c ± 33	4027 ^g ± 34	2572 ± 51
AR	319 ^e ± 4	6271 ^d ± 49	> 10000	1012 ± 30
BHA	1.9 ^a ± 0.2	41.1 ^a ± 0.8	81 ^a ± 2	—
BHT	4.1 ^a ± 0.2	38.5 ^a ± 0.9	—	—
Quercetin	1.3 ^a ± 0.1	19.4 ^a ± 0.1	—	—
Gallic Acid	0.5 ^a ± 0.0	59 ^a ± 4	278 ^b ± 7	—
EDTA	—	—	—	22 ± 1

^b Results are expressed as mean ± SD (n=3). Values on the same column with different superscript letters indicate significant differences (p-value < 0.05). CR (chloroform fraction), EAR (ethyl acetate fraction), BR (butanolic fraction) and AR (aqueous fraction).

Table 1

Spectrophotometric quantification of phenolic compounds and triterpenoids in the different fractions from *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots.

	TPC µg GAE/mg (d.e)	TFC µg QE/mg (d.e)	FOL µg RE/mg (d.e)	TTC µg TAE/mg (d.e)	CTC µg CE/mg (d.e)	TC µg UAE/ mg (d.e)
HR	10 ^{da} ± 2	0.70 ^c ± 0.01	2.5 ^b ± 0.2	0.5 ^b ± 0.2	86.5 ^b ± 0.2	91 ^a ± 7
CR	111 ^b ± 4	1.2 ^b ± 0.1	3.8 ^b ± 0.2	33 ^a ± 3	94.1 ^b ± 0.4	64.6 ^b ± 0.8
EAR	271.0 ^a ± 0.2	3.5 ^a ± 0.1	24 ^a ± 5	31 ^a ± 1	129 ^a ± 10	38 ^c ± 5
BR	46.1 ^c ± 0.9	1.1 ^b ± 0.0	4.6 ^b ± 0.6	1.0 ^b ± 0.1	102 ^b ± 11	20 ^d ± 2
AR	6.0 ^d ± 1.1	0.5 ^d ± 0.0	3.5 ^b ± 0.4	1.4 ^b ± 0.2	107 ^b ± 8	18 ^d ± 7

^a Results are expressed as mean ± SD (n=3). Values on the same column with different superscript letters indicate significant differences (p-value < 0.05). CR (chloroform fraction), EAR (ethyl acetate fraction), BR (butanolic fraction) and AR (aqueous fraction). TPC (total polyphenols content), TFC (total flavonoids contents), FOL (flavonols content), TTC (total tannins content), CTC (condensed tannins content) and TC (triterpenoid content).

chloroform fraction also showed a considerable antiradical activity with IC_{50} (19 ± 1) and (369 ± 19) $\mu\text{g/mL}$ for DPPH and ABTS, respectively. Hexane and aqueous fractions exhibited the weakest antiradical activity compared to the one showed by the other fractions and the standards drugs analysed. As can be also observed in Table 2, synthetic antioxidants and natural pure compounds showed similar radical scavenging ability against both DPPH and ABTS.

Radical scavenging is one of the main mechanisms by which polyphenols exert their antioxidant activity (Belščak-Cvitanović et al., 2018); it can be accomplished by donating hydrogen atom or singlet electron transfer. Moreover, this activity depends on the number and position of hydroxyl groups in the compound (Shahidi and Ambigai-palan, 2015).

Although hydrogen peroxide has a low reactivity, it can still damage cells through its ability to penetrate the membrane of the cells and oxidize a series of molecules inside. It can also react with transition metals, such as iron, to generate hydroxyl radical, known to be very reactive and destructive (Halliwell et al., 2000). In addition to being produced physiologically in our organism, hydrogen peroxide also occurs naturally in food, water and air, which increases our exposure to this reactive species (Bhatti et al., 2015). These statements underscore the importance of the hydrogen peroxide scavenging activity.

The anti-hydrogen peroxide activity revealed that HR had an excellent scavenging capacity ($IC_{50} = 380 \pm 4$ $\mu\text{g/mL}$). Together with EAR ($IC_{50} = 645 \pm 5$ $\mu\text{g/mL}$), they exhibited better hydrogen peroxide scavenging activity than the other studied fractions; at the same time their activity remain significantly lower than the ones of the standard drugs. Moderate activity was observed for CR with an IC_{50} value equal to 4027 ± 34 $\mu\text{g/mL}$. BR presented the lowest hydrogen peroxide scavenging activity. It is also worth mentioning that the synthetic antioxidant tested (BHA) had better hydrogen peroxide scavenging effect than gallic acid ($IC_{50} = 278 \pm 7$ $\mu\text{g/mL}$). Other species such as *Ranunculus arvensis* and *Ranunculus sceleratus*, showed moderate antiradical activities (Khan et al., 2017; Shahid et al., 2015) meanwhile *Ranunculus reptans* exhibited strong antiradical activity (Paudel et al., 2014).

In order to understand the relationship between the secondary metabolites and the antioxidant activities studied, a correlation analysis was performed (Table 3). According to it, DPPH and ABTS were significantly correlated with total flavonoid content ($r = 0.99$), total polyphenols ($r = 0.97$) and total flavonols ($r = 0.96$), suggesting that polyphenols are the main contributors to the DPPH and ABTS scavenging effects. These results are in agreement with those reported by Kiselova et al. (2006), Li et al. (2009) and Kumar et al. (2014).

In contrast to DPPH and ABTS, the hydrogen peroxide scavenging ability was not significantly correlated with the phenolic content of the samples; it was even negatively correlated with condensed tannins content (CTC). Thus, as has been formerly reported, the hydrogen peroxide scavenging ability of many plants extracts is not always linked to their polyphenol contents (Bayliak et al., 2016). In fact, a previous study of anti- H_2O_2 activity of several polyphenols revealed

that diosmin and narirutin do not have such activity, while others like luteolin-7-O-rutinoside shows only a weak anti- H_2O_2 activity (Sroka et al., 2005). It seems that this activity has some structure requirement, specially the position of hydroxyl groups on the aromatic ring (Sroka et al., 2005).

The ability of the samples to scavenge hydrogen peroxide was significantly correlated to triterpenoids content ($r = 0.93$), indicating that this ability could be mainly attributed to the content of bioactive triterpenoids. Many terpenoids have been proven to be excellent antioxidants, whether in *in vitro* or *in vivo* studies (González-Burgos and Gómez-Serranillos, 2012). Moreover, plant bioactive compounds are not limited to polyphenols and thus, this should be taken into consideration when studying the antioxidant activity of plant extracts.

5.3.2. Iron chelating capacity

The different fractions were tested for their iron chelation ability and the results are presented in Table 2. All the fractions showed different and dose-dependent iron chelation capacities. Consequently, the fractions can be ordered from the highest to the lowest capacity as follows: AR > HR > BR > CR > EAR. Compared to the EDTA standard iron chelating agent (IC_{50} equal to 22 ± 1 $\mu\text{g/mL}$), all the fractions showed, in general, poor iron chelating ability. Even with the highest polyphenol amounts, EAR fraction showed the weakest iron chelation ability. When studying the correlation between bioactive compounds and iron chelation (Table 3), significant correlations between the iron chelation and the quantified bioactive compounds was not found. For CTC this correlation was notable ($r = 0.72$), but not significant. For polyphenols this result is in accordance with the studies of Chai et al. (2014) and Ebrahimzadeh et al. (2008). In fact, not all phenolic compounds are good iron chelating agents. Again, this ability is strongly related to the structural features of the compounds, and the presence of some functional groups could hinder or strengthen this ability (Andjelković et al., 2006; Zhang and Tsao, 2016).

5.3.3. Reducing power

The reducing power assay can be described as an electron transfer based assay (Huang et al., 2005) that measures the reducers (antioxidants) present in a sample on the basis of a spectrophotometric redox reaction (Hajimahmoodi et al., 2008). The estimated reducing power (FRAP) of the target plant fractions is represented in Fig. 2.

Among all the studied fractions, EAR showed the best reducing power with a FRAP value of (310 ± 2 μg) AAE/mg (d.e), comparable to the reducing power value of BHT and significantly higher than the ones determined for the other analysed fractions. CR fraction exhibited moderate reducing power (53.2 ± 0.5 μg AAE/mg (d.e), while the reducing power of the remaining fractions did not exceed (21.7 ± 0.1) μg AAE/mg (d.e).

The reference standards displayed higher activity than the plant fractions, with a registered maximum value for gallic acid (1129 ± 5), and a minimum value for BHA (435 ± 4) μg AAE/mg (d.e). Moreover, standard pure compounds (quercetin and gallic acid) showed superior reducing power than synthetic compounds (BHA and BHT). The correlation study (Table 3) revealed that there was no relationship between triterpenoid content of the fractions and their reducing power ($r = -0.06$). Nevertheless, a strong significant relation among flavonoids ($r = 0.98$), flavonols ($r = 0.96$) and total polyphenols content of the fractions ($r = 0.96$) was found. The correlation with total tannins ($r = 0.69$) and condensed tannin contents ($r = 0.83$) was substantial, but not significant. Therefore, it could be assumed that polyphenols are the main compounds responsible for the reducing power of the plant fractions, which is in complete agreement with the results reported by other studies (Balík et al., 2008; Zhang et al., 2013; Aklima et al., 2014). In contrast to the results obtained by Amessis-Ouchemoukh et al. (2014), which did not find a significant correlation between total polyphenol content and the FRAP reducing

Table 3
Pearson correlation coefficient between antioxidant activities and bioactive compounds.

	DPPH	ABTS	H_2O_2	Iron chelation	FRAP	TAC	β -carotene
TPC	0.97*	0.98*	0.19	0.24	0.96*	0.95*	0.71
TFC	0.99*	0.99*	0.19	0.33	0.98*	0.92*	0.62
FOL	0.96*	0.96*	0.06	0.55	0.96*	0.84	0.43
TTC	0.70	0.73	0.23	-0.10	0.69	0.83	0.83
CTC	0.84	0.85	-0.28	0.72	0.83	0.64	0.14
TC	-0.10	-0.12	0.93*	-0.54	-0.06	0.20	0.61

* significant correlation (p -value < 0.05). TPC (total polyphenols content), TFC (total flavonoids contents), FOL (flavonols content), TTC (total tannins content), CTC (condensed tannins content) and TC (triterpenoid content).

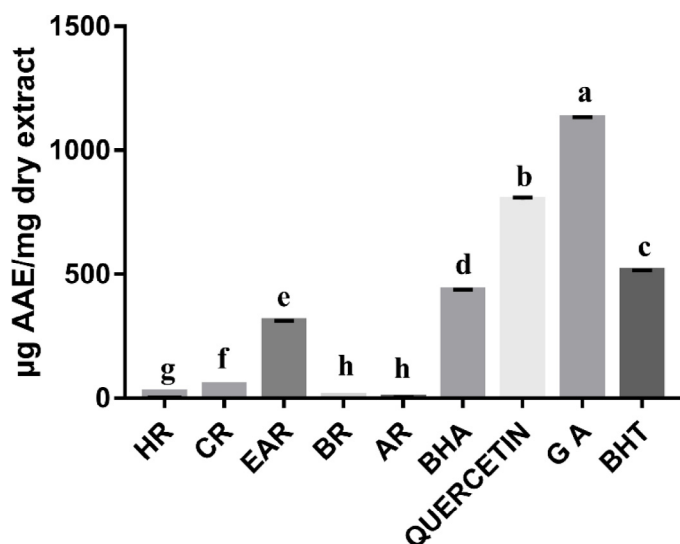


Fig. 2. Reducing power of different fractions from roots of *Ranunculus macrophyllus* Desf., BHA, quercetin, gallic acid (GA) and BHT. Results are expressed as mean $\pm$ SD of triplicates. Bars with different letters indicate significant differences (p -value < 0.05). CR (chloroform fraction), EAR (ethyl acetate fraction), BR (butanolic fraction) and AR (aqueous fraction).

power. The reducing capacity of the samples studied in this work could be due to the presence of reductants acting as electron donors. In this regard, polyphenols are known to be excellent electron donors (Bendary et al., 2013), allowing them to scavenge free radicals and act as chain breaking antioxidants. They may also react with some peroxide precursors, inhibiting the peroxide formation (Loganayaki et al., 2013). In addition, this electron donating ability may allow polyphenols to regenerate or to repair other oxidized antioxidants, such as vitamin E (Shahidi et al., 1992).

5.3.4. Total antioxidant capacity

The total antioxidant capacity (TAC) of the different fractions and the evaluated standards compounds are shown in Fig. 3. EAR exhibited the strongest total antioxidant capacity (361 ± 1) μ g AAE/mg

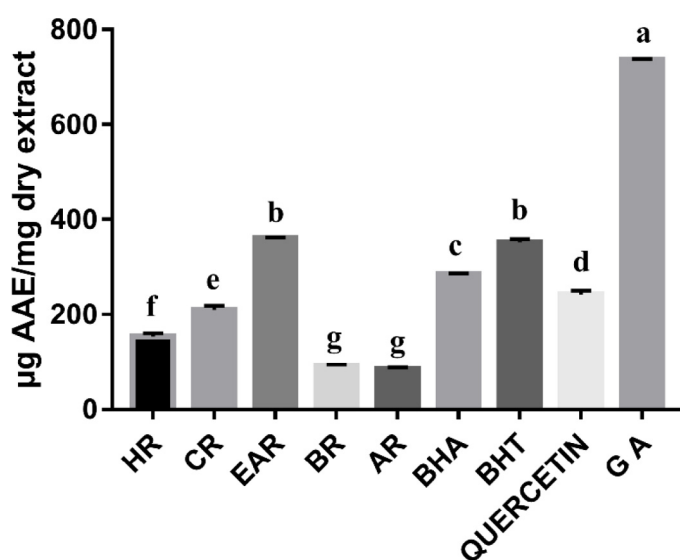


Fig. 3. Total antioxidant capacity of different fractions from roots of *Ranunculus macrophyllus* Desf., BHA, quercetin, gallic acid and BHT. Results are expressed as mean $\pm$ SD of triplicates. Bars with different letter indicates significant differences (p -value < 0.05). CR (chloroform fraction), EAR (ethyl acetate fraction), BR (butanolic fraction) and AR (aqueous fraction).

(d.e) compared to the other fractions. Both CR and HR fractions showed moderate TAC with (210 ± 9) and (154 ± 6) μ g AAE/mg (d.e), respectively; while BR (93 ± 2) μ g AAE/mg (d.e) and AR (84 ± 4) μ g AAE/mg (d.e) showed the lowest activity. The activity of EAR was significantly higher than the one of the standards compounds BHA (284 ± 2) μ g AAE/mg (d.e) and quercetin (243 ± 8) μ g AAE/mg (d.e). Similar to BHT (353 ± 6) μ g AAE/mg (d.e), but still lower than gallic acid activity (737 ± 2) μ g AAE/mg (d.e). Additionally, in this test, gallic acid had higher total antioxidant capacity than synthetic antioxidants, while quercetin presented lower total antioxidant capacity than BHA and BHT.

The TAC of the EAR fraction suggests the presence of effective antioxidants in this fraction. The correlation study (Table 3) revealed a significant correlation with total polyphenol contents ($r = 0.95$) and total flavonoid contents ($r = 0.92$). The correlation with total tannin content ($r = 0.83$) and flavonols ($r = 0.84$) was also high, but not significant. This fact suggests that polyphenols are the main contributors to the antioxidant activity. Jan et al. (2013) and Zhao et al. (2014) also reported this observation, while Sarikurkcu et al. (2017) found a significant correlation only with flavonoids and flavonols, although not with total polyphenol content. The fact that HR fraction showed higher activity than BR, despite the lower phenolic content, may suggest the involvement of other bioactive compounds in the total antioxidant activity exhibited by HR. For example, carotenoids and α -tocopherol, are common non-phenolic compounds involved in the total antioxidant capacity of non-polar extracts (Prieto et al., 1999). Triterpenoids, may at least partially be responsible for the activity of the HR fraction. Sarikurkcu et al. (2017) found that triterpenoids were significantly correlated with TAC of several plant extracts.

5.3.5. β -Carotene bleaching assay

β -Carotene is a red-orange natural pigment and a strong antioxidant, when oxidized by a radical or an oxidizing agent, β -carotene quickly decolorizes. In β -carotene assay the radicals are generated from autooxidation of linoleic acid in presence of oxygen, and the addition of another antioxidant to the β -carotene will prevent or delay its decolorization. The stronger is the antioxidant, the longer is the delay of decolorization. This effect is due to the competition between β -carotene and the other antioxidant in the system.

The capacity of a target plant fractions and standards to inhibit the β -carotene bleaching is summarized in Fig. 4. All samples were able to delay the decolorization of β -carotene solution at different rates, as shown by the kinetics of β -carotene bleaching included in Fig. 4 (a). EAR and CR were the most efficient fractions inhibiting the β -carotene bleaching by (81.0 ± 0.5) % and (80.2 ± 0.8) % respectively, after 24 h. At the same time, HR inhibition rate was (59.0 ± 0.2) %, while the inhibition rate of BR was just (27 ± 5) %. Therefore, it could be concluded that after 24h, the effect of AR was quite weak (13 ± 2) %, and even close to the one of methanol, used as a negative control. Both EAR and CR fractions are more effective than gallic acid (72 ± 5) %, and synthetic antioxidants presented the best inhibition of β -carotene bleaching; after 24 h the inhibition of BHA was (97 ± 2) % and that of BHT was (94.4 ± 0.5) %.

β -Carotene bleaching was correlated (Table 3) with the different bioactive compounds in the following order; TTC ($r = 0.83$) > TPC ($r = 0.7$) > TFC ($r = 0.62$) > TC ($r = 0.6$) > FOL ($r = 0.42$) > CTC ($r = 0.13$), but none of them was significant. This fact could suggest that β -carotene bleaching is a synergic result between the different sample components. Sarikurkcu et al. (2017) reported a significant correlation of β -carotene bleaching only with FOL, nonetheless no correlation was described with TPC, TFC and TC contents.

While other assays as FRAP are based on the capacity of reductants for transferring electron within a sample, β -carotene bleaching is a hydrogen transfer-based test (Nićiforović et al., 2017). In fact, polyphenols are known to react with lipid radicals by hydrogen atom transfer (Prior et al., 2005). Therefore, the great β -carotene bleaching

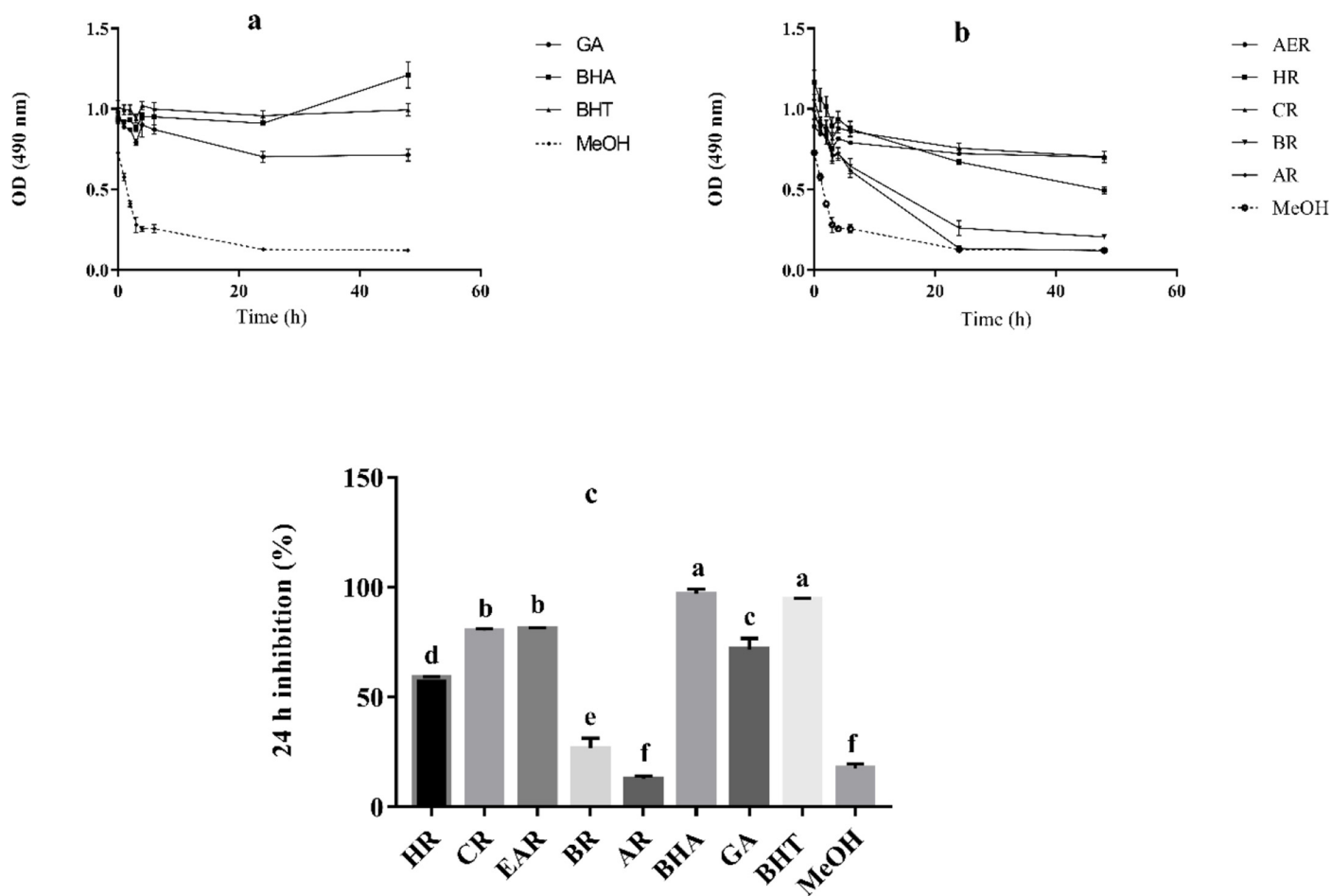


Fig. 4. Results obtained from the β -carotene bleaching assay: (a) kinetics of β -carotene bleaching for BHA, BHT, gallic acid (GA) and methanol (MeOH), (b) kinetics of β -carotene bleaching for different fractions and methanol, (c) inhibition of β -carotene bleaching after 24 h for fractions, standards and MeOH. Results are expressed as mean $\pm$ SD of triplicates. Bars with different letters indicate significant differences (p -value < 0.05). CR (chloroform fraction), EAR (ethyl acetate fraction), BR (butanolic fraction) and AR (aqueous fraction).

activity showed by the studied fractions reflects their excellent hydrogen donating ability.

As it can be seen from the results included in Fig. 4(b), non-polar fractions (HR, CR) presented better activity than polar fractions (BR and AR), which could be attributed to the polarity of the reductants in the non-polar fractions. Actually, β -carotene reaction medium is an emulsion of linoleic acid, consequently non-polar molecules will have a better access to the lipid radicals than the polar ones (Nićiforović et al., 2017). In this regard, the richness of HR and CR fractions with liposoluble triterpenoids must be pointed as they may be partially responsible for their activity.

5.4. Capillary LC-DAD and LC-MS/MS analysis of phenolic compounds

Spectrophotometric estimations of bioactive compounds and correlation studies revealed that EAR fraction had the highest polyphenol content and the best antioxidant activities. These activities were

highly correlated with total polyphenols content. Therefore, the individual polyphenol profile of EAR was investigated by using capillary LC-DAD and LC-MS/MS, according to the procedures described in Section 2.10.1 and 2.10.2.

The individual polyphenolic profile of the EAR fraction was corroborated by using the LC-MS/MS method. Three different transitions were employed to unequivocally verify the identity of the polyphenols determined, the most abundant was used for quantification, whereas the others were for identification purposes (Table 4). Although all studied compounds were detected by LC-MS/MS, quantification was not possible as they were at concentration levels below the quantification limits of the method. Thus, quantitative analyses were performed by capillary LC-DAD. Therefore, combination of DAD and MS/MS detection systems provided both, an identification and compositional information of polyphenols presented in *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots.

Table 4

Analysis of polyphenols by capillary LC-DAD and LC-MS/MS: identification and quantification results.

Compound	Capillary LC-DAD			LC-MS/MS						
	Rt, min	UV ^a , nm	Extracted amount, mg/g (d.e)	Rt, min	Precursor Ion, m/z[M−H] [−]	Quantification Transition	Confirmation Transitions		Extracted amount, mg/g (d.e)	
						Product ion I, m/z (Ce, eV) ^b	Product ion II, m/z (Ce, eV) ^b	Product ion III, m/z (Ce, eV) ^b		
Gallic A.	3.70	292	9.3 ± 0.6	6.25	169.0	125.1 (19)	79.0 (23)	53.1 (20)	LOD ^c	
Dihydroxybenzoic A.	5.09	260	8.1 ± 0.2	10.22	153.0	109.0 (16)	108.1 (25)	53.0 (25)	LOD	
Chlorogenic A.	8.29	260	3.5 ± 0.2	16.76	353.1	191.0 (16)	85.1 (44)	93.1 (42)	LOD	
Caffeic A.	10.44	310	6.7 ± 0.4	18.07	179.0	135.0 (18)	134.0 (30)	89.0 (34)	LOD	
<i>p</i> -Coumaric A.	12.95	310	3.0 ± 0.1	23.00	163.0	119.0 (17)	93.0 (31)	117.1 (34)	LOD	
<i>trans</i> -Ferulic A.	13.74	310	2.1 ± 0.1	23.98	193.2	134.0 (18)	178.0 (17)	149.1 (15)	LOD	
Hesperidin	15.35	292	5.9 ± 0.6	27.56	609.1	301.1 (23)	286.1 (48)	164.0 (55)	LOD	
Rutin	—	—	nd	28.47	609.0	300.1 (42)	300.9 (33)	271.0 (45)	LOD	
Resveratrol	17.18	310	3.3 ± 0.2	30.71	227.1	143.1 (25)	113.0 (10)	69.1 (21)	n.d.	

^a wavelength used for quantification.^b Collision energy, electron Volt.^c LOD: determined at the levels of the method detection limit; n.d.: not detected; Rt: retention time; (d.e): dry weight.

Table 4 shows the compounds identified and/or quantified in the ethyl acetate fraction from *Ranunculus macrophyllus* Desf. This fraction contains high amounts of phenolic acids and flavonoids. Two categories of phenolic acids were present; cinnamic acid derivatives such as chlorogenic acid (3.5 ± 0.2 mg/g (d.e)), caffeic acid (6.7 ± 0.4) mg/g (d.e), *p*-coumaric acid (3.0 ± 0.1) mg/d (d.e) and *trans*-ferulic acid (2.1 ± 0.1) mg/g (d.e); and benzoic acid derivatives like gallic acid (9.2 ± 0.6) mg/g (d.e) and dihydroxybenzoic acid (8.1 ± 0.2) mg/g (d.e). Flavonoids identified were hesperidin (5.9 ± 0.6) mg/g (d.e), and rutin. The latter one was only detected using LC-MS/MS, which could be explained by the highest sensitivity of the method for this particular compound. The stilbene resveratrol (3.3 ± 0.2) mg/g (d.e) was also identified by both chromatographic methods. The individual polyphenol profile of the EAR fractions, as well as the extracted amounts, has been established properly according to the criteria mentioned before.

As far as the author's knowledge, this is the first time that all the mentioned compounds have been identified and quantified in *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots. According to the literature, especially reviews on the genus *Ranunculus* (Aslam et al., 2012; Da-Cheng, 2018), the polyphenol *trans*-ferulic acid was earlier detected in *Ranunculus muricatus* (Da-Cheng, 2018), *p*-coumaric acid and gallic acid were also detected in the roots of *Ranunculus ternatus* (Deng et al., 2013; Da-Cheng, 2018). Likewise, caffeic acid and rutin were reported in *Ranunculus arvensis* (Bhatti et al., 2015). However, to the best of the author's knowledge, this is the first time that hesperidin, chlorogenic acid and resveratrol are identified in the genus *Ranunculus*.

It is worth mentioning the importance of the compounds identified, as they are widely spread in fruits and vegetables. Thus, they constitute one of the most common polyphenol groups in human food. In fact, the quantities found in our study are similar or higher than those found in common food sources. The amount of resveratrol found is similar to the levels reported in red and white grape seeds (Counet et al., 2006). From the same study it can be seen that the amount of *trans*-ferulic acid in chocolate extract (2.4 ± 0.1) mg/g (d.e) is close to the one observed in the present study (2.1 ± 0.1) mg/g (d.e). The amount of hesperidin, also known as orange peel glucoside, quantified in this study was higher than the one reported in *Citrus mitis* Blanco (1.5 ± 0.2) mg/g (d.e) (Lou et al., 2014). Both gallic acid and ferulic acid quantities in pineapple peels are lower than in the roots of *Ranunculus macrophyllus* Desf. (Li et al., 2014). Caffeic acid content is almost 30 times higher than it is in the roots of red beet (*Beta vulgaris*), while chlorogenic acid content is 17 times higher than that found on the stems of red beet (Koubaiar et al., 2014). In addition, *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots contained

considerable amounts of hydroxybenzoic acid derivatives. This is very important because it is known that the levels of these compounds are very low in edible plants, except in some red fruits (Gómez-Maqueo et al., 2018). This fact makes *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots a valuable source of hydroxybenzoic acid derivatives. Therefore, the roots of *Ranunculus macrophyllus* Desf. can be seen as an appreciated source of high added-value polyphenols, like ferulic acid, hesperidin and resveratrol, with potential interest in cosmetic, pharmaceutical, and agri-food industries.

Conclusions

The liquid-liquid separation showed that ethyl acetate fraction contains most of the phenolic compounds of *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots, while the chromatographic analysis revealed for the first time the presence of gallic acid, dihydroxybenzoic acid, caffeic acid and hesperidin as major compounds, some of them are described for the first time in the genus *ranunculus*. Thus, the EAR fraction could provide a total amount of phenolic compounds of 41.9 mg/g (d.e). Ethyl acetate fraction exhibited strong radical scavenging ability, high metal ions reducing power and potent anti-lipid peroxidation activity and these activities were strongly correlated with the phenolic content. Consequently, *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots may be considered as a valuable source of strong polyphenolic antioxidants with many therapeutic and industrial applications, and as an ingredient for preparation of nutraceutical and functional food.

Funding sources

This work was supported by the Community of Madrid/FEDER program [S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM], the Ministry of Economy and Competitiveness [project CTQ 2017-83569-C2-1-R] and the Complutense University through a predoctoral grant [CT17/17-CT18/17].

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. Bouadam, (Bejaia university) and Dr. Boudjelal (Msila university) for the identification and authentication of the plant material. We also thank Prof. Benouadheh (Bordj Bou Arreridj) for his assistance and precious advices.

References

- Aklima, J., Mojumder, S., Sikdar, D., 2014. Total phenolic content, reducing power, anti-oxidative and anti-amylase activities of five Bangladeshi fruits. *International Food Research Journal* 21, 119–124.
- Alamgir, A.N.M., 2018. *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Phytochemistry and Bioactive Compounds*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1>.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidah, I.M., Quirantes-Piné, R., Madani, K., Segura-Carretero, A., 2014. Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Industrial Crops and Products* 61, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.049>.
- Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., Verhe, R., 2006. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry* 98, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.044>.
- Aslam, M.S., Choudhary, B.A., Uzair, M., Ijaz, A.S., 2012. The genus *Ranunculus*: a phytochemical and ethnopharmacological review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4, 15–22.
- Balik, J., Kyseláková, M., Vrchotová, N., Triska, J., Kumsta, M., Veverka, J., Hic, P., Totusek, J., Lefnerová, D., 2008. Relations between polyphenols content and antioxidant activity in vine grapes and leaves. *Czech Journal of Food Sciences* 26.
- Baylak, M., Burdyluk, N.I., Lushchak, V.I., 2016. Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs. *Open Life Sciences* 11, 298–307. <https://doi.org/10.1515/biol-2016-0040>.
- Belscak-Cvitanić, A., Durgo, K., Hudek, Ana, Baćun-Družina, V., Komes, D., 2018. Overview of polyphenols and their properties, in: Galanakis, C.M. (Ed.) *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications*. WoodHead Publishing, United Kingdom, pp. 1–44.
- Ben Haj Koubaier, H., Snoussi, A., Essaidi, I., Chaabouni, M.M., Thonart, P., Bouzouita, N., 2014. Betalain and phenolic compositions, antioxidant activity of Tunisian red beet (*Beta vulgaris L. conditiva*) roots and stems extracts. *International Journal of Food Properties* 17, 1934–1945. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.772196>.
- Bendary, E., Francis, R.R., Ali, H.M.G., Sarwat, M.I., El Hady, S., 2013. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences* 58, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.aas.2013.07.002>.
- Bhatti, M.Z., Ali, A., Ahmad, A., Saeed, A., Malik, S.A., 2015. Antioxidant and phytochemical analysis of *Ranunculus arvensis* L. extracts. *BMC Research Notes* 8, 279. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1228-3>.
- Chai, T.-T., Mohan, M., Ong, H.-C., Wong, F.-C., 2014. Antioxidant, iron-chelating and anti-glucosidase activities of *Typha domingensis* Pers (Typhaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13, 67–72. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i1.10>.
- Chang, C.L., Lin, C.S., Lai, G.H., 2012. Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. <https://doi.org/10.1155/2012/984295>.
- Counet, C., Callemien, D., Collin, S., 2006. Chocolate and cocoa: new sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry* 98, 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.030>.
- Da-Cheng, H., 2018. *Ranunculales Medicinal Plants: Biodiversity, Chemodiversity and Pharmacotherapy*. Academic Press.
- Deng, K., Xiong, Y., Zhou, B., Guan, Y., Luo, Y., 2013. Chemical constituents from the roots of *Ranunculus ternatus* and their inhibitory effects on *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules* 18, 11859–11865. <https://doi.org/10.3390/molecules181011859>.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>.
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.-H., 2013. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>.
- Du, G.-H., 2018. *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8022-7>.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Bekhradnia, A.R., 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology* 7, 3188–3192. <https://doi.org/10.5897/AJB08.476>.
- Gómez-Maqueo, A., Escobedo-Avellaneda, Z., Cano, M.P., Welti-Chanes, J., 2018. Phenolic compounds in food, in: Nöllet, L.M.L., Gutierrez-Urbe, J.A. (Eds.), *Phenolic Compounds in Food Characterization and Analysis*. CRC press, Boca Raton, pp. 33–52. <https://doi.org/10.1201/9781315120157>.
- Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., Madrid, Y., 2019. Citrus peels waste as a source of value-added compounds: extraction and quantification of bioactive polyphenols. *Food Chemistry* 295, 289–299.
- González-Burgos, E., Gómez-Serranillos, M.P., 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Current Medicinal Chemistry* 19, 5319–5341.
- Grand View Research, 2019. Polyphenols market size, share & trends analysis report by product (grape seed, green tea, cocoa), by application (beverages, food, feed, dietary supplements, cosmetics), and segment forecasts, 2019–2025.
- Hachelaf, A., Zellaoui, A., Touil, A., 2013. Chemical composition and analysis of antifungal properties of *Ranunculus arvensis* L. *Pharmacophore* 4, 89–91.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 26, 809–812. <https://doi.org/10.1021/jf60218a027>.
- Hajimahmoodi, M., Sadeghi, N., Jannat, B., Oveisi, M.R., Madani, S., Kiayi, M., Akrami, M.R., Ranjbar, A.M., 2008. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of Iranian Olive cultivar. *Journal of Biological Sciences* 8, 779–783. <https://doi.org/10.3923/jbs.2008.779.783>.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Long, L.H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* 486, 10–13. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9).
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L.P., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf3030723c>.
- Huy, H.V., Hung, H.V., Buckney, R.T., Filippis, L.F.De, 2018. Molecular biodiversity convergence with biogeography and ethnobotany of rare and endangered medicinal plants from northern Vietnam. In: Ozturk, M., Hakeem, K.R. (Eds.), *Plant and Human Health, Ethnobotany and Physiology*. Springer International Publishing, p. 813. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-93997-1>.
- Jan, S., Khan, M.R., Rashid, U., Bokhari, J., 2013. Assessment of antioxidant potential, total phenolics and flavonoids of different solvent fractions of *Monothea buxifolia* fruit. *Osong Public Health and Research Perspectives* 4, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2013.09.003>.
- Khan, M.Z., Jan, S., Khan, F.U., Noor, W., Khan, Y.M., Shah, A., Chaudhary, M.I., Ali, F., Khan, K., Ullah, W., Sabil, N., 2017. Phytochemical screening and biological activities of *Ranunculus arvensis*. *International Journal of Biological Sciences* 11, 15–21. <https://doi.org/10.12692/ijb/11.1.15-21>.
- Khan, W.N., Lodhi, M.A., Ali, I., Azhar-Ul-haq, M.A., Bilal, S., Gul, R., Choudhary, M.I., 2006. New natural urease inhibitors from *Ranunculus repens*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 21, 17–19. <https://doi.org/10.1080/14756360500319210>.
- Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., 2006. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian Herbs. *Phytochemical Research* 20, 961–965. <https://doi.org/10.1002/ptr.1985>.
- Kumar, S., Sandhir, R., Ojha, S., 2014. Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. *BMC Research Notes* 7, 560–569. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-560>.
- Kumaran, A., Karunakaran, R.J., 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT – Food Science and Technology* 40, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.011>.
- Le, K., Chiu, F., Ng, K., 2007. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry* 105, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.063>.
- León-González, M.E., Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., Madrid-Albarrán, Y., 2018. Residual brewing yeast as a source of polyphenols: extraction, identification and quantification by chromatographic and chemometric tools. *Food Chemistry* 267, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.141>.
- Li, T., Shen, P., Liu, W., Liu, C., Liang, R., Yan, N., Chen, J., 2014. Major polyphenolics in pineapple peels and their antioxidant interactions. *International Journal of Food Properties* 17, 1805–1817. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.732168>.
- Li, X., Wu, X., Huang, L., 2009. Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of *Radix Angelicae sinensis* (Danggui). *Molecules* 14, 5349–5361. <https://doi.org/10.3390/molecules14125349>.
- Lingua, M.S., Fabiani, M.P., Wunderlin, D.A., Baroni, M.V., 2016. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: its relationship to phenolic profile. *Journal of Functional Foods* 20, 332–345. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.034>.
- Loganayaki, N., Siddhuraju, P., Manian, S., 2013. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. *Journal of Food Science and Technology* 50, 687–695. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0389-x>.
- Lou, S.N., Hsu, Y.S., Ho, C.T., 2014. Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents. *Journal of Food and Drug Analysis* 22, 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.020>.
- Mutai, C., Abatis, D., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C., Roussis, V., 2007. Lupane triterpenoids from *Acacia mellifera* with cytotoxic activity. *Molecules* 12, 1035–1044. <https://doi.org/10.3390/12051035>.
- Nićiforović, N., Polak, Tomaž, Makuc, D., Ulrih, N.P., Abramović, H., 2017. A kinetic approach in the evaluation of radical-scavenging efficiency of sinapic acid and its derivatives. *Molecules* 22, 375–392. <https://doi.org/10.3390/molecules22030375>.
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., Vassiliki, O., 2019. Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters, in: Watson, R.R. (Ed.), *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. Academic Press, pp. 243–259.
- Ouarghidi, A., Martin, G.J., Powell, B., Esser, G., Abbad, A., 2013. Botanical identification of medicinal roots collected and traded in Morocco and comparison to the existing literature. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 9, 59–72. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-59>.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 44, 307–315. <https://doi.org/10.5264/iejyogakuzashi.44.307>.
- Pandey, R.K., Shukla, S.S., Vyas, A., Jain, V., Jain, P., Saraf, S., 2019. *Fingerprinting Analysis and Quality Control Methods of Herbal Medicines*. CRC press, Boca Raton.
- Paudel, B., Bhattarai, H.D., Kim, I.C., Lee, H., Sofronov, R., Ivanova, L., Poryadina, L., Yim, J.H., 2014. Estimation of antioxidant, antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of plants collected from Oymyakon region of the Republic of Sakha

- (Yakutia). Russian Biological Research 47, 10–16. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-10>.
- Prieto, J.M., Recio, M.C., Giner, R.M., Máñez, S., Rios, J.L., 2003. Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. Journal of Ethnopharmacology 89, 131–137. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00271-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00271-X).
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269, 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53, 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- Rafińska, K., Pomastowski, P., Rudnicka, J., Krakowska, A., Maruška, A., Narkute, M., Buszewski, B., 2019. Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts. Food Chemistry 289, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.025>.
- Rai, M., Acharya, D., Rios, J.L., 2011. Ethnomedicinal Plants: Revitalization of Traditional Knowledge of Herbs. CRC Press.
- Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M., 2013. Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ramón-González, M., Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., Madrid, Y., 2019. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. Waste Management 96, 15–24.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Rivera, D., Obón, C., Heinrich, M., Inocencio, C., Verde, A., Fajardo, J., 2006. Gathered Mediterranean food plants – ethnobotanical investigations and historical development. In: Heinrich, M., Müller, W.E., Galli, C. (Eds.), Local Mediterranean Food Plants and Nutraceuticals. Karger, Basel, pp. 18–74.
- Rodrigo, R., 2009. Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease. Nova Science Publishers, New York.
- Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis 10, 1003–1008.
- Sarikurcu, C., Targan, S., Ozer, M.S., Tepe, B., 2017. Fatty acid composition, enzyme inhibitory, and antioxidant activities of the ethanol extracts of selected wild edible plants consumed as vegetables in the Aegean region of Turkey. International Journal of Food Properties 20, 560–572. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1168837>.
- Shah, B.N., Seth, A.K., 2010. Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry. Elsevier, New Delhi.
- Shahid, S., Riaz, T., Asghar, M.N., 2015. Screening of *Ranunculus sceleratus* for enzyme inhibition, antibacterial and antioxidant activities. Bangladesh Journal of Pharmacology 10, 436–442. <https://doi.org/10.3329/bjp.v10i2.22805>.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – a review. Journal of Functional Foods 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 32, 67–103. <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>.
- Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X., Li, P., 2010. Antioxidant activity in vitro of the selenium-contained protein from the Se-enriched *Bifidobacterium animalis* 01. Anaerobe 16, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.006>.
- Siddhuraju, P., Becker, K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. Journal of Agriculture and Food Chemistry 51, 2144–2155. <https://doi.org/10.1021/jf020444+>.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16, 144–158.
- Sroka, Z., Fecka, I., Cisowski, W., 2005. Antiradical and anti-H₂O₂ properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract. Zeitschrift für Naturforschung C 60, 826–832.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agriculture and Food Chemistry 46, 4267–4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*). Food Chemistry 90, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.013>.
- Zdenka, D., 2014. Free radicals and antioxidants for non-experts. In: Ismail, Laher (Ed.), Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 4–22. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9>.
- Zhang, H., Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. Current Opinion in Food Science 8, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>.
- Zhang, Z., Jin, Q., Lv, G., Fan, Lijun, Pan, H., Fan, Leifa, 2013. Comparative study on antioxidant activity of four varieties of *Flammulina velutipes* with different colour. International Journal of Food Science and Technology 48, 1057–1064. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12062>.
- Zhao, H., Zhang, H., Yang, S., 2014. Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. Food Science and Human Wellness 3, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.12.005>.



Anti-inflammatory activity of ethyl acetate and *n*-butanol extracts from *Ranunculus macrophyllus* Desf. and their phenolic profile

Amirouche Deghima^a, Nadjat Righi^b, Noelia Rosales-Conrado^{c,*},
María Eugenia León-González^c, Faiza Baali^b, Esther Gómez-Mejía^c, Yolanda Madrid^c,
Fatiha Bedjou^a

^a Laboratoire de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique, Faculté des Sciences de La Nature et de La Vie, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria

^b Laboratory of Characterization and Valorization of Natural Resources, University Mohamed El Bachir El Ibrahimi, Bordj Bou-Arredj, 34000, Algeria

^c Departamento de Química Analítica, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 28040, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Ranunculus macrophyllus Desf.
Skin edema
Anti-inflammatory
Skin inflammatory disorders
Membrane stabilizing
Polyphenols
Triterpenoids

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The members of the genus *Ranunculus* have counter-irritating properties and thus, they are traditionally used for treating anti-inflammatory disorders and other skin conditions. *Ranunculus macrophyllus* Desf. is a wild medicinal plant growing in Algeria and traditionally used to treat some cutaneous skin disorders.

Aim: The aim of this study was to characterize the composition of the ethyl acetate and *n*-butanol extracts from *Ranunculus macrophyllus* Desf. as well as to elucidate and to compare their effect against acute skin inflammation. Moreover, both the antioxidant activity and the acute toxicity of the plant extracts were also studied.

Materials and methods: Spectrophotometric and chromatographic methods were employed to identify and quantify phenolic compounds and triterpenoids from *R. macrophyllus* Desf. fractions. The antioxidant activity was estimated using the phosphomolybdenum, DPPH, reducing power and β -carotene bleaching assays. The ethyl acetate and *n*-butanol extracts were screened for their anti-inflammatory activities using *ex-vivo* membrane stabilizing assays and *in-vivo* acute skin inflammation model.

Results: Ethyl acetate fraction showed the highest amounts of total phenolic compounds ($413 \pm 4 \mu\text{g GAE/mg}$ extract) and triterpenoids ($70.4 \pm 1.8 \mu\text{g UAE/mg}$ extract). Rutin, hesperidin, myricetin and kaempferol were the major compounds identified in the different fractions. Ethyl acetate fraction exhibited strong DPPH[•] radical scavenging ability ($\text{IC}_{50} 1.6 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$), high total antioxidant capacity ($447 \pm 7 \mu\text{g AAE/mg}$ extract) and reducing power ($514 \pm 8 \mu\text{g AAE/mg}$ extract). Ethyl acetate fraction inhibited (73.4 ± 0.3) % of linoleic acid peroxidation. Ethyl acetate and *n*-butanol fractions did not have any visible toxicity at 2000 mg/kg and presented excellent membrane stabilizing ability. The inhibition of xylene induced ear inflammation was (38 ± 4) % and (46 ± 1) % for RM-B and RM-EA, respectively.

Conclusions: The high content of both phenolic compounds and triterpenoids combined with the remarkable anti-inflammatory effect and antioxidant activity of ethyl acetate and *n*-butanol extracts from *R. macrophyllus* Desf. support the wide spread use of this traditional plant on some skin disorders (inflammatory skin disorders).

1. Introduction

The skin is the largest and most important body organ, protecting the body against environmental factors and keeping its homeostasis (Bickers and Athar, 2006). It plays an important role in regulating body

temperature and excretion of some metabolic waste products (Kruk and Duchnik, 2014). Skin is often exposed to the harmful effect of many agents of physical (UV radiation) or chemical nature (xenobiotic), that can alter both structure and function of the skin (Bickers and Athar, 2006). These agents can themselves be oxidizing substances or induce

* Corresponding author.

E-mail addresses: damir112003@gmail.com (A. Deghima), n.righi@univ-bba.dz (N. Righi), noerosales@quim.ucm.es (N. Rosales-Conrado), leongon@quim.ucm.es (M.E. León-González), faiza.baali@univ-bba.dz (F. Baali), egomez03@ucm.es (E. Gómez-Mejía), ymadrid@quim.ucm.es (Y. Madrid), fatihabedjou2015@gmail.com (F. Bedjou).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113347>

Received 24 February 2020; Received in revised form 22 August 2020; Accepted 26 August 2020

Available online 2 September 2020

0378-8741/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

the production of reactive oxygen species (R.O.S). R.O.S can induce lipid peroxidation in the unsaturated fatty acids rich skin cell membranes affecting the integrity of the cells (Kruk and Duchnik, 2014) and causing several skin disorders like prolonged inflammation (Trouba et al., 2002), that can then trigger inflammatory skin diseases. The most common inflammatory skin disorders are atopic dermatitis and psoriasis. Available treatments for those disorders are often unsuccessful and they have a wide range of side effects. Folk medicine has always relied on plants as a remedy for skin disorders (Otuki et al., 2011). The topical application or oral administration of plant derived bioactive compounds showed antioxidant, anti-inflammatory, chemo preventive and photoprotective effect on the skin, thus providing an effective skin protective effect (Katiyar et al., 1995; Almeida et al., 2008; Oyetakinwhite et al., 2012).

Ranunculus is the most diverse genus of the family Ranunculaceae with more than 600 species. It constitutes a supply of medicinal plants traditionally used for the treatment of intermittent fever, rheumatism, hemorrhages and anti-helminthic (Aslam et al., 2012). They are also used as a remedy for skin sores, cuts and scrapes in addition to other skin disorders. *Ranunculus* species are mostly known as rubefacient or counter irritants (Turner, 1984). Some species exhibit anti-inflammatory properties that goes beyond the primary counter-irritant effect (Prieto et al., 2003, 2008; Akkol et al., 2012). Interesting biological activities such as antioxidant (Kaya et al., 2010), hepatoprotective and anti-cancer (Aslam et al., 2012) were also reported.

Particularly, *Ranunculus macrophyllus* Desf. is one of the 50 representative species of the genus *Ranunculus* in Algeria (Hachlaf et al., 2013). As other *Ranunculus* members, *R. macrophyllus* Desf. is used for the treatment of some cutaneous skin disorders (Rai et al., 2011). To the best of our knowledge there are no reports supporting its traditional use. Therefore, the aim of the present study was to characterize the composition of the *R. macrophyllus* Desf. ethyl acetate and *n*-butanol extracts, as well as to elucidate and to compare their effect against acute skin inflammation. Additionally, the antioxidant activity and the acute toxicity of the plant extracts were also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All chemicals and solvents were of analytical grade, and purified water from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used. Methanol, hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, xylene, folin-ciocalteu, sodium bicarbonate, aluminum chloride, bovine serum albumin, sodium dodecyl sulfate (SDS), triethanolamine (TEA), tannic acid, vanillin, gallic acid, quercetin, rutin, catechin, ursolic acid, acetic acid, perchloric acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), disodium hydrogen phosphate, sodium phosphate monobasic, sodium chloride, potassium chloride, trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride, potassium hexacyanoferrate (III), ammonium molybdate tetrahydrate, sulphuric acid, β -carotene, linoleic acid, tween 40 and butylated hydroxyanisole (BHA) were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Plant material and sample preparation

The aerial parts (leaves, flowers and stem) of *Ranunculus macrophyllus* Desf (the plant name was checked with <http://www.theplantlist.org/> on 08/18/2019). have been collected from the prairies of Ras El Oued- Bordj Bou Arreridj region north-east Algeria (N35°57'44.305"; E5°2'15.947") on May 2017. The plant material was identified by Dr. Bouadam from the department of physico-chemical biology of the university of Bejaia and a voucher specimen has been deposited at the herbarium of the Life and Natural Sciences Department, M'sila University, with the number AB-108. The plant was air dried for one month, and then powdered with an electric blender.

2.3. Extraction and fractionation

The extraction and fractionation of the plant powder were conducted according to Prieto et al. (2003). An amount of 100 g of plant powder was macerated three times with 500 mL of pure methanol. The combined filtrates were evaporated under low pressure with a rotary evaporator (40 °C) to afford the crude methanolic extract. The crude methanolic extract was dissolved in 100 mL aqueous methanol (10% v/v), then fractionated in separating funnel with solvents of increasing polarity: hexane (RM-H), chloroform (RM-CH), ethyl acetate (RM-EA) and *n*-butanol (RM-B) to yield 4 fractions. The remaining aqueous phase was designed as the fifth fraction (RM-Aq).

2.4. Colorimetry of secondary metabolites

The total phenolic content of the fractions was determined according to Singleton and Rossi (1965). A calibration curve was prepared using gallic acid as standard (50–200 μ g/mL) and the results were expressed as μ g gallic acid equivalents per mg dry extract (μ g GAE/mg extract). Total flavonoids were evaluated following the method of Djerdane et al. (2006). Quercetin (5–50 μ g/mL) was used to prepare a calibration curve and the results were expressed as μ g quercetin equivalents per mg dry extracts (μ g QE/mg extract). Flavonols content was assessed using the method described by Kumaran and Karunakaran (2007). The results were expressed as μ g rutin equivalents per mg dry extract (RE/mg extract) using a calibration curve prepared with rutin (10–100 μ g/mL) as standard compound. The total tannins content of the fractions was estimated according to the method of Hagerman and Butler (1978), this method is based on the ability of tannins to precipitate proteins. A calibration curve was prepared using tannic acid (25–1200 μ g/mL) as reference compound and the results were expressed as μ g tannic acid equivalents per mg dry extract (μ g TAE/mg extract). The estimation of condensed tannins was performed according to the guidance of Sun et al. (1998). A calibration curve was prepared using catechin as standard (20–200 μ g/mL) and the results were expressed as μ g catechin equivalents per mg dry extracts (μ g CE/mg extract). The amount of triterpenoids in the extract was assessed as reported by Chang et al. (2012). Ursolic acid was used as standard to prepare the calibration curve and the results were expressed as μ g ursolic acid equivalents per mg dry extracts (μ g UAE/mg extract).

2.5. cLC-DAD and LC-MS/MS analysis of the different fractions

The individual phenolic profile of the different plant fractions was determined using an Agilent cLC instrument Mod. 1100 Series (Agilent Technologies, Madrid, Spain), coupled to a G1376A binary capillary pump, a G1379A degasser and a G1315B diode array detector (500 nL, 10 mm pathlength). The capillary analytical column used for the analysis was a Synergi™ Fusion 4 μ m C18 (150 mm $\times$ 0.3 mm I.D.) (Phenomenex, Torrance, CA, USA), which was preserved at room temperature and equipped with a Rheodyne® injection valve coupled to an external stainless-steel loop. Detection was made using a diode array HP8543 UV/Vis spectrophotometer (Agilent Technologies), connected to HP Chemstation software. The chromatographic analysis was performed as previously described by León-González et al. (2018), using a mixture of acetonitrile (A) and an aqueous solution 0.1% (v) TFA at pH 3.2 (B) as mobile phase at a flow rate of 10 μ L/min. The elution program started with 8% A for 3 min, followed by a linear increase to 34% A during 11 min, an isocratic step at 34% A for 7 min, and then a linear decrease to 8% A, which was kept until the end of the analysis.

The plant fractions were further analyzed by LC-MS/MS in negative electrospray ionization (ESI) mode according to Gómez-Mejía et al. (2019), using a Shimadzu LC-MS-8030 triple quadrupole system (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) equipped with a Nexera LC-30AD solvent delivery unit, a Nexera SIL-30 A C autosampler with temperature-controlled tray and a CTO-20 A C column oven. A

SynergiTM C18 Fusion-RP 80 Å analytical column from Phenomenex (150 × 3 mm I.D., 4 µm) at room temperature was used. Data were acquired and processed with the LabSolutions LC-MS software provided by Shimadzu. The MS/MS equipment used nitrogen as both nebulizing (1.5 L/min) and drying (15.0 L/min) gas. Fragmentation was performed using argon as the collision gas at a pressure of 230 kPa in the collision cell, and the collision energy voltages applied were in the range 10–55 eV. ESI for ionization voltage was set at −4.5 kV. The interface current was fixed at 6.2 µA, and the detector voltage at 1.84 kV.

A mixture of methanol (solvent A) and 0.2% (v) formic acid aqueous solution (solvent B) was used as mobile phase: 5% solvent A maintained for 0.1 min, linear increase to 40% A within 25 min, and to 70% A within another 10 min. This condition was maintained for 2 min, and then changed to the initial conditions (5% A) within 1 min and equilibrated for 2 min. The flow rate was 0.50 mL/min.

2.6. *In-vitro* antioxidant activity

Four *in-vitro* methods were used to screen the antioxidant capacity of the different fractions from *Ranunculus macrophyllus* Desf., based on their capacity to scavenge free radicals (DPPH•) and their ability to reduce iron ions as well as their capacity to inhibit lipid peroxidation using lipidic like system (β-carotene/linoleic acid assay).

The Phosphomolybdenum method was used to determine the total antioxidant capacity of the obtained extracts according to Prieto et al. (1999). The results were expressed as ascorbic acid equivalents per milligram of the extract using ascorbic acid calibration curve.

The DPPH• assay described by Shen et al. (2010) was performed to assess the antiradical activity of the various extracts. The inhibition of DPPH radical was calculated using the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = (Ac - At / Ac) \times 100$$

where “Ac” is the absorbance of the control and “At” is the absorbance of the test.

The reducing power of the extracts was evaluated according to Oyaizu (1986). The results were expressed as ascorbic acid equivalents per milligram of the extract (AAE/mg extract) using the prepared ascorbic acid calibration curve.

The potential anti-lipid peroxidation of the extracts was also determined using the β-carotene bleaching assay in a lipidic like system (β-carotene/linoleic acid assay) as described by Tepe et al. (2005). The absorbance was measured at 490 nm after 1, 2, 3, 4, 6, 24 and 48 h of incubation in the dark at room temperature. The 24 h inhibition of the β-carotene bleaching was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = (AE / AB) \times 100$$

where “AE” is the absorbance of samples or extracts at initial time and “AB” is the absorbance after 24 h.

The obtained results were compared with synthetic antioxidants (BHT and BHA) and natural pure compounds (gallic acid and quercetin).

2.7. Acute toxicity

NMRI male/female *Swiss albino* mice weighting 20–25 ± 2 g were bought from Pasteur institute Algiers (Algeria). They were kept in an animal holding room in standard conditions (temperature 25 ± 3 °C and humidity 50 ± 10%) under 12-h light/12-h dark cycle. Mice were fed standard diet and water *ad libitum*. They were acclimated for at least 10 days before testing and fasted 12 h before any dosing. All experiments were conducted in strict compliance with internationally accepted principles for laboratory animals (directive N°, 2010/63/EU of September 22, 2010 which updates and replaces directive N° 86/609/EEC of November 24, 1986).

To evaluate the acute toxicity of the chosen fractions a limit dose of 2000 mg/kg was tested according to the OECD guideline 423 (OECD,

2011). This method, also known as the acute toxic class method, is a single-dose 14-day acute oral toxicity study. It is a stepwise procedure that requires a minimal number of animals, and on which the acute toxicity depends on the mortality and/or moribund state of animals. Three fasted female mice received the fractions at a limit dose of 2000 mg/kg body weight, while the control group received only the vehicle (5% of tween 20; v/v). The animals were observed for visual clinical toxicity signs or mortality with special attention provided within the first 4 h and afterwards every day for a total of 14 days. The serum biochemical parameters reflecting liver and kidneys functions were then estimated.

2.8. Anti-inflammatory activity

2.8.1. Membrane stabilizing activity

The potential anti-inflammatory activity of the RM-EA and RM-B fractions was investigated using *ex-vivo* membrane stabilizing models. Hypotonic induced hemolysis on mice RBC, originally developed by Seeman and Weinstein (1966), was used as a first model with aspirin as standard ant-inflammatory drug. Percent inhibition was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ Inhibition of hemolysis} = (Ac - At / Ac) \times 100$$

where “Ac” is the absorbance of the control in hypotonic solution and “At” is the absorbance of test sample in hypotonic solution.

Heat induced hemolysis on mice red blood cells (RBC), was used as a second membrane stabilization model to estimate the anti-inflammatory activity of the RM-EA and RM-B fractions according to Shinde et al. (1999). Aspirin at 200 µg/mL was used as standard ant-inflammatory drug and the inhibition of hemolysis was calculated with the following formula:

$$\% \text{ Inhibition of hemolysis} = (At_2 - At_1 / Ac - At_1) \times 100$$

where “At₁” is the absorbance of the sample in unheated solution, “At₂” is the absorbance of the sample heated solution and “Ac” is the absorbance of control in unheated solution.

2.8.2. Skin inflammation

The effect of ethyl acetate and *n*-butanol extracts against acute skin inflammation was studied using xylene-induced ear edema model in mice according to Xu et al. (2014). NMRI male *Swiss albino* mice weighting from 20 to 25 g were used in this test. Mice were randomly grouped into 5 groups (n = 7). Group 1 served as model control group and received vehicle (tween 20, 5% v/v) at 10 mL/kg bw; group 2 was used as positive control and was given dexamethasone (1 mg/kg bw); group 3, 4 and 5 received the extracts at 200, 400 and 600 mg/kg bw, respectively. One hour after oral administration, the inner and outer surface of the right ear was wiped up with 30 µL of xylene while the left ear served as control. One hour later, mice were sacrificed using cervical dislocation then a piece of 8 mm of the ear was punched out and weighed. The increase in ear weight is the difference between right and left ear and reflects the edema formation, low value indicates better anti-inflammatory effect. ear weight was used to calculate edema inhibition according to the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\Delta \text{ weight of ear control} - \Delta \text{ weight of ear test}}{\Delta \text{ weight of ear control}} \times 100$$

2.9. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and data were analyzed using the software OriginPro b9.3.226. The results were expressed as mean values and standard deviation (SD) for *in-vitro* tests or standard error of means (SEM) for *in-vivo* study. The differences between the fractions and positive controls were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's significant difference post hoc

test with $\alpha = 0.05$. Extraction data were also explored and modeled using principal component analysis (PCA) using the software package Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

3. Results and discussions

3.1. Extraction and fractionation yield

The maceration at room temperature of the plant powder gave a greenish semisolid crude methanolic extract that represents 22.35% (w/w dried material). Liquid-liquid separation of the methanolic extract with solvents of increasing polarity afforded five fractions with the following yields 12.72% (RM-H), 0.67% (RM-CH), 3.1% (RM-EA), 12.03% (RM-B), 61.46% (RM-Aq). Previous work on *Ranunculus peltatus* subsp. reported a 3.7% (w/w fresh material) yield for the crude methanolic extract and for the fractions the following yields were obtained: *n*-hexane (4%), chloroform (9%), ethyl acetate (4%) *n*-butanol (5%) and aqueous (78%) (Prieto et al., 2008). This study reported lower yields for crude methanolic extract, hexane and *n*-butanol, higher yields for chloroform, and similar yields for ethyl acetate and aqueous fractions compared to our results. For *Ranunculus sceleratus* Shahid et al. (2015) reported only 1.22% (w/w dry material) for the crude methanolic extract while for the rest of the fractions the yields were 15.21% for hexane, 19.02% for chloroform, 21.73% for ethyl acetate, 10.86 for *n*-butanol and 21% for aqueous fraction, thus showing lower yields for crude methanolic extract and aqueous fraction, higher yields for ethyl acetate and chloroform and similar yields for *n*-butanol and hexane. However, many factors influence the extraction yield, including the nature of the extraction solvent, the growing area of the plant, the maturity stage of the harvested sample and genetic variability and the post-harvest handling. Consequently, all these factors make difficult the comparison of the obtained yields (Siddhuraju and Becker, 2003).

3.2. Spectrophotometric determination of secondary metabolites

The fractions resulting from the liquid-liquid extraction were subjected to colorimetric assays to estimate their secondary metabolites content. The results are shown in Table 1.

From the results, it could be concluded that all the different classes of secondary metabolites exist in all the fractions but with different amounts. Overall, the ethyl acetate fraction contained high levels of phenolic compounds and triterpenoids and presented the highest amount of total polyphenols (413 ± 4 GA E/mg extract), total flavonoids (48 ± 1 QE/mg extract), flavonols (263.6 ± 0.6 R E/mg extract) and condensed tannins (92 ± 1 C E/mg extract). However, for the other classes the hexane fraction presented the highest content for total tannins (69 ± 2 TA/mg extract) and triterpenoids content (74 ± 6 UAE/mg extract), the aqueous fraction seemed to be the poorest among the other fractions since it contained low amounts of all the different secondary metabolite classes.

Similar distribution of the bioactive compounds was found in the roots of *R. macrophyllus* Desf. with lower amounts (Deghima et al.,

2020). The TPC of different fractions from *Ranunculus sceleratus* was studied by Shahid et al. (2015) and it was as follow: 23.5 ± 1.4 μ g GAE/mg extract for the hexane fraction, 73.3 μ g GAE/mg extract for the chloroform fraction, 97.1 μ g GAE/mg extract for the ethyl acetate fraction, 79.6 μ g GAE/mg extract for the *n*-butanol fraction and 64.6 μ g GAE/mg extract for the aqueous fraction. The results offered by Shahid et al. (2015) suggest the same general distribution of phenolic compounds between the different fractions but with lower amounts, the TPC increase with the polarity of the solvent until it reaches the maximum in the ethyl acetate fraction, then it decreases gradually. In fact, the extraction yield expressed as percent per dry material and the extractable substances expressed as GAE/mg dry extract as an example, strongly depends on the solvent used for the extraction and the strength of solute/matrix interaction (Siddhuraju and Becker, 2003; Dhanani et al., 2017). The polarity of the solvent determines the nature of extracted molecules (Ashraf et al., 2016). It is also important to note that the different chemical proprieties of the different classes of molecules affect their extractability and thus polar molecules are more soluble in polar solvents while non-polar compounds are more soluble in non-polar solvent (Ramawat and Mérillon, 2013).

3.3. cLC-DAD and LC-MS/MS phenolic profile

A method combining reversed-phase high-performance capillary liquid chromatography with photodiode array detection (cLC-DAD) and LC-MS-MS was used to determine phenolic compounds in aerial parts of *R. macrophyllus* Desf. Polyphenols were determined by cLC-DAD and the obtained results were analyzed using several chemometric tools (Table 2). Flavonols as rutin, quercetin, myricetin and kaempferol, flavonoids as hesperidin, hydroxybenzoic acids as gallic acid and hydroxycinnamic acids as *p*-coumaric, *trans*-ferulic, chlorogenic and caffeic acids were found and quantified in different rich fractions from the methanolic crude extract of *R. macrophyllus* Desf. Myricetin and quercetin were the most abundant polyphenols found in ethyl acetate fraction with concentrations of (70 ± 4) mg/g dry extract and (61 ± 9) mg/g dry extract, respectively. Myricetin was exclusively detected in ethyl acetate fraction while caffeic acid was only found in the butanolic fraction that also contained rutin as its major compound with (11 ± 2) mg/g dry extract. Chloroform fraction contained only kaempferol, quercetin and hesperidin as major compound, for which an amount of (51 ± 9) mg/g dry extract was found. None of the studied compounds were identified in the aqueous fraction, while only quercetin was identified in the hexane fraction.

3.4. In-vitro antioxidant activity

As the antioxidant activity is closely related to the assay being used, several *in-vitro* models with different mechanisms (electron/hydrogen donating, radical scavenging, metal ions reductions and lipid peroxidation) have been used for a better estimation and understanding of the antioxidant activity of the different fractions from the aerial parts of *R. macrophyllus* Desf. and the results are summarized in Table 3.

The results clearly show the remarkable DPPH[•] scavenging ability of

Table 1

Colorimetric determination of the secondary metabolites of the different fractions from *Ranunculus macrophyllus* Desf.

	TPC GAE/mg dry extract	TFC QE/mg dry extract	FC RE/mg dry extract	TTC TAE/mg dry extract	CTC CE/mg dry extract	TC UAE/mg dry extract
RM-H	21.8 ± 0.7^c	6.89 ± 0.09^d	7 ± 1^c	69 ± 2^a	84 ± 7^a	74 ± 6^a
RM-CH	245 ± 7^b	16 ± 1^c	13.9 ± 0.5^d	29 ± 4^b	66 ± 6^a	40.6 ± 0.5^b
RM-EA	413 ± 4^a	48 ± 1^a	263.6 ± 0.6^a	2.1 ± 1.8^c	92 ± 1^a	70 ± 2^a
RM-B	256 ± 7^b	39.8 ± 1.8^b	159 ± 5^b	6.6 ± 1.2^c	76 ± 6^a	27.6 ± 0.9^c
RM-Aq	25.2 ± 0.9^c	5.0 ± 0.7^d	27.9 ± 0.5^c	2.2 ± 0.7^c	39.6 ± 0.7^b	17.2 ± 0.5^d

TPC: total phenolic content; TFC: total flavonoid content; FC: flavonol content; TTC: total tannins content; CTC: condensed tannins content; TC: triterpenoids content; RM-H: hexane fraction; RM-CH: chloroform fraction; RM-EA: ethyl acetate fraction; RM-B: *n*-butanol fraction; RM-Aq: aqueous fraction. Results are expressed as mean $\pm$ SD (n = 3). Values on the same column with different superscript letters are significantly different (*p*-value < 0.05).

Table 2Individual polyphenols identified in the different fractions from *Ranunculus macrophyllus* Desf.

	cLC-DAD		RM-H	RM-CH	RM-EA	RM-B	RM-Aq
Compound	RT (min)	UV ^a (nm)	Extracted amount (mg/g dry extract)				
Gallic acid	2.90	292	nd	nd	10 ± 1	1.7 ± 0.4	nd
Chlorogenic acid	6.44	260	nd	nd	8 ± 3	2.0 ± 0.9	nd
Caffeic acid	8.88	310	nd	nd	–	1.3 ± 0.2	nd
<i>p</i> -Coumaric acid	10.21	310	nd	nd	9.7 ± 0.7	2.16 ± 0.04	nd
Ferrulic acid	11.16	310	nd	nd	9 ± 1	0.90 ± 0.02	nd
Rutin	13.78	365	nd	nd	44 ± 5	11 ± 2	nd
Myricetin	14.45	365	nd	nd	69 ± 4	nd	nd
Hesperidin	14.64	292	nd	51 ± 9	47 ± 6	5.0 ± 0.3	nd
Resveratrol	15.25	310	nd	nd	7.5 ± 0.9	0.24 ± 0.08	nd
Quercetin	17.10	365	8 ± 2	6.2 ± 0.6	61 ± 9	nd	nd
Kaempferol	18.64	365	nd	6.7 ± 1.3	1.8 ± 2.2	nd	nd

^a Wavelength used for quantification; RT: retention time; RM-H: hexane fraction; RM-CH: chloroform fraction; RM-EA: ethyl acetate fraction; RM-B: butanol fraction; RM-Aq: aqueous fraction; nd: non-detected.

ethyl acetate and *n*-butanol fractions with IC₅₀ ranging from (1.6 ± 0.2) to (4.2 ± 0.2) µg/mL, respectively, suggesting a strong electron donating ability, this activity is similar to that of the pure compounds with IC₅₀ ranging from (0.54 ± 0.04) to (4.1 ± 0.2) µg/mL. These values are higher than those obtained by Shahid et al. (2015) in his study on *Ranunculus sceleratus* (IC₅₀ ranged from 47.0 ± 1.0 to 85.0 ± 0.6 µg/mL). It appears that the extraction method affects both, phenolic content and the antioxidant activity of the studied fractions (Khan et al., 2017).

The TAC and reducing power assays showed the ability of polyphenols from the different fractions to reduce metal ions, suggesting the possibility of an electron transfer mechanism and the ability to prevent the formation of free radicals. Ethyl acetate fraction exhibited a good

Table 3*In-vitro* antioxidant activity of different fractions from *Ranunculus macrophyllus* Desf. and positive controls (BHA, BHT, quercetin and gallic acid).

	TAC µg AAE/mg extract	DPPH IC ₅₀ µg/mL	FRAP µg AAE/mg extract	B-carotene % inhibition After 24 h
RM-H	158 ± 5 ^g	47 ± 8 ^c	4.2 ± 1.6 ^h	55.8 ± 0.7 ^e
RM-CH	250 ± 4 ^{e,f}	32 ± 2 ^d	76 ± 8 ^f	67.8 ± 0.5 ^{b,c}
RM-EA	447 ± 7 ^b	1.6 ± 0.2 ^a	513 ± 8 ^c	73.4 ± 0.3 ^b
RM-B	268 ± 3 ^{c,e}	4.2 ± 0.2 ^{a,c}	148 ± 4 ^e	64 ± 2 ^{c,d}
RM-Aq	119 ± 12 ^h	11 ± 2 ^{b,c}	16.7 ± 0.5 ^g	3.2 ± 0.4 ^f
BHA	378 ± 7 ^c	1.9 ± 0.3 ^a	434 ± 5 ^d	88 ± 4 ^a
BHT	347 ± 3 ^d	4.1 ± 0.2 ^{a,b}	515.0 ± 0.2 ^c	83 ± 3 ^a
Quercetin	225 ± 7 ^f	1.26 ± 0.12 ^a	800 ± 10 ^b	nd
Gallic acid	754 ± 7 ^a	0.54 ± 0.04 ^a	1129 ± 5 ^a	61 ± 3 ^{d,e}

RM-H: Hexane fraction; RM-CH: Chloroform fraction; RM-EA: Ethyl acetate fraction; RM-B: *n*-butanol fraction; RM-Aq: Aqueous fraction; BHA: Butylated hydroxyanisole; BHT: Butylated hydroxytoluene; TAC: Total antioxidant capacity; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP: Ferric reducing antioxidant power. Results are expressed as mean ± SD (n = 3). Values on the same column with different superscript letters are significantly different (*p*-value < 0.05). nd: non-detected.

TAC and reducing power ability (447 ± 7) µg AAE/mg and (514 ± 8) µg AAE/mg, respectively, compared to the other fractions and even higher than TAC exhibited by the reference drugs BHA, BHT and quercetin. The butanol fraction was the second most active fraction followed by chloroform fraction and both were similar to that of quercetin. β-carotene bleaching assay was used to assess the potential ability of the different fractions from *R. macrophyllus* Desf. to inhibit linoleic acid peroxidation. The results presented in Table 3 showed that the best inhibition of β-carotene bleaching is exhibited by the ethyl acetate fraction with (73.4 ± 0.3) % after 24 h incubation. Similar effect was obtained by the chloroform fraction with a slightly lower inhibition. This effect is similar to that of gallic acid and lower than the synthetic antioxidants BHA and BHT. The *n*-butanol and hexane fractions showed moderate inhibition, while the inhibition of the aqueous fraction dropped drastically after 24 h to (3.2 ± 0.4) %. The antioxidant activity of the different fractions through the various tests may be ascribed to their content of phenolic compounds like quercetin, kaempferol, myricetin, hesperidin and rutin, whose antioxidant activity is well established (Dharmappa, 2016).

3.5. Principal component analysis (PCA)

In order to summarize and further analyze the obtained results, chromatographic and spectrophotometric data were submitted to PCA study. As a result, three principal components (PC) explained 100% of the total data variance (PC1 73.9%, PC2 15% and PC3 11.1%).

Fig. 1 shows the 3D biplot of the relationship among the different solvents fractions and the variables evaluated. As it can be observed each fraction appears in a different area of the bi-plot graph. Ethyl acetate fraction (RM-EA) showed the highest amount of resveratrol, quercetin, myricetin, chlorogenic acid, trans-ferrulic acid, *p*-coumaric acid and gallic acid, as well as the highest values of FRAP, 1/DPPH•IC₅₀, CTC (condensed tannins) and TC (total tannins). Additionally, butanol (RM-B) fraction showed large amounts of caffeic acid and high values of TFC (total flavonoids) index. Chloroform fraction (RM-CH) was clustered in the opposite direction to majority loadings: individual extracted polyphenols, FC (flavonols content), CTC content, FRAP and 1/DPPH•IC₅₀ antioxidant activity and presented kaempferol as the most extracted polyphenols compared to the other fractions. On the other hand, hexane fraction (RM-H) was distinguished by the highest content of TTC (total triterpenoids content).

3.6. Acute toxicity

The acute toxicity of the ethyl acetate and *n*-butanol fractions was estimated by testing a limit dose of 2000 mg/kg body weight. Food and water uptake in RM-EA and RM-B treated groups were not affected compared to the control group. Also, the treatments with ethyl acetate and *n*-butanol fractions did not cause any mortality during the dosing phase. No signs of visible toxicity were observed during the first 4 h and during the daily observations, including acute pain, distress, diarrhoea, motility disorders, convulsions, hypoactivity, abdominal pain, coma, excitation or respiratory disorders. According to the global harmonization system of classification and labelling of chemicals (GHS), the ethyl acetate and *n*-butanol fractions falls into category 5 (2000–5000 mg/kg. bw) with an LD₅₀ cut-off = 2500 mg/kg bw.

The biochemical parameters reflecting liver and kidneys functions are tabulated in Table 4. The increase in aminotransferase levels (AST and ALT) indicates liver injury and more specifically hepatocytes integrity they are associated with hepatic cell necrosis, while elevation of ALP levels is related to hepatobiliary damage (Gowda et al., 2009; Righi et al., 2020); creatinine and urea levels reflect kidney injury, both parameters are used to assess the glomerular filtration rate and renal excretory function, a high concentration of both reflects kidney disfunction (Gowda et al., 2009). Liver function parameters, AST and ALT did not show any significant variation compared to the control group while a slight increase of ALP levels was observed for both

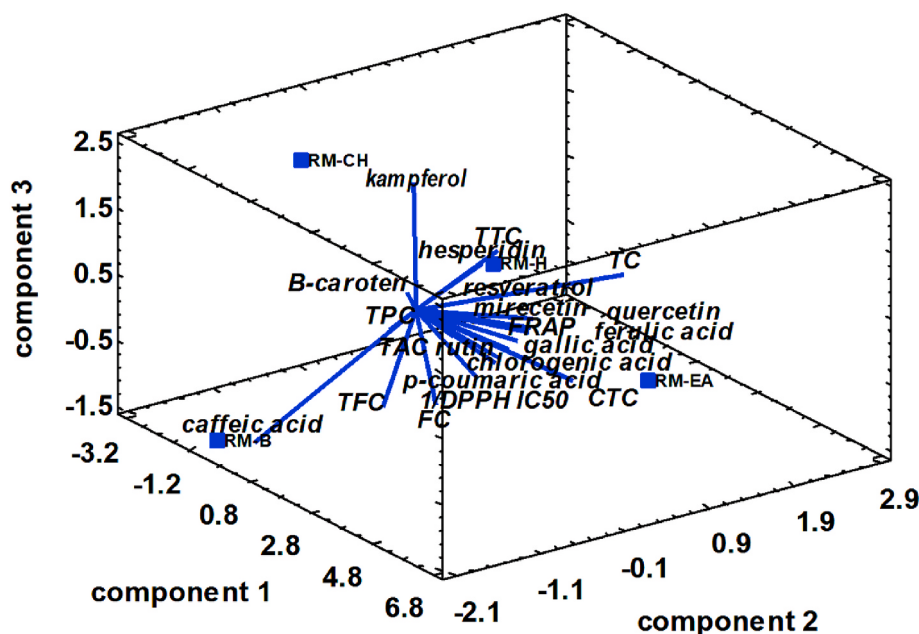


Fig. 1. Biplot of the simultaneous evaluation of the relationship of different fractions and loadings (antioxidant activity, total triterpenoids and total polyphenols and individual polyphenols). TPC (total polyphenol content), TFC (total flavonoid content), TAA (total antioxidant activity), DPPH• (scavenging activity of extracts against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, expressed as IC₅₀ mg extract·g⁻¹ sample DW).

Table 4

Effect of ethyl acetate (RM-EA), n-butanol fraction (RM-B) at 2000 mg/kg bw on mice liver and kidney function parameters. Values are presented as the mean $\pm$ SEM (n = 6).

	Liver Function parameters U/L			Kidney Function parameters	
	AST	ALT	ALP	Urea mg/ dL	Creatinine mmol/L
RM- Earrowhead	71 ± 5 ^{ns}	42 ± 3 ^{ns}	97 ± 2 ^{ns}	26 ± 5 ^{ns}	41 ± 3 ^{ns}
RM-B	69 ± 5 ^{ns}	28 ± 3 ^{ns}	101 ± 17 ^{ns}	29 ± 3 ^{ns}	38 ± 4 ^{ns}
Control	71 ± 4	39 ± 7	83 ± 8	28 ± 0.8	29 ± 1

PAL: phosphatase alkaline; AST: Aspartate aminotransferase. ALT: Alanine aminotransferase; ns: not-significant compared to control (*p-value* > 0.05).

fractions but this increase remains non-significant compared to the non-treated group. Urea and creatinine also did not significantly variate from the control group. Accordingly, we may conclude that the fractions did not cause any liver or kidney injury that could lead to an increase in the biochemical parameters related to those organs.

3.7. Anti-inflammatory activity

3.7.1. Membrane stabilizing assays

Hypotonic and heat induced hemolysis *ex-vivo* models were used to screen the potential anti-inflammatory activity of the most active and polyphenols rich fractions (Ethyl acetate and *n*-butanol extracts) and results are depicted in Fig. 2.

Both fractions, ethyl acetate and *n*-butanol significantly prevented RBC hypotonic induced hemolysis in a dose dependent manner and exhibited a maximal inhibition of $(33 \pm 2) \%$ and $(45 \pm 1) \%$ respectively at $100 \mu\text{g/mL}$. RM-EA and RM-B were also able to inhibit the lysis of RBC during the heat treatment in a similar way. The inhibition reached $(74 \pm 2) \%$ for RM-EA and $51.9 \pm 0.1\%$ for RM-B at $100 \mu\text{g/mL}$. The inhibition produced by Aspirin® at the same dose was still lower than the tested fractions. Aspirin® registered only $(24 \pm 2) \%$ and $(13.1 \pm 0.4) \%$ for hypotonic and heat induced hemolysis, respectively. The moderate activity of Aspirin® was also reported by [Brown et al. \(1967\)](#)

and Shinde et al. (1999).

Hypotonic medium, over heat and chemical medication (Methotrexate, hydroxychloroquine) can lead to RBC hemolysis (Murugesan et al. 2020). The similarity between RBC membrane and lysosomal membrane, make RBC and excellent model for the screening of possible anti-inflammatory drugs. During inflammatory response activated neutrophils may break down and release lysosomal content at the site of inflammation which promotes inflammation and damage at tissue site with variety of other disorders (Regan and Parrish, 1982). Compounds with membrane stabilizing activity act as anti-inflammatory drugs by restricting the release of lysosomal enzymes such as phospholipase that induce the synthesis of other proinflammatory mediators (Yesmin et al. 2017). NSAID showed the ability to stabilize lysosome's membrane and prevent the release of tissue damaging lysosomal enzymes in the inflammation site (Russo, 2000). The activity of RM-EA and RM-B suggests the presence of bioactive compounds that have a NSAID-like anti-inflammatory activity. The membrane stabilizing activity may be explained by an expansion of the cell membrane or by interaction with membrane proteins (Shinde et al., 1999). Quercetin and other polyphenols were found to be able to alter the permeability of the membrane bilayer allowing its expansion (Pawlikowska-Pawlega et al., 2003). Therefore, the present work suggests that the membrane stabilizing ability of the plant fractions may be a key factor of their anti-inflammatory activity.

3.7.2. Acute skin inflammation

The anti-inflammatory activity of the RM-EA and RM-B fractions from the aerial parts of *R. macrophyllus* Desf. was studied using *in-vivo* model: xylene-induced ear edema. It is an acute skin inflammation model in the ear of mice that is quick, simple and provides reproducible results. After application of an irritant (xylene) on the ear of mice, the extent of edema is measured by weighting the punched-out ear tissue in the treated and control groups (Gábor, 2003).

As can be seen in Fig. 3, both fractions significantly reduced skin edema in the ear after 1 h of xylene application in a dose dependent manner. Ethyl acetate exhibited higher edema inhibition than butanol fraction in all tested doses, but the difference between the two fractions was not significant.

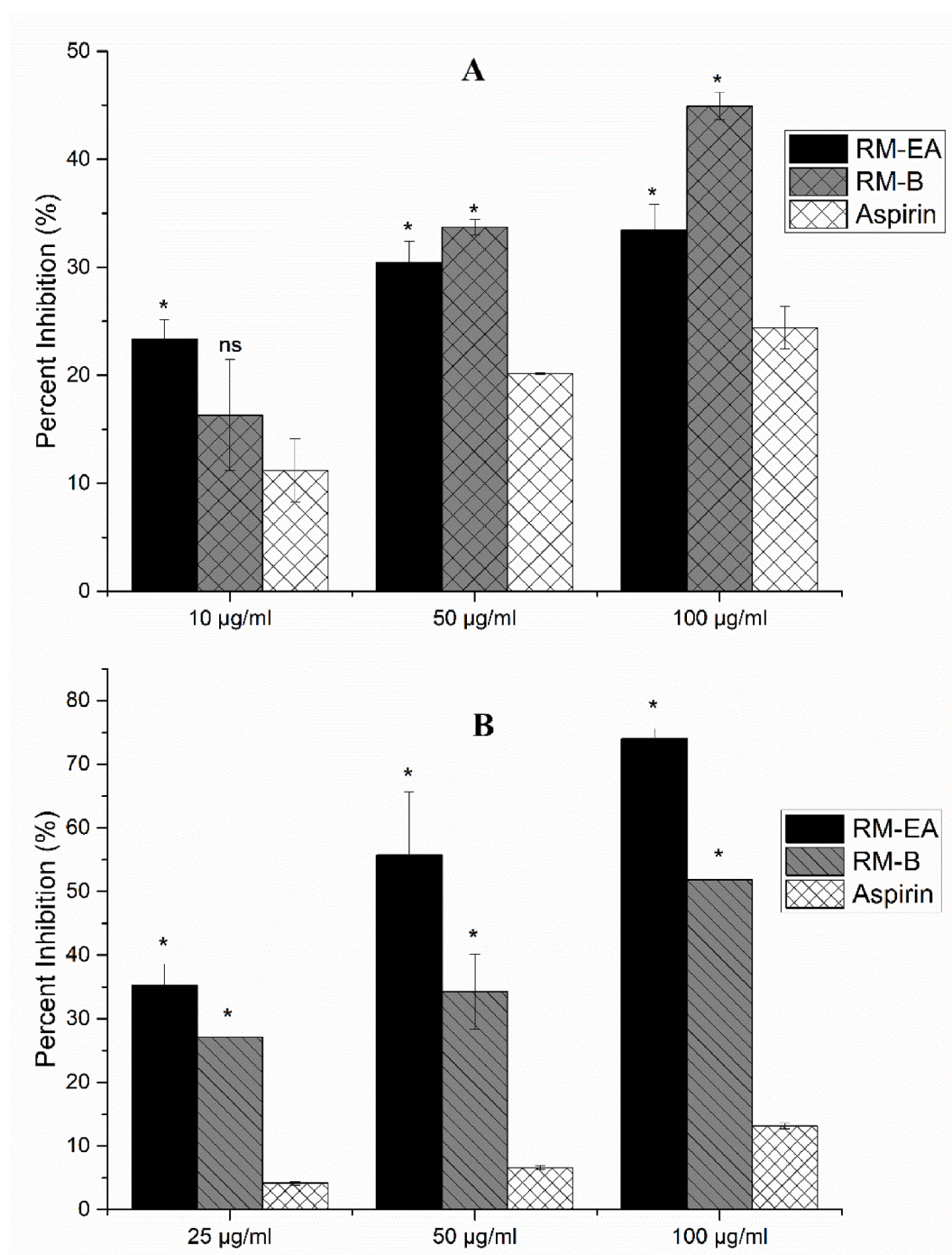


Fig. 2. Effect of ethyl acetate (RM-EA), n-butanol (RM-B) fractions and aspirin on the inhibition of RBC hemolysis. A: hypotonic induced hemolysis; B: heat induced hemolysis. Values are presented as the mean $\pm$ SD (n = 3). * statistically significant differences compared with aspirin (p -value < 0.05).

The inhibition at the dose 600 mg/kg was (38 ± 4) % and (47 ± 1) % for RM-B and RM-EA, respectively, while dexamethasone produced (54 ± 1) % at 1 mg/kg. At the highest dose, the effect of RM-EA fraction is similar to that of the standard anti-inflammatory agent dexamethasone, which is a steroidal anti-inflammatory drug.

Xylene induced ear edema is a skin induced acute inflammation model, suitable for the evaluation of both topically and systemically administered substances of plant origin, and used to detect phospholipase A2 inhibiting anti-phlogistic compounds (Akindele and Adeyemi, 2007; Bribi et al., 2016; Gábor, 2003). Thus, the observed activity suggests an anti-phlogistic effect that may be credited to the capacity of our fractions to inhibit the Phospholipase A2. Many bioactive

compounds may act as phospholipase A2 inhibitors, such as polyphenols (Silva et al., 2009) and triterpenoids (Atta-ur-Rahman, 2000). In this study, the presence of different classes of polyphenolic compounds and triterpenoids at considerable amounts in the tested fractions has been proved. Consequently, the action of RM-EA and RM-B could be attributed to their content of phenolic compounds, such as quercetin, kaempferol, myricetin, hesperidin and rutin, all present in the tested fractions (Silva et al., 2009). Studies on methanolic extract of *Ranunculus sceleratus* confirmed the presence of phospholipase A2 inhibitors (Prieto et al., 2003). In the same study ethyl acetate and n-butanol fractions also reduced the ear edema even when induced by another irritant (TPA). The effect of the fractions may also result from inhibition

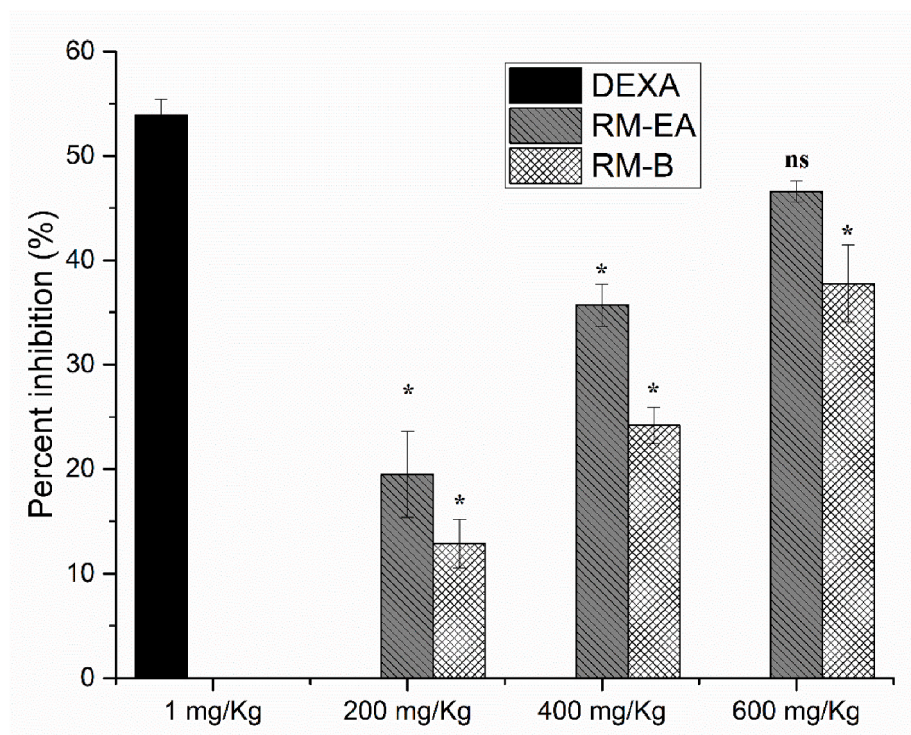


Fig. 3. Effect of ethyl acetate (RM-EA) and n-butanol fraction (RM-B) (200, 400, 600 mg/kg bw) and dexamethasone (Dexa) (1 mg/kg) on the inhibition of xylene induced ear edema. Values are presented as the mean $\pm$ SEM ($n = 7$). * indicate statistically significant differences compared with Dexamethasone (p -value < 0.05).

of other pro-inflammatory mediators present in the inflammation site, but the exact mechanism of action is yet to be studied.

4. Conclusions

For the first time a scientific evidence of the skin anti-inflammatory effect of ethyl acetate and *n*-butanol fractions from *Ranunculus macrophyllus* Desf. is reported using *in-vitro* and *in-vivo* models. *R. macrophyllus* Desf. was found to be a rich source of phenolic compounds like kaempferol, quercetin, myricetin and rutin. Ethyl acetate and *n*-butanol fractions showed excellent antioxidant activity. Both fractions effectively inhibited hypotonic and heat induced hemolysis showing a NSAIDs-like anti-inflammatory effect. They were also able to reduce skin edema chemically induced in the ear of mice. The provided data support the wide spread use of *R. macrophyllus* Desf. as treatment for some skin disorders. The relative safety of *R. macrophyllus* Desf. combined with its anti-inflammatory activity make its use for the development of new anti-inflammatory agents an interesting option.

Funding

This work was supported by the Community of Madrid/FEDER program [S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM] and the Ministry of Economy and Competitiveness [project CTQ 2017-83569-C2-1-R].

Author's contribution

Study conception and design: N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, Y. Madrid, F. Bedjou. Acquisition of data: A. Deghima, N. Righi, E. Gómez-Mejía, F. Baali. Analysis and interpretation of data: A. Deghima, N. Righi, M. E. León-González, F. Baali. Drafting of manuscript: A. Deghima, N. Righi. Critical revision: A. Deghima, N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, Y. Madrid, F. Bedjou. Supervision: Noelia Rosales-Conrado, María Eugenia León-González, Yolanda Madrid, Fatiha Bedjou.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Boudjelal (Nature and Life Science Department, University of Msila) and Dr. Bouadam (Department of physico-chemical Biology, University of Bejaia) for the identification of the plant material. We also thank Pr. Boukharouba (Nature and Life Science Department, university of Biskra) for the proof read of the manuscript. We are grateful for Pr. Ali Benouadah (Department of Biological Sciences, University of Bordj Bou Arreridj) for hosting us in his laboratory to accomplish part of this research.

References

- Akindele, A.J., Adeyemi, O.O., 2007. Anti-inflammatory activity of the aqueous leaf extract of *Byrsocarpus coccineus*. *Fitoterapia* 78, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.09.002>.
- Akkol, E.K., Süntar, I., Erdogan, T.F., Keles, H., Gonenc, T.M., Kivcak, B., 2012. Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: a comparative study. *J. Ethnopharmacol.* 139, 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.037>.
- Almeida, I.F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Amaral, M.H., Bahia, M.F., 2008. *In vivo* skin irritation potential of a *Castanea sativa* (chestnut) leaf extract, a putative natural antioxidant for topical application. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 461–467. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00301.x>.
- Ashraf, A., Bhatti, I.A., Sultana, B., Jamil, A., 2016. Study of variations in the extraction yield, phenolic contents and antioxidant activities of the bark of *F. religiosa* as a function of extraction procedure. *J. Basic Appl. Sci.* 12, 8–13.
- Aslam, M.S., Choudhary, B.A., Uzair, M., Ijaz, A.S., 2012. The genus *Ranunculus*: a phytochemical and ethnopharmacological review. *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 4, 15–22.
- Atta-ur-Rahman, 2000. *Bioactive Natural Products (Part C), Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Amsterdam.
- Bickers, D.R., Athar, M., 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2565–2575. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700340>.
- Bribi, N., Belmouhoub, M., Maiza, F., 2016. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract of *Fumaria capreolata*. *Phytotherapie* 15, 211–216. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1035-6>.

- Brown, J.H., Mackey, H.K., Riggil, D.A., 1967. A novel *in vitro* assay for anti-inflammatory agents based on stabilization of erythrocytes. *Exp. Biol. Med.* 125, 837–843. <https://doi.org/10.3181/00379727-125-32219>.
- Chang, C.L., Lin, C.S., Lai, G.H., 2012. Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. Evidence-based complement. *Alternative Med.*, 984295 <https://doi.org/10.1155/2012/984295>, 8 pages.
- Deghima, A., Righi, N., Rosales-Conrado, N., Leon-Gonzalez, M.E., Gomez-Mejia, E., Madrid, Y., Baali, F., Bedjoua, F., 2020. Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. Roots: quantification, identification and antioxidant activity. *South Afr. J. Bot.* 132, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.036>.
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N.A., 2017. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arab. J. Chem.* 10, 1193–1199. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.015>.
- Dharmappa, K.K., 2016. Phospholipase A2 Inhibitors as Anti-inflammatory Molecules. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrücken.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>.
- Gábor, M., 2003. Models of acute inflammation in the ear. In: *Methods in Molecular Biology*, pp. 129–137. <https://doi.org/10.1385/1-59259-374-7:129>.
- Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., Madrid-Albarrán, Y., 2019. Citrus peels waste as a source of value-added compounds: extraction and quantification of bioactive polyphenols. *Food Chem.* 295, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.136>.
- Gowda, S., Desai, P.B., Hull, V.V., Math, A.A.K., Sonal, N., 2009. A review on laboratory function tests. *Pan Afr. Med. J.* 3, 17.
- Hachelaf, A., Zellagui, A., Touil, A., 2013. Chemical composition and analysis of antifungal properties of *Ranunculus Arvensis*. *Pharmacophore* 4, 89–91.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.* 26, 809–812. <https://doi.org/10.1021/jf60218a027>.
- Katiyar, S.K., Elmets, C.A., Agarwal, R., Mukhtar, H., 1995. Protection against ultraviolet-B radiation-induced local and systemic suppression of contact hypersensitivity and edema responses in C3H/He mice by green tea polyphenols. *Photochem. Photobiol.* 62, 855–861. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb09147.x>.
- Kaya, G., Somer, N., Ünver, Konyalıoğlu, S., Yalçın, H., tansel, Yavaşoğlu, N.Ü. karabay, Sarıkaya, B., Ötür, M. ali, 2010. Antioxidant and antibacterial activities of *Ranunculus marginatus* var. *trachycarpus* and *R. sprunerianus*. *Turk. J. Biol.* 34, 139–146. <https://doi.org/10.3906/biy-0809-13>.
- Khan, M.Z., Jan, S., Khan, F.U., Noor, W., Khan, Y.M., Shah, A., Chaudhary, M.I., Ali, F., Khan, K., Ullah, W., Sabill, N., 2017. Phytochemical screening and biological activities of *Ranunculus arvensis*. *Int. J. Biosci.* 11, 15–21. <https://doi.org/10.12692/ijb/11.1.15-21>.
- Kruk, J., Duchnik, E., 2014. Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 15, 561–568. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.2.561>.
- Kumaran, A., Karunakaran, R.J., 2007. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)* 40, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.011>.
- León-González, M.E., Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., Madrid-Albarrán, Y., 2018. Residual brewing yeast as a source of polyphenols: extraction, identification and quantification by chromatographic and chemometric tools. *Food Chem.* 267, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.141>.
- Murugesan, S., Venkateswaran, M.R., Jayabal, S., Periyasamy, S., 2020. Evaluation of the antioxidant and anti-arthritis potential of *Zingiber officinale* Rosc. by *in vitro* and *in silico* analysis. *South Afr. J. Bot.* 130, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.019>.
- OECD, (OECD), O. for E.C. and D., 2011. Guidelines for the Testing of Chemicals. *Acute Oral Toxicity - AcuteToxic Class Method, Test No. 423*.
- Otuki, M.F., Cabrini, D.A., Moresco, H.H., Imazu, P., Silva, C.D. Da, Pietrovski, E.F., Mendes, D.A.G.B., Prudente, A.D.S., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M.C., 2011. Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola* L. in mice. Evidence-based Complement. *Alternative Med.*, 908059 <https://doi.org/10.1093/ecam/nej026>, 7 pages.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* 44, 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>.
- Oyetakinwhite, P., Tribout, H., Baron, E., 2012. Protective mechanisms of green tea polyphenols in skin. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/560682>.
- Parrish, J.A., 1982. The Science of Photomedicine, PHOTOBIOLOGY. Plenum Press, New York.
- Pawlikowska-Pawlega, B., Gruszecki, W., Misiak, L., Gawron, A., 2003. The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochem. Pharmacol.* 66, 605–612.
- Prieto, J.M., Recio, M.C., Giner, R.M., Máñez, S., Ríos, J.L., 2003. Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. *J. Ethnopharmacol.* 89, 131–137. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00271-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00271-X).
- Prieto, J.M., Recio, M.C., Giner, R.M., Schinella, G.R., Máñez, S., Ríos, J.L., 2008. *In vitro* and *in vivo* effects of *Ranunculus peltatus* subsp. *Baudotii* methanol extract on models of eicosanoid production and contact dermatitis. *Phyther. Res.* 22, 297–302. <https://doi.org/10.1002/ptr.2309>.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
- Rai, M., Acharya, D., Ríos, J.L., 2011. Ethnomedicinal Plants: Revitalization of Traditional Knowledge of Herbs. CRC press.
- Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M., 2013. Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Righi, N., Boumerfeg, S., Fernandes, P.A.R., Deghima, A., Baali, F., Coelho, E., Cardoso, S.M., Coimbra, M.A., Baghiani, A., 2020. *Thymus algeriensis* Bioss & Reut : relationship of phenolic compounds composition with *in vitro/in vivo* antioxidant and antibacterial activity. *Food Res. Int.* 136, 109500. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109500>.
- Russo, G., 2000. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and topical anti-inflammatory agents. In: Millikan, L.E. (Ed.), *Drug Therapy in Dermatology*. Marel dekker, New York, ISBN 9780429208003, p. 103. <https://doi.org/10.1201/b14006>.
- Seeman, P., Weinstein, J., 1966. Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. *Biochem. Pharmacol.* 15, 1737–1752. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(66\)90081-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(66)90081-5).
- Shahid, S., Riaz, T., Asghar, M.N., 2015. Screening of *Ranunculus sceleratus* for enzyme inhibition, antibacterial and antioxidant activities. *Bangladesh J. Pharmacol.* 10, 436–442. <https://doi.org/10.3329/bjp.v10i2.22805>.
- Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X., Li, P., 2010. Antioxidant activity *in vitro* of the selenium-contained protein from the Se-enriched *Bifidobacterium animalis* 01. *Anaerobe* 16, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.006>.
- Shinde, U.A., Phadke, A.S., Nair, A.M., Mungantiwar, A.A., Dikshit, V.J., Saraf, M.N., 1999. Membrane stabilizing activity: a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia* 70, 251–257. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00030-1).
- Siddhuraju, P., Becker, K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2144–2155. <https://doi.org/10.1021/jf020444+>.
- Silva, S.L., da Calgarotto, A.K., Maso, V., Damico, D.C.S., Baldasso, P., Veber, C.L., Villar, J.A.F.P., Oliveira, A.R.M., Jr, M.C., Oliveira, K.M.T., Marangoni, S., 2009. Molecular modeling and inhibition of phospholipase A2 by polyhydroxy phenolic compounds. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.02.043>.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, I., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4267–4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.* 90, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.013>.
- Trouba, K.J., Hamadeh, H.K., Amin, R.P., Germolec, D.R., 2002. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxidants Redox Signal.* 4, 665–673. <https://doi.org/10.1089/15230860260220175>.
- Turner, N.J., 1984. Counter-irritant and other medicinal uses of plants in *Ranunculaceae* by native peoples in British Columbia and Neighbouring areas. *J. Ethnopharmacol.* 11, 181–201. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(84\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(84)90038-2).
- Xu, Q., Wang, Yubo, Guo, S., Shen, Z., Wang, Yanping, Limei Yang, A. B., 2014. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. *J. Ethnopharmacol.* 152, 540–545. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.037>.
- Yesmin, R., Karmakar, P.C., Ali, H., Biswas, K.K., 2017. Membrane stabilizing and thrombolytic activities of methanolic extract of *Trichosanthes dioica* Roxb. *Shoot. J. Pharmacogn. Phytochem.* 6, 2500–2502.



Valorisation of the Green Waste Parts from Large-Leaved Buttercup (*Ranunculus macrophyllus* Desf.): Phenolic Profile and Health Promoting Effects Study

Amirouche Deghima^{1,2} · Nadjat Righi³ · Noelia Rosales-Conrado⁴ · María Eugenia León-González⁴ · Faiza Baali³ · Esther Gómez-Mejía⁴ · Yolanda Madrid⁴ · Fatiha Bedjou¹

Received: 22 July 2020 / Accepted: 12 November 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Purpose Due to the extensive use of *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots for medicinal purposes, most of the leafy green parts are just wasted. The aim of this work is to valorize the leafy green parts and promote their application in different modern industries.

Methods For this purpose, we studied the phenolic profile of *R. macrophyllus* Desf. (RM-B) using chromatographic and spectrophotometric methods and we tested the in-vitro antioxidant activity and the in-vivo effect of RM-B on plasma and liver antioxidant status.

Results RM-B contained high amounts of polyphenols (675 mg GAE/100 g dry weight dw) and flavonoids (105 mg QE/100 g dw). In-vitro, RM-B exhibited promising radical scavenging activity against 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS⁺) (IC₅₀: 247 µg/mL), hydrogen peroxide radicals (IC₅₀: 626 µg/mL) and inhibited oxidative red blood cells hemolysis (IC₅₀: 120 µg/mL), RM-B also showed strong reducing power (982 µM FeSO₄/mg extract). In-vivo, RM-B improved the radical scavenging ability and reducing power of plasma and enhanced liver antioxidant status by increasing catalase and reduced glutathione levels and decreasing malondialdehyde levels without altering the key serum biochemical parameters reflecting liver and kidney functions. Polyphenols identified using capillary LC-DAD and LC-MS/MS analyses like hesperidin (131.2 mg/100 g dw), rutin (29.0 mg/100 g dw) and *p*-coumaric acid (5.8 mg/100 g dw), may be responsible for the health promoting effects of RM-B.

Conclusion We may conclude that *R. macrophyllus* Desf. is a good source of beneficial polyphenols with strong antioxidant, anti-hemolytic and health-promoting effects, which promotes its use in pharmaceutical, medicinal and nutraceutical industries.

✉ Amirouche Deghima
a.deghima@univ-biskra.dz

Nadjat Righi
n.righi@univ-bba.dz

Noelia Rosales-Conrado
noerosales@quim.ucm.es

María Eugenia León-González
leongon@quim.ucm.es

Faiza Baali
Faiza.baali@univ-bba.dz

Esther Gómez-Mejía
egomez03@ucm.es

Yolanda Madrid
ymadrid@quim.ucm.es

Fatiha Bedjou
fatihabedjou2015@gmail.com

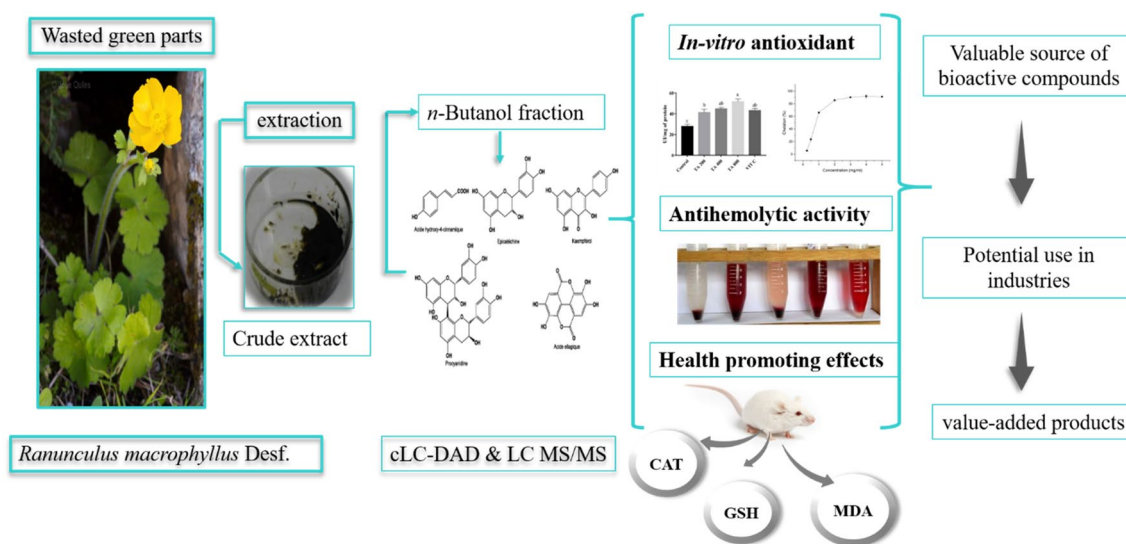
¹ Laboratoire de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria

² Department of Natural Sciences and Life, Faculty of Exact Sciences, Natural and Life Sciences, Mohamed Khider University, 07000 Biskra, Algeria

³ Laboratory of Characterization and Valorization of Natural Resources, University Mohamed El Bachir El Ibrahimi, 34000 Bordj Bou-Arreridj, Algeria

⁴ Departamento de Química Analítica, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Graphic Abstract



Keywords Raw material · Medicinal plants waste · Antioxidant · Polyphenols · Catalase · Lipid peroxidation

Statement of Novelty

The leafy green parts of *Ranunculus macrophyllus* Desf. are a wasted raw material generated by the use of the roots for medicinal purposes. Their inappropriate management (burned or buried) may have negative effects on the environment and on human life. In the absence of proper management of waste of this plant, we study for the first time their valorization as a source of natural bioactive compounds with health-promoting effects to increase their appeal to consumers and promote their application in modern industries (food, nutraceuticals and pharmaceuticals industries) in the aim of developing new value-added products.

Introduction

Plant-derived functional foods are attracting increasing interest owing to their safety and medicinal properties [1]. The health promoting effects of plant-derived foods are mostly related to the presence of phenolic compounds [2]. They are the most abundant antioxidants in human food and a high intake of these compounds is a biomarker of healthy diet [2]. Polyphenols are endowed with a wide range of bioactivities including, antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinoma, antimicrobial, antiviral, and cardioprotective effects [3]. In addition to disease prevention, polyphenols also affect disease propagation, progression and even contribute to the healing process [4]. Consequently, boosting the content of

natural phenolic compounds in the human diet is indeed an effective method for promoting public health [5].

Ranunculus is the most diverse genus of the family Ranunculaceae, with more than 600 species [6] that can be found all over the world and especially in the Mediterranean temperate regions. Many species from this genus are of economic importance, whether for their horticultural value (*Ranunculus asiaticus*, *Ranunculus lyallii*) [7], or for their use as folk food in Mediterranean regions (*Ranunculus repens* and *Ranunculus ficaria*) [8]. However, the main use of *Ranunculus* species remains for their medicinal properties, that include antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory, hepatoprotective and anticancer activities [6]. Several studies related these activities to phenolic compounds produced by *Ranunculus* species such as caffeic acid, kaempferol, myricetin, rutin, quercetin and gallic acid [9–11].

One of the less studied *Ranunculus* species is *Ranunculus macrophyllus* Desf. The roots of *R. macrophyllus* Desf. are a rich source of bioactive phenolic compounds [11], they are commonly available in the markets of north Africa (Algeria, Morocco and Tunisia) as remedy for feminine infertility and to gain weight [12]. On the other hand, the green leafy parts (leaves and stems) remain unexploited, they are traditionally used for their medicinal properties to treat certain skin diseases [13], and as folk food in the Mediterranean region [14]. Despite the availability and wide spread use of the roots, the use of the leafy parts of *R. macrophyllus* Desf. remains very limited and most of them are just wasted. We think that providing scientific data on their phenolic profile and bioactivities will lead to their valorisation and

encourage their application in pharmaceutical, medicinal and nutraceutical industries in the aim of developing new functional products. In this context, we determined for the first time the bioactive constituents of *R. macrophyllus* Desf. and their health promoting effects. Spectrophotometric and chromatographic methods were used for the estimation of phenolic compounds, while in-vitro models were used to study the antioxidant and antihemolytic activities of *R. macrophyllus* Desf. Furthermore, its safety and ability to enhance plasma and liver antioxidant system were studied using in-vivo models.

Materials and Methods

Chemicals

All chemicals and solvents were of analytical grade, and purified water from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used. For LC–MS/MS analysis, methanol, water and formic acid were of Optima™ LC/MS grade (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH) of HPLC quality were provided by Scharlab (Barcelona, Spain). Hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate, hydrogen peroxide, disodium hydrogen phosphate, sodium phosphate monobasic dihydrate, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), potassium chloride, sodium chloride, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), sodium acetate, acetic acid, ferric chloride, ferrous sulphate heptahydrate, ferrozine, ferrous chloride, EDTA, butylated hydroxyanisole (BHA), ascorbic acid (vitamin C) and trifluoroacetic acid (TFA, 99%), were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Plant Material and Sample Preparation

The aerial flowering parts of *Ranunculus macrophyllus* Desf. have been harvested from the prairies of Ras El Oued—Bordj Bou Arreridj region North-East Algeria in May 2018. The plant was identified by Dr. Bouadam from the department of Physico-Chemical Biology of the University of Bejaia and a voucher specimen (AB-108) has been deposited at the herbarium of the Life and Natural Science department, M'sila University. The plant was air dried for 1 month and then powdered with an electric blender and stored in air sealed containers in the dark at room temperature.

Extraction and Fractionation

The extraction and fractionation of the plant powder were conducted according to Prieto et al., (2003) [15]. An amount

of 100 g of *R. macrophyllus* Desf. powder was macerated with 500 mL of methanol under continuous shaking for 24 h, then filtered. The remaining residue was subjected to maceration for 2 additional times. The filtrates of the three macerations were combined and methanol was completely removed by rotary evaporator at 40 °C under low pressure. The obtained crude methanolic extract was resuspended in hydromethanolic solution (10%, w/w) and subjected to fractionation with solvents of increasing polarities including n-hexane, chloroform and n-butanol. The solvents were completely removed under vacuum using rotary evaporator at 40 °C and butanolic fraction (RM-B) was used for in-vitro and in-vivo studies.

Total Polyphenols and Flavonoids Content

The total phenolic content of RM-B was determined using the Folin-ciocalteu assay [16], with a calibration curve prepared using gallic acid as standard and the results were expressed as mg gallic acid equivalents/100 g dry weight of *R. macrophyllus* Desf. (mg GAE/100 g dw). Total flavonoids were evaluated using the aluminium trichloride method [17], and quercetin was used to elaborate a calibration curve, the results were expressed as mg quercetin equivalent/100 g dry weight of *R. macrophyllus* Desf. (mg QE/100 g dw).

Chromatographic Analysis

Capillary LC-DAD

Phenolic compounds in the butanolic fraction were analyzed following the conditions described by Gómez-Mejía et al., (2019) [18] using reversed-phase high-performance liquid chromatography, with an Agilent cLC instrument Mod. 1100 Series (Agilent Technologies, Madrid, Spain), equipped with a G1376A binary capillary pump, a G1379A degasser and a G1315B diode array detector (500 nL, 10 mm pathlength). The separation was performed on a Synergi™ Fusion 4 µm C18 (150 mm × 0.3 mm I.D.) capillary analytical column supplied by Phenomenex (Torrance, CA, USA) and maintained at room temperature. Data acquisition and analysis were made using the Agilent Chemstation software package for Microsoft Windows. An external stainless-steel loop with a volume of 10 µL was placed into a Rheodyne® injection valve. Absorbances were measured using a diode array HP8543 UV/Vis spectrophotometer (Agilent Technologies), connected to HP Chemstation software.

A mixture of acetonitrile (A) and aqueous solution 0.1% (v) TFA at pH 3.2 (B), was used as mobile phase at a flow rate of 10 µL/min. The gradient composition was 8% A for 3 min, followed by a linear increase to 34% A during 11 min, an isocratic step at 34% A for 7 min, and then a

linear decrease to 8% A, which was maintained until the end of the analysis.

The wavelengths used for the detection were 220, 260, 292, 310 and 365 nm. The identification of different polyphenols was made on the basis of their retention times and UV absorption. Quantitative analyses were performed at 292 nm for gallic acid, naringin and hesperidin, 310 nm for *p*-coumaric acid, *trans*-ferulic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and resveratrol, and 365 nm for rutin, quercetin, myricetin and kaempferol, using their respective calibration curves. Linearity range was, 10–310 µg/L for gallic acid, 10–75 µg/L for 3,4-dihydroxybenzoic acid, 40–400 µg/L for chlorogenic acid, 20–400 µg/L for *p*-coumaric acid and 15–200 µg/L for *trans*-ferulic acid, 30–200 µg/L for rutin, 15–60 µg/L for naringin, 10–60 µg/L for resveratrol, 5–60 µg/L for quercetin, 12–60 µg/L for kaempferol and 100–500 µg/L for hesperidin. Linearity was evaluated in terms of the squared correlation coefficients (R^2). R^2 -values were higher than 0.95 for all calibration curves. For on-column focusing purposes, all injection solutions were prepared in 0.1% (v) TFA aqueous solution adjusted at pH 3.2, containing 1% (v) of pure acetonitrile.

LC–MS/MS Analysis

Capillary LC–DAD data were corroborated by LC–MS/MS in negative electrospray ionization (ESI) mode, using a Shimadzu LC–MS–8030 triple quadrupole system (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA) equipped with a Nexera LC–30AD solvent delivery unit, a Nexera SIL–30AC autosampler with temperature-controlled tray, and a CTO–20AC column oven. Compounds were separated on a Synergi™ C18 Fusion–RP 80 Å analytical column from Phenomenex (150 × 3 mm I.D., 4 µm) at room temperature. Data were acquired and processed with the LabSolutions LC–MS software provided by Shimadzu. The MS/MS equipment used nitrogen as both nebulizing (1.5 L/min) and drying (15.0 L/min) gas. Fragmentation was performed using argon as the collision gas at a pressure of 230 kPa in the collision cell, and the collision energy voltages applied were in the range 10–55 eV. ESI for ionization voltage was set at –4.5 kV. The interface current was fixed at 6.2 µA, and the detector voltage at 1.84 kV.

A gradient of methanol (solvent A) and 0.2% (v) formic acid aqueous solution (solvent B) was used for the separation in the following ratios: 5% solvent A maintained for 0.1 min, linear increase to 40% A within 25 min, and to 70% A within another 10 min. This condition was held for 2 min, then changed to the initial conditions (5% A) within 1 min and equilibrated for 2 min. The flow rate was 0.50 mL/min. For the injection; 40 µL of plant extracts were mixed with 2.5 mL of methanol containing 0.2% (v) formic acid then diluted to 5 mL with LC/MS grade water. A volume of 20 µL

of this mixture was injected into the chromatograph. Before injection, all samples were filtered through PTFE syringe filters (0.22 µm pore size) from Membrane Solutions (Kent, WA, USA) [18].

For quantification purposes, calibration curves were performed using external calibrations. Linearity range was 30–130 µg/L for gallic acid, 10–80 µg/L for dihydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, hesperidin, caffeic acid and resveratrol, 10–100 µg/L for chlorogenic acid, 20–80 µg/L for *trans*-ferulic acid and kaempferol, 20–100 µg/L for naringin and rutin, 5–50 µg/L for quercetin and myricetin, and 15–130 µg/L for catechin.

In-Vitro Antioxidant Activity

The radical scavenging effect of RM-B was assessed against ABTS^{•+} [19], hydrogen peroxide [20] and peroxy radicals generated by AAPH [21]. Gallic acid, Vitamin C (Vit C) and BHA were used as standards. Radical inhibition was calculated using the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{A_c - A_s}{A_c} \right) \times 100 \quad (1)$$

where “ A_s ” is the absorbance of samples and “ A_c ” is the absorbance of control (all reagent without samples). The obtained inhibitions were plotted against sample concentrations and the resulting curves were used to calculate the IC₅₀ (Concentration of the sample that reduces 50% of free radicals) and the results were expressed in µg/mL. Lower IC₅₀ values means better antioxidant activity. The ability of RM-B to bind iron ions was estimated using iron chelating assay [22]. Chelating activity was calculated using Eq. 1. The IC₅₀ was calculated and results were compared to a standard iron chelating agent (EDTA). Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was performed as described by Pulido et al., (2000) [23] and was used to estimate the iron reducing ability of RM-B, results were expressed as µmol FeSO₄·7H₂O/mg extract. Both, Vit C, gallic acid and BHA were used as reference drugs.

In-Vivo Health Promoting Effects and Safety

Animals

NMRI male SWISS Albino mice weighting 20–25 ± 2 g were bought from Pasteur institute Algiers (Algeria). Mice were kept in an animal holding room in standard conditions (temperature 25 ± 3 °C and humidity 50 ± 10%) under 12-h light/12-h dark cycle. Mice were fed standard diet and water ad libitum, they were acclimated for at least 10 days before any testing and fasted 12 h before any treatment. All experiments were conducted in strict compliance with internationally accepted principles for laboratory animals (directive

N° 2010/63/EU of 22 September 2010 which updates and replaces directive N° 86/609/EEC of 24 November 1986). These studies were approved by the ethical committee at the department of Nature and Life Sciences at the university of Biskra on 21th April 2019 under the number 279/2019.

Experimental Design

The effect of RM-B repeated oral administration on plasma and liver antioxidant capacity and its safety on liver and kidney was studied [24]. Mice were randomly divided into five groups ($n=8$), Groups 1, 2 and 3 were orally given the extract at 50, 100 and 200 mg/kg body weight (bw), while group 4 served as positive control and was given Vit C (100 mg/kg bw) and finally, the group 5 that served as negative control was given the vehicle (Tween 80 at 5%). The extract, Vit C and vehicle were given orally once a day during 21 consecutive days using stainless-steel curved feeding needle.

At the end of the 21-day period, mice were fasted for 12 h and then decapitated. Blood was collected in heparinized tubes then centrifuged at $3000\times g$ for 10 min. Plasma was carefully collected and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. One part of the plasma was used to study the antioxidant capacity using both DPPH scavenging and FRAP assays, and the other part was used to analyze the biochemical parameters: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), urea and creatinine using commercially available kits (Spinreact, Spain). Livers were homogenized in ice cold KCl (1.15%) to prepare 10% (w/v) homogenate. Then, the homogenate was centrifuged twice at $3000\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, supernatant was collected and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to evaluate the levels of malondialdehyde (MDA) and the levels of antioxidant defense systems (Catalase (CAT) and reduced glutathione(GSH)).

Plasma Antioxidant Capacity

The plasma antioxidant capacity was estimated using both DPPH $^{\cdot}$ and FRAP assays. The DPPH $^{\cdot}$ assay was performed according to Cuendet et al., 1997 [25] and the inhibition was calculated by Eq. (1) (section ‘[In-Vitro Antioxidant Activity](#)’). The FRAP assay was performed by the same in-vitro method described in section (‘[In-Vitro Antioxidant Activity](#)’) and the results were expressed as $\mu\text{M FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ equivalents/mL.

Antioxidant Status in Liver Tissue

The obtained liver supernatants were used to estimate antioxidant status in liver tissue by measuring CAT activity [26], CAT activity was calculated using the extinction coefficient $43.6\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 240 nm and expressed as UI/mg proteins.

The GSH level was determined according to the method of Ellman, (1959) [27], and the amount of GSH present in the tissue was calculated using its extinction coefficient ($1.36\times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 412 nm) and expressed as nmol/g tissue. Finally, the extent of lipid peroxidation in liver tissue was estimated by measuring malondialdehyde (MDA) [28]. The MDA level was calculated using its extinction coefficient ($1.56\times 10^5\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 530 nm) and expressed as nmol MDA/g tissue.

Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate and data were analyzed using the software OriginPro 9.3. The results were expressed as mean values and standard deviation (SD) or standard error of mean values (SEM). The differences between our sample and positive controls were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey’s significant difference post hoc test with $\alpha=0.05$.

Results

Identification of Bioactive Compounds

The crude methanolic extract obtained by maceration of *R. macrophyllus* Desf. was subjected to liquid–liquid separation using solvents of increasing polarities. Hexane and chloroform were used to remove fats and pigments while *n*-butanol was used to extract phenolic compounds. *n*-butanol accounted for 12.03% from the crude methanolic extract. The spectrophotometric estimation revealed excellent amounts of total phenolic compounds ($675.8\pm 19.4\text{ mg GAE}/100\text{ g dw}$) and flavonoids ($105.1\pm 4.8\text{ mg QE}/100\text{ g dry weight}$). Both capillary LC-DAD and LC–MS/MS were used to study the phenolic profile of RM-B. In total, 8 phenolic compounds were identified and quantified (Table 1). The analysis revealed the presence of high amounts of hesperidin ($131.2\pm 2.4\text{ mg}/100\text{ g dry weight dw}$) and rutin ($29.0\pm 2.6\text{ mg}/100\text{ g dw}$). Phenolic acids were also present in considerable amounts ranging from 2.4 for *trans*-ferulic acid, to $5.8\text{ mg}/100\text{ g dw}$ for *p*-coumaric acid. Caffeic acid, gallic acid, chlorogenic acid and resveratrol were detected at lower amounts between 0.6 and $4.7\text{ mg}/100\text{ g dw}$.

The LC–MS/MS analysis was performed to corroborate the identity of the polyphenols detected by capillary liquid chromatography with UV detection. Chlorogenic acid was confirmed and quantified at a comparable amount to that estimated by cLC-DAD. Caffeic acid, rutin and hesperidin, gallic acid, *p*-coumaric acid, *trans*-ferulic acid and resveratrol were also confirmed, but they were determined at concentration levels of the method detection limit, despite their high concentration levels obtained from cLC-DAD

Table 1 Optimized conditions for the cLC-DAD and LC-MS/MS analysis of phenolic compounds from *R. macrophyllus* Dsf. butanolic fraction: identification and quantification results

Compound	cLC-DAD			LC-MS/MS					
	Rt (min)	UV ^a (nm)	Extracted amount (mg/100 g DW)	Rt (min)	Precursor Ion, m/z [M – H] [–]	Quantification transition	Confirmation transitions		Extracted amount (mg/100 g DW)
						Product ion I, m/z (Ce, eV) ^b	Product ion II, m/z (Ce, eV) ^b	Product ion III, m/z (Ce, eV) ^b	
Gallic acid	2.90	292	4.7 ± 0.3	6.25	169.00	125.10 (19)	79.05 (23)	53.10 (20)	LOD ^c
Chlorogenic acid	5.62	260	3.4 ± 1.3	16.76	353.10	191.05 (16)	85.10 (44)	93.1 (42)	1.48 ± 0.0
Caffeic acid	8.71	310	3.4 ± 0.3	18.07	179.00	135.05 (18)	134.00 (30)	89.05 (34)	LOD
<i>p</i> -Coumaric acid	10.21	310	5.8 ± 0.8	23.00	163.00	119.05 (17)	93.05 (31)	117.10 (34)	LOD
<i>trans</i> -Ferulic acid	11.16	310	2.4 ± 0.0	23.98	193.20	134.00 (18)	178.00 (17)	149.10 (15)	LOD
Rutin	13.72	365	29.0 ± 2.6	28.47	609.00	300.10 (42)	300.95 (33)	271.05 (45)	LOD
Hesperidin	14.39	292	131.2 ± 2.4	27.56	609.10	301.15 (23)	286.15 (48)	164.05 (55)	LOD
Resveratrol	15.40	310	0.6 ± 0.2	30.71	227.10	143.10 (25)	113.00 (10)	69.10 (21)	LOD

^aWavelength used for quantification^bCollision energy, electron Volt^cLOD determined at the levels of the method detection limit, *Rt* retention time, *DW* dry weight

determination. This could be attributed to a matrix effect; in fact, organic and non-volatile matrix components can affect the response of the analytes during the LC-MS analysis, leading to a reduction of ion signals [29].

In-Vitro Antioxidant Activity

The antioxidant activity of a sample is linked to the assays being used. Thus, various purpose-oriented methods were used to reveal the full antioxidant potential of RM-B. For instance, RM-B was tested against radical, non-radical and peroxyl reactive species, chelating and reducing iron ions and inhibiting lipid peroxidation and the results are summarized in Table 2. RM-B showed good radical

scavenging activity against the ABTS^{•+} radical in a dose dependent manner, but it was less active against H₂O₂, yet, the effect was still dose dependent. The radical scavenging ability of RM-B was significantly lower than that of the reference compounds BHA, Vit C and gallic acid. RM-B efficiently protected mice red blood cells (RBC) from oxidative hemolysis induced by the peroxyl radicals. The obtained effect was lower than the effect of gallic acid, BHA and Vit C (Table 2). The results in Table 2 reveal also the excellent reducing power of RM-B that was able to reduce the Fe³⁺-TPTZ to Fe²⁺-TPTZ with a FRAP value higher than that of BHA, similar to that of Vit C and lower than that of gallic acid. Nevertheless, the RM-B had weak ability to bind iron ions (Fe²⁺) and

Table 2 In-vitro antioxidant activity of *R. macrophyllus* Dsf. butanolic fraction

	ABTS IC50 (μg/mL)	H ₂ O ₂	AAPH	Iron chelation	FRAP μM FeSO ₄ /mg extract
RM-B	247 ^c ±11	626 ^d ±14	120 ^b ±10	2069.3 ^b ±0.3	982 ^b ±5
Vit C	57 ^b ±0.2	116 ^b ±3	38 ^a ±3	—	931 ^b ±18
BHA	41.1 ^a ±0.8	81 ^a ±3	28.4 ^a ±0.8	—	803 ^c ±2
GA	59 ^b ±4	279 ^c ±8	27 ^a ±1	—	1960 ^a ±35
EDTA	—	—	—	23 ^a ±1	—

Results are expressed as mean±SD of three replicates. Numbers on the same column with different superscript letters indicate significant differences at *p*-value < 0.05

RM-B *Ranunculus macrophyllus*-Butanolic fraction, *Vit C* vitamin C, *BHA* butylated hydroxyanisole, *GA* gallic acid, *EDTA* ethylenediaminetetraacetic acid, *ABTS* 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, *H₂O₂* hydrogen peroxide, *AAPH* 2,2'-(diazene-1,2-diyl)bis(2-methylpropanimidamide) dihydrochloride, *FRAP* ferric reducing antioxidant power

prevent the formation of ferrozine-Fe²⁺ complex in the iron chelation assay, this effect was lower than EDTA used as standard iron chelating agent.

In Vivo Safety Evaluation and Health Promoting Effect

Serum Biochemical Parameters

The effect of repeated administration of RM-B on liver and kidney was investigated and serum biochemical parameters indicating their functions were determined. Table 3 shows that treating animals daily with RM-B did not affect enzymes activities that reflect liver function (AST, ALT, ALP) compared to non-treated group. The highest dose (200 mg/kg bw) registered the lowest levels of ALT (47 ± 3 U/L) and AST (66 ± 3 U/L). Similarly, no significant changes were observed in kidney parameters (urea and creatinine) compared to non treated group. Vit C treated group registered the highest levels of AST (109 ± 17 U/L) and Creatinine (38 ± 4 mM/L) with the lowest levels of ALP (91 ± 6 U/L), yet, the values were not significantly different from the non-treated group.

Plasma Antioxidant Capacity

The effect of RM-B repeated administration on plasma antioxidant capacity was estimated using DPPH[•] radical scavenging assay and ferric reducing antioxidant power assay (FRAP). The results are illustrated in Fig. 1a, b. As it can be observed, treating mice daily with different doses of RM-B significantly improved plasma antioxidant capacity compared to control group. RM-B increased the radical scavenging ability of plasma in a dose dependent manner to reach $19.9 \pm 0.3\%$ at the highest dose (200 mg/kg bw), this is almost three folds higher than DPPH[•] scavenging ability of non treated group. Vit C treated group registered the highest DPPH[•] scavenging ability ($34 \pm 2\%$ at 100 mg/kg bw).

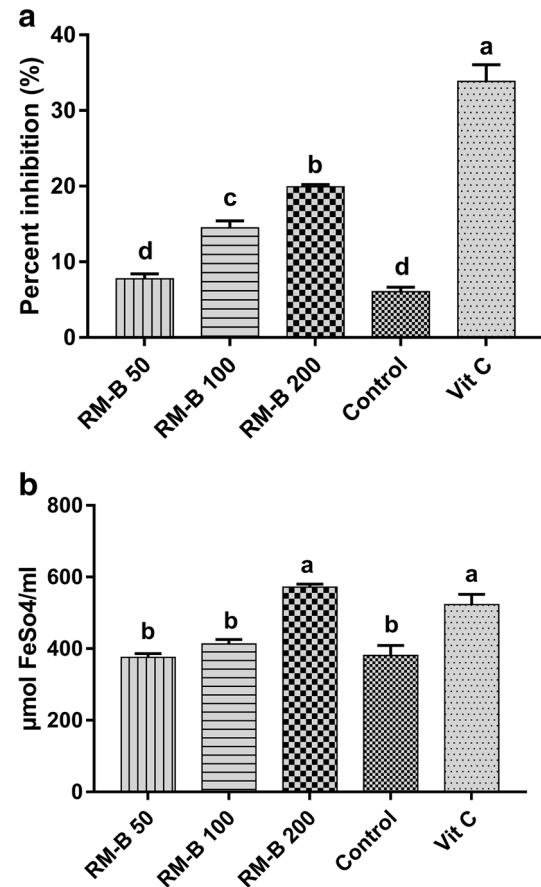


Fig. 1 Effect of the *Ranunculus macrophyllus* Desf. butanolic fraction (50, 100 and 200 mg/kg bw) and vitamin C (100 mg/kg bw) on plasma antioxidant capacity. **a** DPPH radical scavenging assay. **b** Ferric reducing ability of plasma (FRAP). RM-B: *Ranunculus macrophyllus* Desf. butanolic fraction; Vit C: vitamin C. Values are means of triplicates $\pm$ standard deviation (SD). Bars with different letters indicate significant differences (p -value < 0.05)

The increase in FRAP values (Fig. 1b) of the RM-B treated groups was dose dependent, but it was significant only at the highest dose. At this dose, the increase was similar to

Table 3 Effect of *R. macrophyllus* Desf. Butanolic fraction on serum biochemical parameters

	Liver function parameters (U/L)			Kidney function parameters (mM/L)	
	AST	ALT	ALP	Urea	Creatinine
RM-B (50 mg/kg bw)	$94^a \pm 9$	$56^{ab} \pm 5$	$125^b \pm 9$	$5.3^a \pm 0.5$	$33^a \pm 6$
RM-B (100 mg/kg bw)	$97^a \pm 12$	$60^b \pm 4$	$149^b \pm 9$	$6.2^a \pm 0.6$	$25^a \pm 6$
RM-B (200 mg/kg bw)	$66^a \pm 3$	$47^{ab} \pm 3$	$125^b \pm 6$	$6.0^a \pm 0.2$	$22^a \pm 2$
Vit C (100 μg/kg bw)	$109^a \pm 17$	$42^a \pm 4$	$91^a \pm 6$	$7.0^b \pm 0.4$	$38^a \pm 4$
Control	$89^a \pm 10$	$51^{ab} \pm 4$	$141^b \pm 8$	$4.3^a \pm 0.6$	$26^a \pm 2$

Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=8$). Numbers on the same column with different superscript letters indicate significant differences at p -value < 0.05

RM-B *Ranunculus macrophyllus*-Butanolic fraction, AST aspartate aminotransferase, ALT alanin aminotransferase, ALP alkaline phosphatase, Vit C vitamin C

that of Vit C, which indicates the efficiency of RM-B as compared to Vit C.

Liver Antioxidant Status

The in-vivo health promoting effect of RM-B was also determined by estimating hepatic CAT and GSH levels. As Fig. 2a illustrates, the oral administration of RM-B at different doses gradually increased CAT levels to reach a maximum of 44.5 ± 0.9 UI/mg of protein at 200 mg/Kg/day of RM-B. This is almost two times higher than the levels of catalase in non-treated group (25.7 ± 1.7 UI/mg of protein) and similar to that of Vit C (43.0 ± 2.1 UI/mg of protein). A dose dependent increase in GSH levels in the dosed groups was observed, but only treatment with 200 mg/kg bw was significant (53.3 ± 5.8 nmol/g of tissue) compared to non-treated group (28.5 ± 0.7 nmol/g of tissue) (Fig. 2b). The 200 mg/kg bw treated group also showed higher GSH levels than the Vit C treated group (40.8 ± 2.6 nmol/g of tissue). Furthermore, the daily administration of RM-B successfully reduced MDA levels in treated groups compared with control group (26 ± 4 nmol/g tissue) (Fig. 2c). The MDA level was reduced by 50% to reach 13.3 ± 0.8 nmol/g of tissue after treatment with 200 mg/kg bw of RM-B, while for the other doses and Vit C groups the decrease in MDA levels was not significant.

Discussion

Polyphenolic Profile Analysis

The yield of RM-B fraction in this work was slightly lower compared to the same fraction from *R. repens* (18%) [30], and higher than the yield for the same fraction from *R. sceleratus* (2%) [15]. The differences between the yields could be attributed to numerous variables that may affect the yield of extraction. However, when using the same extraction methods, inter-species variation can be explained by genetic and environmental factors [11].

Spectrophotometric determination of bioactive constituents showed the richness of RM-B in total phenolic compounds and flavonoids. Due to the lack of scientific studies on this species, the results were compared to plants from the same genus. Bhatti et al., (2015) [10] reported lower phenolic content in different solvents extracts from *R. arvensis* ranging from 0.48 to 1.43 mg GAE/g extract. Similarly the *n*-butanol fraction from *R. sceleratus* showed lower total phenolic compounds (79 mg GAE/g extract) [31]. On the contrary Kebièche et al., (2011) [30] reported higher total phenolic compounds for the same fraction from *R. repens*. In addition to the extraction method used, the recovered polyphenols amounts depend on the solvent nature and

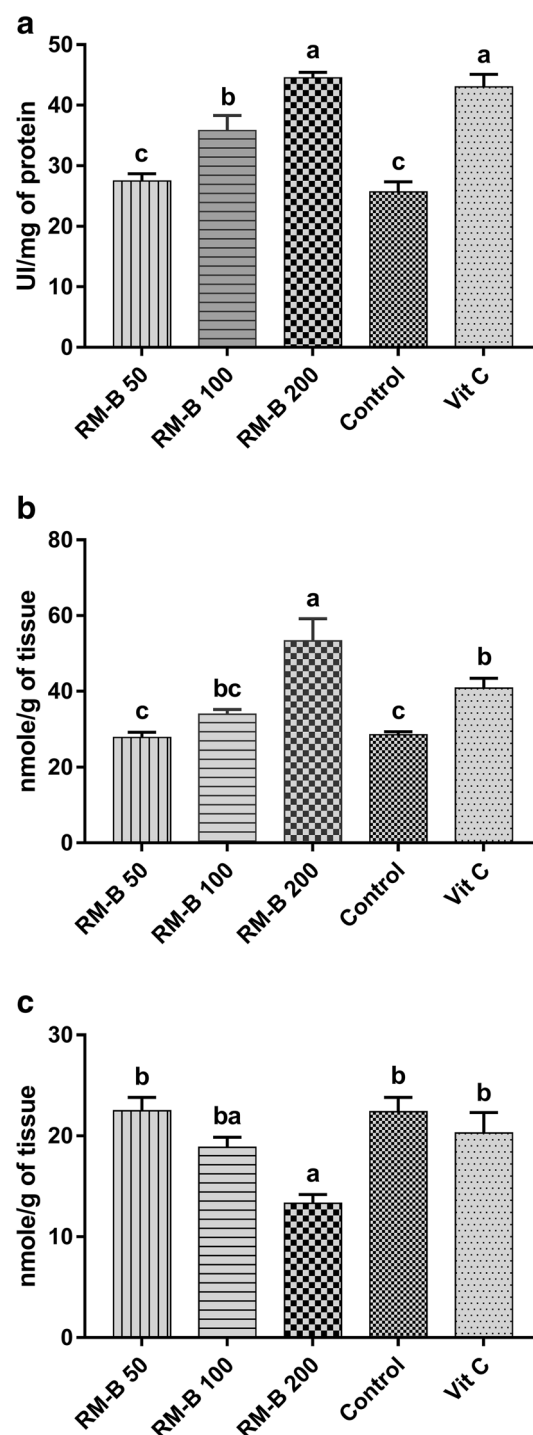


Fig. 2 Effect of *Ranunculus macrophyllus* Desf. butanolic fraction (50, 100, 200 mg/kg bw) and Vitamin C (100 mg/kg bw) on liver antioxidant status. **a** Catalase levels (CAT). **b** Reduced glutathione levels (GSH). **c** Malondialdehyde levels (MDA). RM-B: *Ranunculus macrophyllus* Desf. butanolic fraction; Vit C: vitamin C. Values are means of triplicates $\pm$ standard deviation (SD). Bars with different letters indicate significant differences (p -value < 0.05)

the chemical properties (polarity) of the extracted molecules [32]. Compared to other fruits and vegetables wasted parts, RM-B showed higher total phenolic compounds than beetroot pomace (326.5 mg GAE/100 g dw), carrot waste (37.5 mg GAE/100 g dw), onion waste (305 mg GAE/100 g dw) and apple peels (500–589 mg GAE/100 g dw) [33].

The phenolic compounds were further analysed by a combination of cLC-DAD with LC–MS/MS that provided both qualitative and quantitative information on the phenolic profile of RM-B. The analysis revealed that *R. macrophyllus* Desf. is a valuable source of highly appreciated phenolic compounds. The latter were distributed on different classes of phenolic compounds: flavonoids as flavanone and flavonol glycosides, phenolic acids (hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives) and stilbens, giving a total polyphenols amount of 180.5 ± 8.0 mg/100 g dw and putting *R. macrophyllus* Desf. within the top 50 richest polyphenols food sources [34]. Hesperidin is known as the orange peel glucoside, RM-B contained higher hesperidin amounts than some of its regular sources like *Citrus grandis*, *Fortunella crassifolia* and *Citrus aurantium*, where the amount of hesperidin ranged from 7 to 36 mg/100 g dw only [35]. Likewise, Rutin amount in RM-B expressed as fresh weight (40 mg/kg fw) was higher than it is in many commonly consumed phenolic compounds sources like Apple, Blueberry, Kiwi, Pineapple, Tomato, Eggplant and green onions where the amount of rutin ranged from 1.5 to 27.9 mg/kg fw [36]. We can thus, consider *R. macrophyllus* Desf as an alternative, cheap and widely available rich source for hesperidin and rutin. Due to their ability to reduce the risks of degenerative diseases, both compounds are of great importance in the pharmaceutical and food industries and are ingredients of many therapeutic and nutraceutical formulations [36]. For example, hesperidin is used in the medical field for the treatment of the cardiovascular system as it can control blood pressure, improve microcirculation and reduce blood cholesterol [37], while rutin is mainly used for the prevention and treatment of diabetes and hyperlipidemia. Also, *trans*-ferulic and caffeic acids are clinically used for different purposes [38].

While we have previously reported the presence of the identified compounds in the roots of *R. macrophyllus* Desf. [11] and in other *Ranunculus* species [6, 39], as far as we know, this is the first report of these compounds in the aerial parts for *R. macrophyllus* Desf.

In-Vitro and Ex-Vivo Antioxidant Activity

Chronic diseases like type 2 diabetes, cancer and cardiovascular diseases share oxidative stress as a major hallmark. In the absence of an efficient treatment to these pathologies, health promotion is the primary objective of disease prevention strategies, and regular consumption of plant

antioxidants can help to prevent oxidative stress-induced diseases. In this context, we studied the health promoting effects of *n*-butanol fraction from *R. macrophyllus* Desf.

The in-vitro study revealed that RM-B can directly neutralize charged radicals and non radical reactive species and prevent their generation through the reduction of iron ions, known as transition metal that can generate free radical by Fenton reaction with hydrogen peroxide. The results reflect the richness of RM-B in reductants such as phenolic compounds that are excellent electron donors. The identified compounds in our sample like ferulic acid, caffeic acid, rutin and hesperidin exhibited excellent in-vitro antioxidant activity [40]. Phenolic compounds can neutralize reactive species and prevent their devastating effects, protecting thus, the biomolecules (lipids, proteins and DNA) [24]. For the same reason phenolic compounds are used in food industry to delay food deterioration [40]. Neag et al., (2017) [41] reported similar results for the antioxidant activity of *R. sceleratus* while Bhatti et al., (2015) [10] reported better radical scavenging activity for *R. arvensis*.

When tested against oxidative hemolysis in a physiological-like system, RM-B successfully prevented mice RBC hemolysis in a dose dependent manner. Almost 50% of fatty acids in the RBC membrane are unsaturated [42], the generated peroxy radicals target the unsaturated fatty acids in the RBC membrane causing a lipid peroxidation chain reaction that lead to the loss of its integrity and the release of hemoglobin, and the subsequent cell death [43]. To prevent oxidative cell hemolysis, phenolic compounds present in RM-B may directly neutralize the generated peroxy radicals or reduce the resulting fatty acid radicals to non-reactive species by hydrogen atoms-transfer and preserve the integrity of the membrane [43]. Particularly, flavonoids such as hesperidin and rutin, identified as major compounds in RM-B showed the ability to inhibit RBC hemolysis by stopping the chain reaction of lipid peroxidation [44]. Overall, The exhibited in-vitro antioxidant activity may be ascribed to phenolic compounds present in RM-B, as they constitute the main antioxidants in plant extracts [45]. Phenolic compounds activity is mainly ruled by the number and position of hydroxyl groups on the phenolic structure and their glycosylation degree [23]. This in-vitro study provided some information on the antioxidant potential and the possible mechanisms of RM-B from *R. macrophyllus* Desf.

Safety and In-Vivo Health Enhancing Effect

While in-vitro methods are good screening tools, the extrapolation of their results on human health is not meaningful [46]. Accordingly, an in-vivo study was conducted to evaluate the safety of repeated administration of RM-B and its ability to enhance plasma and liver antioxidant status,

providing a deeper understanding of the antioxidant activity of RM-B.

The increase in aminotransferase levels (AST and ALT) mostly indicates liver injury, while creatinine and urea levels reflect more kidney injury [47]. The ALT levels reflect general liver injury and the increase in AST levels is associated with hepatic cell necrosis, while elevation of ALP levels is related to cirrhosis, hepatitis, or presenting cholestasis [45, 47]. In our study, repeated oral administration of RM-B during 21 days did not induce any alteration of aminotransferase levels or creatinine and urea levels. Hence, we can hypothesize that, at least at the clinical-chemistry level, RM-B did not cause any liver or kidney damage that may lead to an alteration of the related parameters. Interestingly, this finding allows us to suggest that compounds from RM-B present no toxicity even at the highest administered dose.

The liver is the primary tissue responsible for detoxifying and metabolizing various compounds like carbohydrates, vitamins and lipids. This high metabolic activity makes this organ an important location for continuous free radicals production, that leads to oxidative stress [48]. Oxidative stress biomarkers are key tools to evaluate the cellular redox state, disease evolution and the health promoting effects of antioxidants [49]. In this study, Catalase (enzymatic antioxidant), reduced glutathione (non-enzymatic antioxidant) and MDA (lipid peroxidation end product) [50] were used to evaluate the health-enhancing effect of RM-B in mice liver.

During the 21 consecutive days of treatment, we observed an improvement in plasma radical scavenging capacity and reducing ability for the RM-B treated groups as compared to non-treated group. Moreover, RM-B effectively enhanced liver antioxidant status by increasing the levels of both CAT and GSH and decreasing the levels of MDA. Catalase and reduced glutathione are important components of cellular antioxidant system, they are efficient radical scavengers, and GSH can also regenerate other oxidized antioxidants. Some pathologies like diabetes can reduce the levels of those components and treatment with plant extracts may reverse this effect [51]. The enhancement of plasma and liver antioxidant status may be attributed to phenolic compounds that were provided by the administration of RM-B as phenolic compounds are excellent free radical scavengers [52], they can modulate cellular redox states, enzymatic activities, cell proliferation and signaling pathways [53]. For instance, hesperidin, rutin and resveratrol, have been found to provide cell protection against oxidative damage by increasing the levels of liver CAT and GSH in addition to other endogenous antioxidants [24, 44, 54]. The mechanism of action may include the activation of a transcription factor (Nrf2) that will lead at the end to the transcriptions of various genes encoding antioxidant enzymes and other cellular antioxidants [44, 52].

Cell membrane is rich in polyunsaturated fatty acids, which make it vulnerable to oxidation that prompts lipid

peroxidation, resulting in oxidative damage and loss of cell integrity [43]. The presence of high levels of lipid peroxidation end products like MDA was linked to various neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease [50, 55]. Our results suggest that RM-B can provide protection against lipid peroxidation directly by neutralizing reactive oxidants, as evidenced by the in-vitro and ex-vivo study, or by enhancing endogenous antioxidants system as evidenced by the in-vivo study. RM-B treatment, especially at the 200 mg/kg bw showed better health promoting effects compared to vitamin C used as standard antioxidant. Our results are in agreement with other studies reporting the capacity of phenolic compounds rich extracts to increase plasma antioxidant capacity and liver antioxidant status [24, 50].

Conclusion

Findings of the present study are significant in that this is the first report on green waste parts from large-leaved buttercup (*R. macrophyllus* Desf.) phenolics and their in-vitro and in-vivo bioactivities. Combination of capillary LC-DAD and LC-MS/MS detection systems allowed an identification and provided compositional information of phenolic compounds present in *R. macrophyllus* Desf., some of them were detected for the first time. The high amounts of phenolic compounds found are distributed on different classes: Phenolic acids, stilbenes and specially flavonoids such as hesperidin and rutin. The strong in-vitro and in-vivo antioxidant activities of large-leaved buttercup phenolics found in the present study offer a great opportunity for utilizing otherwise a wasted raw material in modern pharmaceutical, medicinal and nutraceuticals industries in the aim of developing new value-added products.

Acknowledgements The authors are grateful to Prof. Bouadam, (Bejaia university) and Dr. Boudjelal A. (M'sila university) for the identification and authentication of the plant material. We also thank Pr. Benouadheh A. and Dr. Diafat A. (Bordj Bou Arreridj) for their assistance and precious advices.

Author contributions Study conception and design: NR-C, MEL-G, YM, FB. Acquisition of data: AD, NR, EG-M, FB. Analysis and interpretation of data: AD, NR, MEL-G, FB. Drafting of manuscript: AD, NR. Critical revision: AD, NR-C, MEL-G, YM, FB. Supervision: NR-C, MEL-G, YM, FB.

Funding This work was supported by the Community of Madrid/FEDER program [S2018/BAA-4393, AVANSECAL-II-CM] and the Ministry of Economy and Competitiveness [Project CTQ 2017-83569-C2-1-R].

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest There are no conflicts of interest to declare.

References

1. Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F.M., Tufail, T., Bashir, M.S., Ishtiaq, A.: Natural polyphenols: an overview. *Int. J. Food Prop.* **20**(8), 1689–1699 (2017). <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
2. Barros, H.D.F.Q., Junior, M.R.M.: Phenolic compound bioavailability using in vitro and in vivo models. In: Campos, M.R.S. (ed.), pp. 113–126. WoodHead Publishing, Sawston (2019)
3. Xing, L., Zhang, H., Qi, R., Tsao, R., Mine, Y.: Recent advances in the understanding of the health benefits and molecular mechanisms associated with green tea polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **64**(4), 1029–1043 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06146>
4. Mojzer, E.B., Hrnčič, M.K., Škerget, M., Knez, Ž, Bren, U.: Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* **21**, 901–901 (2016). <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
5. Nagar, E.E., Okun, Z., Shpigelman, A.: Digestive fate of polyphenols: updated view of the influence of chemical structure and the presence of cell wall material. *Curr. Opin. Food Sci.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.009>
6. Aslam, M.S., Choudhary, B.A., Uzair, M., Ijaz, A.S.: The genus *Ranunculus*: a phytochemical and ethnopharmacological review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**(5), 15–22 (2012)
7. Bicknell, R.A., Braun, R.H., Evans, A.C., Morgan, E.R.: Tissue culture of *Ranunculus lyallii* Hook. f. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* **24**(4), 303–306 (1996). <https://doi.org/10.1080/01140671.1996.9513966>
8. Guarrera, P.M., Savo, V.: Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. *J. Ethnopharmacol.* **185**, 202–234 (2016)
9. Kaya, G., Somer, N., Konyalıoğlu, S., Yalçın, H., Yavaşoğlu, N., Sarıkaya, B., Öner, M.: Antioxidant and antibacterial activities of *Ranunculus marginatus* var. *trachycarpus* and *R. sprunerianus*. *Turk. J. Biol.* **34**, 139–146 (2010). <https://doi.org/10.3906/biy-0809-13>
10. Bhatti, M.Z., Ali, A., Ahmad, A., Saeed, A., Malik, S.A.: Antioxidant and phytochemical analysis of *Ranunculus arvensis* L. extracts. *BMC Res. Notes* **8**, 279–287 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1228-3>
11. Deghima, A., Righi, N., Rosales-Conrado, N., Leon-Gonzalez, M.E., Gomez-Mejia, E., Madrid, Y., Baali, F., Bedjoua, F.: Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots: quantification, identification and antioxidant activity. *S. Afr. J. Bot.* **132**, 204–214 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.036>
12. Ouarghidi, A., Martin, G.J., Powell, B., Esser, G., Abbad, A.: Botanical identification of medicinal roots collected and traded in Morocco and comparison to the existing literature. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **9**, 59–72 (2013). <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-59>
13. Rai, M., Acharya, D., Ríos, J.L.: *Ethnomedicinal Plants: Revitalization of Traditional Knowledge of Herbs*. CRC Press, Boca Raton (2011)
14. Rivera, D., Obón, C., Heinrich, M., Inocencio, C., Verde, A., Fajardo, J.: Gathered Mediterranean food plants—ethnobotanical investigations and historical development. In: Heinrich, M., Müller, W.E., Galli, C. (eds.), vol. 59. pp. 18–74. Karger, Basel (2006)
15. Prieto, J.M., Recio, M.C., Giner, R.M., Máñez, S., Ríos, J.L.: Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. *J. Ethnopharmacol.* **89**, 131–137 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00271-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00271-X)
16. Singleton, V.L., Rossi, J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144–158 (1965)
17. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N.: Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* **97**, 654–660 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
18. Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., Madrid-Albarrán, Y.: Citrus peels waste as a source of value-added compounds: extraction and quantification of bioactive polyphenols. *Food Chem.* **295**, 289–299 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.136>
19. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–1237 (1999). [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
20. Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E.: Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* **10**, 1003–1008 (1989)
21. Miki, M., Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y., Nikit, E.: Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**(2), 373–380 (1987)
22. Le, K., Chiu, F., Ng, K.: Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem.* **105**, 353–363 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.063>
23. Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F.: Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3396–3402 (2000)
24. Wu, P., Ma, G., Li, N., Deng, Q., Yin, Y., Huang, R.: Investigation of in-vitro and in-vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. *Food Chem.* **173**, 194–202 (2015)
25. Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O.: Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagvaia blumei*. *Helv. Chim. Acta* **80**, 1144–1152 (1997)
26. Claiborne, A.: Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (ed.), pp. 283–284. CRC Press, Boca Raton (1985)
27. Ellman, G.L.: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77 (1959)
28. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.: Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351–358 (1979)
29. Ruiz-Vico, J.A., Rosales-Conrado, N., Guillén-Casla, V., Pérez-Arribas, L.V., León-González, M.E., Polo-Díez, L.M.: Fluoroquinolone antibiotic determination in bovine milk using capillary liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection. *J. Food Compos. Anal.* **28**(2), 99–106 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.08.003>
30. Kebièche, M., Lakroun, Z., Mraïhi, Z., Soulimani, R.: Effet anti-diabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytotherapie* **9**(5), 274–282 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10298-011-0651-4>
31. Shahid, S., Riaz, T., Asghar, M.N.: Screening of *Ranunculus sceleratus* for enzyme inhibition, antibacterial and antioxidant activities. *Bangladesh J. Pharmacol.* **10**(March), 436–442 (2015). <https://doi.org/10.3329/bjp.v10i2.22805>
32. Rafińska, K., Pomastowski, P., Rudnicka, J., Krakowskaa, A., Maruška, A., Narkute, M., Buszewski, B.: Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts. *Food Chem.* **289**, 16–25 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.025>

33. Coman, V., Teleky, B.-E., Mitrea, L., Martău, G.A., Szabo, K., Călinoiu, L.F., Vodnar, D.C.: Bioactive potential of fruit and vegetable wastes. In: Toldrá, F. (ed.). pp. 157–225. Academic Press, Cambridge (2019)
34. Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., Scalbert, A.: Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur. J. Clin. Nutr.* **64**(November), S112–S120 (2010). <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.221>
35. Chen, Q., Wang, D., Tan, C., Hu, Y., Sundararajan, B., Zhou, Z.: Profiling of flavonoid and antioxidant activity of fruit tissues from 27 Chinese local citrus cultivars. *Plants* **9**(2), 196–196 (2020)
36. Damin, F., Meinhardt, A., Caldeir, L., Filho, M., Livia, S., José, C., Wagner, T.-fr., Godoy, H.: Determination of rutin in fruits and vegetables in natura. *J. Food Nutr. Res.* **58**(4), 328–338 (2019)
37. Chen, J., Wang, H.-Z., Kong, L.-L., Chen, N.-H.: Hesperidin. In: Du, G.-H. (ed.). pp. 81–86. Springer, Berlin (2018)
38. Hou, B.-Y., Zhang, L., Wang, I.-H., Du, G.-H.: Rutin. In: Du, G.-H. (ed.). pp. 145–150. Springer, Berlin (2018)
39. Da-Cheng, H.: *Ranunculales Medicinal Plants: Biodiversity, Chemodiversity and Pharmacotherapy*. Academic Press, Cambridge (2018)
40. Shahidi, F., Ambigaipalan, P.: Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects—a review. *J. Funct. Foods* **18**, 820–897 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
41. Neag, T., Toma, C.-C., Olah, N., Ardelean, A.: Polyphenols profile and antioxidant activity of some Romanian *Ranunculus* species. *Stud. Univ. Babes-Bolyai Chem.* **3**, 75–88 (2017)
42. Çimen Burak, M.Y.: Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta* **390**, 1–11 (2008)
43. Banerjee, A., Kunwar, A., Mishra, B., Priyadarsini, K.I.: Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chem. Biol. Interact.* **174**, 134–139 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.009>
44. Elavarasan, J., Velusamy, P., Ganesan, T., Ramakrishnan, S.K., Rajasekaran, D., Periandavan, K.: Hesperidin-mediated expression of Nrf2 and upregulation of antioxidant status in senescent rat heart. *J. Pharm. Pharmacol.* **64**, 1472–1482 (2012)
45. Righi, N., Boumerfeg, S., Fernandes, P.A.R., Deghima, A., Baali, F., Coelho, E., Cardoso, S.M., Coimbra, M.A., Baghiani, A.: Thymus algeriensis Bioss & Reut: relationship of phenolic compounds composition with in vitro/in vivo antioxidant and antibacterial activity. *Food Res. Int.* **136**, 109500–109500 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109500>
46. Apak, R.: Current issues in antioxidant measurement. *J. Agric. Food Chem.* **67**(33), 9187–9202 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03657>
47. Gowda, S., Desai, P.B., Hull, V.V., Math, A.A.K., Sonal, N.: A review on laboratory liver function tests. *Pan Afr. Med. J.* **3**(November), 17–17 (2009)
48. Li, S., Li, H., Xu, X., Saw, P.E., Zhang, L.: Nanocarrier-mediated antioxidant delivery for liver diseases. *Theranostics* **10**(3), 1262–1280 (2020). <https://doi.org/10.7150/thno.38834>
49. Marrocco, I., Altieri, F., Peluso, I.: Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/6501046>
50. Guo, F., Xiong, H., Wang, X., Jiang, L., Yu, N., Hu, Z., Sun, Y., Tsao, R.: Phenolics of green Pea (*Pisum sativum* L.) hulls, their plasma and urinary metabolites, bioavailability and in vivo antioxidant activities in a rat model. *J. Agric. Food Chem.* **67**(43), 11955–11968 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04501>
51. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O.: Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **5**(1), 9–19 (2012). <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
52. Zhang, H., Tsao, R.: Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* **8**, 33–42 (2016)
53. Luca, S.V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Krystyna, S.-W., Aprotosoiaie, A.C., Trifan, A.: Bioactivity of dietary polyphenols: the role of metabolites. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **60**(4), 1–34 (2020). <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546669>
54. Jagdish, K., Mehul, S., Nehal, S.: Effect of hesperidin on serum glucose, hba1c and oxidative stress in myocardial tissue in experimentally induced myocardial infarction in diabetic rats. *Pharmacogn. J.* **2**(7), 185–189 (2010)
55. Santos Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, C.V.-C.B.: Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In: Emad, S. (ed.). pp. 1–29. IntechOpen, London (UK) (2019). <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Nutritional constituents and effect of *in vitro* digestion on polyphenols and antioxidant activity of the large-leaved buttercup (*Ranunculus macrophyllus* Desf.)

Amirouche Deghima^{a,b,*}, Diana Ansorena^c, María Isabel Calvo^d, Iciar Astiasarán^c,
Fatiha Bedjou^a

^a Laboratoire de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria

^b Department of Natural Sciences and Life, Faculty of Exact Sciences, Natural and Life Sciences, Mohamed Khider University, 07000, Biskra, Algeria

^c Departamento de Ciencias de La Alimentación y Fisiología, Facultad de Farmacia, IDISNA – Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, Universidad de Navarra, Irunlarrea S/n, Pamplona, 31008, Spain

^d Departamento de Tecnología y Química Farmacéuticas. Facultad de Farmacia y Nutrición, IDISNA – Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra, Universidad de Navarra, Irunlarrea S/n, Pamplona, 31008, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Ranunculus macrophyllus Desf.

Polyphenols

Antioxidants

Large-leaved buttercup

ABSTRACT

Ranunculus macrophyllus Desf. is a lesser-known yet regularly used vegetable in Mediterranean folk diets for its nutritional and medicinal properties. There is a lack of scientific data on its nutritional value and functionality. Therefore, the aim of this study was to investigate the nutritional and the phytochemical composition and the effect of *in vitro* digestion on the antioxidant activity and on individual polyphenols from an ethyl acetate extract. The proximate composition analysis showed good amounts of carbohydrates (72.4% dry weight, dw) and crude proteins (15% dw), while mineral analysis showed considerable amounts of calcium, magnesium, iron and zinc among other elements. The lipidic fraction showed potential anti-thrombotic and anti-atherogenic potential with α -linolenic acid (40.8%) and linoleic acid (16.9%) as major compounds. The ethyl acetate fraction showed good amounts of total polyphenols (235 mg GAE/100 g dw), flavonoids (43.5 mg QE/100 g dw) and flavonols (108 mg RE/100 g dw). The fraction showed good radical scavenging ability against 2,2-diphenyl 1-1-picrylhydrazyl (432 mg Trolox E/100 g dw), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (1240 mM Trolox E/100 g dw) and peroxy radicals (14200 mM Trolox E/100 g dw) even after *in vitro* digestion. Caffeic and coumaric acids showed good bioaccessibility between 97 and 102% while catechin and luteolin had lower bioaccessibility ranging from 34.2 to 38.7%. *R. macrophyllus* Desf. was found to be a good source of nutritional and non-nutritional bioactive compounds with good bioaccessibility, which make its application in food and pharmaceutical industries potentially beneficial.

1. Introduction

Wild vegetables are an important resource for humans worldwide, including being a source of new flavours and textures (Harumi Iyda et al., 2019). The food industry and consumers are increasingly interested in wild vegetables. They may be a low cost and sustainable food source with potential human health benefits (Spínola et al., 2019) that grow in many different ecosystems (Rivera, 2006, pp. 18–74). It is estimated that more than one billion people in the world already incorporate wild vegetables in their daily diet (Shaheen et al., 2017).

Wild vegetables are often a good source of macronutrients, micronutrients and secondary bioactive metabolites such as polyphenols. This gives them the possibility of being used as a source of functional foods (Jelena et al., 2018). The presence of polyphenols and their associated bioactivities may have effects, such as antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinoma, antimicrobial, antiviral, and cardioprotective (Barros and Junior, 2019, pp. 113–126). Generally, to obtain the health benefits, a regular daily intake and good bioaccessibility of polyphenols are required (Mrduljaš et al., 2017). Therefore, the bioaccessibility of bioactive compounds needs to be investigated (Barak et al., 2019).

* Corresponding author. Laboratoire de Biotechnologies végétales et Ethnobotanique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria.

E-mail address: a.deghima@univ-biskra.dz (A. Deghima).

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100904>

Received 13 July 2020; Received in revised form 30 December 2020; Accepted 25 January 2021

Available online 29 January 2021

2212-4292/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Ranunculus is the most diverse genus of the family Ranunculaceae, with more than 600 species (Aslam et al., 2012) that can be found all over the world and especially in the Mediterranean temperate regions where they are used as food (Ranunculus repens, Ranunculus bulbosus and Ranunculus ficaria) (Guarrrera & Savo, 2016). Their consumption extends to other parts of the world such as Hungary (Ranunculus ficaria) (Dénes et al., 2012) and Japan (Ranunculus nipponicus) (Nakaya et al., 2015). Ranunculus species contain essential fatty acids (EFA) (linoleic and α -linolenic acids) and minerals (K, Na, Fe, and Zn), in addition to different classes of bioactive compounds such as polyphenols, flavonoids, alkaloids, triterpenoids, phytosterols, coumarin derivatives and saponins (Aslam et al., 2012; Da-Cheng, 2018). However, data on the nutritional composition of Ranunculus species remain limited.

One of the less studied Ranunculus species is *Ranunculus macrophyllus* Desf. a wild vegetable whose roots are a rich source of bioactive polyphenols (Deghima et al., 2020). They are used as a remedy for feminine infertility and to gain weight (Ouarghidi et al., 2013). On the other hand, the green leafy parts (leaves and stems) are traditionally used to treat certain skin diseases (Rai et al., 2011), and as leafy green vegetable in the Mediterranean diet, they are consumed fresh as salads or cooked to prepare boiled vegetables or soups (Rivera et al., 2006, pp. 18–74). Despite its common use as folk food, its nutritional composition and bioactivities remain unknown. The proximate composition, nutritional profile (FA profile and mineral composition) and the phytochemistry of *R. macrophyllus* Desf. were studied. The antioxidant activity of the ethyl acetate fraction from this plant was measured and the bioaccessibility of the identified polyphenols was also estimated using an *in vitro* gastrointestinal (GI) digestion model.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All chemicals and solvents were of analytical grade, and deionized water (Mar-707, DAFA, Ciudad Real, Spain) was used. Acetonitrile (MeCN) and methanol (MeOH) of HPLC quality were provided by Scharlab (Barcelona, Spain). Hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS^{•+}), potassium persulfate, dipotassium hydrogen phosphate, potassium phosphate monobasic dihydrate, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), fluorescein sodium salt, Folin-Ciocalteu reagent, sodium bicarbonate, aluminium chloride, vanillin, sulphuric acid, sodium acetate, gallic acid (GA), quercetin (Q), rutin (R), catechin (C), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) were provided by Scharlab. For *in vitro* digestion α -amylase from human saliva (A1031, 852 units/mg protein), pepsin from porcine gastric mucosa (P7000, 674 units/mg protein), pancreatin from porcine pancreas (P1750, 4 × United States Pharmacopeia specifications) and bile extract (B8631) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany).

2.2. Plant material

The aerial flowering parts of *R. macrophyllus* Desf. were collected from the prairies of Ras El Oued- Bordj Bou Arreridj region North-East Algeria in May 2018 (Global Positioning System (GPS) coordinates: 35°58'31.4"N 5°01'53.4"E, 1027 m above sea level). The plant was identified by Dr. Bouadam from the Department of Physico-Chemical Biology at the University of Bejaia (Bejaia, Algeria) and a voucher specimen (AB-108) has been deposited at the herbarium of the Life and Natural Science Department, M'sila University (M'sila, Algeria). Only leaves and stems were used as they constitute the edible parts of this plant. The plant was cleaned from dust and contaminants by wiping and air dried in the dark at room temperature (20–25 °C) for one month and then powdered with an electric blender (Prep'line, SEB, Écully, France). The powder was kept in the dark at room temperature (20–25 °C) in an air sealed container for a maximum of 24 wk.

2.3. Nutritional composition

The dried powdered aerial parts of *R. macrophyllus* Desf. were investigated for their moisture, total fat, total crude proteins and ash content using the official AOAC methods. Moisture was determined using the official method 945.15 (AOAC, 2003). Total fat was extracted from 10 g of powdered dry material with petroleum ether in a Soxhlet apparatus (B-811, Buchi, Flawil, Switzerland) for 3 h using method 960.39 (AOAC, 2003). Crude proteins were determined using the method 928.08 (AOAC, 2003), with the macro-Kjeldahl method ($N \times 6.25$) and an automatic distillation and titration unit (K-314, Buchi). Ash was determined using incineration at 550 °C for more than 14 h using method 920.153 (AOAC, 2003), while total carbohydrates were determined by difference using equation (1):

$$\text{Total carbohydrates (g/100 g dry weight)} = 100 - (\text{g fat} + \text{g protein} + \text{g ashes}) \quad (1)$$

2.4. FA profile

The FA profile was determined in the lipid fraction using gas chromatography using the method of Ansorena et al. (2013). The FA were methylated as described in method 969.33 (AOAC, 2003). A Perkin-Elmer Autosystem XL gas chromatograph with a FID detector (Clarus 500, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) was used. The instrument was equipped with a capillary column SPTM - 2560 (100 m x 0.25 mm x 0.2 μ m) (Sigma Co., St. Louis, MO, USA). The analysis was done using the following conditions: The temperature of the injection port was 250 °C and that of the detector was 260 °C. The initial temperature of the oven was 175 °C for 10 min, then it was increased to 200 °C (10 °C/min) and increased again to 220 °C (4 °C/min) and maintained for 15 min. Hydrogen was used as the carrier gas, and the pressure was 20.5 psi. Split flow was 120 cm/s. The identification of the FA methyl esters (ME) was done by comparison of the retention times of the peaks in the sample with those of standard pure compounds as described in Ansorena et al. (2013). Individual methylated standards from Sigma were used for the saturated (S) FA, monounsaturated, cis polyunsaturated (PU) FA. The quantification of individual FA was based on the internal standard method, using heptadecanoic acid methyl ester (Sigma), assuming that the response for each FAME were all the same and expressed as a percentage of the total peak areas actually measured. Therefore, actual recovery was not measured. The results were used to calculate the index of atherogenicity (IA) (Ulbricht & Southgate, 1991) using equation (2):

$$IA = \frac{C12 : 0 + 4C14 : 0 + C16 : 0}{\sum PUFA_{\omega 6} + \sum PUFA_{\omega 3} + \sum MUFA} \quad (2)$$

and the index of thrombogenicity (IT) (Ulbricht & Southgate, 1991) using equation (3):

$$IT = \frac{C14 : 0 + C16 : 0 + C18 : 0}{0.5(MUFA + PUFA_{\omega 6} + \omega 3 \times PUFA_{\omega 3}) + (PUFA_{\omega 3} / PUFA_{\omega 6})} \quad (3)$$

2.5. Mineral analysis

Mineral analysis was done on the incineration residue previously obtained (section 2.3), using the method described by Sola-Larrañaga and Navarro-Blasco (2009). The incineration residue was extracted with 5 mL HCl (20%, v/v) and then the volume was made up to 50 mL with distilled water. For the atomic absorption spectroscopy (AAS) analysis, a Perkin-Elmer Model A Analyst 800 atomic absorption spectrometer equipped with flame and graphite furnace atomisers and Zeeman background correction was used (Perkin Elmer). To analyze Na and K an air/acetylene flame with an oxidant fuel flow of 17.0 and 2.0 mL/min,

respectively, was used and the atomic emission was measured at 589 nm for Na and 766.5 nm for K. Zn, Fe, Cu, Mn and Mg measurements were done using atomic absorption at 213.9, 372, 327.4, 403.1, and 285.2 nm, respectively, using hollow cathode lamps operated at 15, 30, 15, 20, and 6 mA, respectively, and bandwidths of 0.7, 0.2, 0.2, 0.2, and 0.7 nm, respectively. A high-sensitivity nebulizer was used.

2.6. Extraction of bioactive compounds

The extraction of bioactive compounds from the powder was done using the method of Prieto et al. (2003). Briefly, 100 g dry powder were macerated with 500 mL methanol (24 h), and then, filtered (Two sheets, qualitative papers No. 102, medium Ø 150 mm, Sigma). The maceration was repeated three times, then the solvent was evaporated at reduced pressure in a rotatory evaporator (40 °C) (R210, Buchi) to obtain the crude methanolic extract (22%, w/w yield). The crude extract was subjected to a sequential liquid-liquid separation using solvents of increasing polarities, hexane (12% w/w from the methanolic extract), chloroform (0.6% w/w), ethyl acetate (RMEA) (3.1% w/w) and *n*-butanol (12% w/w). Solvents were evaporated under reduced pressure in the rotatory evaporator, and the residue was then resuspended in water and lyophilized (Cryodos-50, Telstar, Barcelona, Spain). The ethyl acetate fraction (RMEA) was characterized, as it showed the highest total polyphenols content, according to a previous study (Deghima et al., 2021).

2.7. Antioxidant activity and bioaccessibility

2.7.1. In vitro GI digestion

The ethyl acetate fraction was subjected to an *in vitro* digestion process using the procedure described by Gayoso et al. (2018). Samples (200 mg) were placed in three different Falcon tubes (Sigma) and dissolved in 12 mL of distilled water. Tubes were maintained at 37 °C in a water bath with continuous stirring. The pH of the solution was adjusted to 6.5 with 1 M sodium bicarbonate and oral digestion started in the three tubes by adding 50 µL α -amylase (1.3 mg/mL in 1 mM CaCl₂) for 2 min. At the end of this step pH was adjusted to 2.5 using 3 M HCl, and a tube was immediately frozen (-20 °C). Pepsin (66 µL, 160 mg/mL in 0.1 M HCl) was added to the other two tubes to simulate the gastric digestion for 2 h, then, pH was brought up to 7 using 1 M sodium bicarbonate to inactivate pepsin and another tube was immediately frozen. The intestinal digestion was initiated in the remaining tube by adding 500 µL of a 1:1 mixture of pancreatin (4 mg/mL) and bile extract (25 mg/mL) for 2 h, and pH was then adjusted to 7.5 using 1 M sodium bicarbonate. Then the tubes were stored at -20 °C, for a maximum of 2 days. The three tubes were thawed (4 °C) then, centrifuged at 4000 g (A-4-62 Rotor, Model 5810R centrifuge, Eppendorf, Barcelona, Spain) for 40 min at 4 °C and the supernatant, which is considered as the bioaccessible fraction, was collected and lyophilized for further analysis. The supernatant from the first tube represents the bioaccessible fraction from oral digestion (OD), and that from the second tube represents the bioaccessible fraction from gastric digestion (OD and GD) while the supernatant from the third tube represents the bioaccessible fraction from intestinal digestion (ID, OD and GD). In parallel, non-digested samples were subjected to the same procedures in the absence of digestive enzymes. For each digestion three independent triplicates were done and bioaccessibility of individual compounds was calculated using equation (4):

$$\text{Bioaccessibility (\%)} = [(\text{total mg of compound in the digested sample}) / (\text{total mg of compound in the non-digested sample})] \times 100 \quad (4)$$

The phytochemical content and antioxidant activity were determined using *in vitro* assays with both non-digested and digested supernatant lyophilized powders. Prior to every test the freeze-dried samples were dissolved in methanol.

2.7.2. Total polyphenols content (TPC)

The TPC content was estimated using the Folin-Ciocalteu assay using the method of Singleton and Rossi (1965). Briefly, 15 µL of sample were mixed with 1185 µL of distilled water and 75 µL of Folin-Ciocalteu reagent. After incubation (2 min), 225 µL of sodium carbonate was added. After 2 h incubation, the absorbance was measured at 765 nm using a microplate reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). GA was used to plot a calibration curve and results were expressed as mg GA equivalents (E)/100 g dw of *R. macrophyllus* Desf.

2.7.3. Total flavonoids content (TFC)

The aluminium trichloride method was used to assess the TFC using the method of Djerdane et al. (2006). Equal volumes of samples and aluminium trichloride (2%) were mixed and incubated for 10 min, the absorbance was measured at 430 nm using the microplate reader. Q was used as standard and results were expressed as mg QE/100 g dw of *R. macrophyllus* Desf.

2.7.4. Total flavonols content (FOL)

FOL was estimated using the method of Kumaran and Karunakaran (2007), where 500 µL of samples were mixed with the same volume of aluminium trichloride (2%) and 750 µL of sodium acetate (5%) and incubated for 2.5 h. The absorbance was measured at 440 nm using the microplate reader, and R was used to plot a calibration curve and results were expressed as mg RE/100 g dw of *R. macrophyllus* Desf.

2.7.5. Condensed tannins content (CTC)

CTC was estimated using the optimizations of Sun et al. (1998). Briefly, 250 µL extract was mixed with 625 µL vanillin (1% in methanol) and the same volume of sulphuric acid (10% in methanol), the mixture was incubated for 15 min and the absorbance was measured at 500 nm using the microplate reader. A calibration curve was plotted using C as the standard and results were expressed as mg CE/100 g dw of *R. macrophyllus* Desf.

2.7.6. DPPH• inhibition

The ability to inhibit the synthetic free radical DPPH• was estimated using the method of Garcia-Herreros et al. (2010). A stock methanolic solution of DPPH• (0.04 mg/mL) was prepared and its absorbance was adjusted to 0.80 ± 0.02 at 516 nm. A volume of this solution was mixed with the same volume of different concentrations of the extract and incubated for 30 min. The absorbance was measured at 516 nm using the microplate reader. T was used as a reference compound to plot a calibration curve, and results were expressed as mg TE/100 g dw of *R. macrophyllus* Desf.

2.7.7. ABTS•+ inhibition

In a 96 well microplate, 18 µL of sample was mixed with 182 µL of ABTS•+ solution and incubated. After 6 min, the absorbance was measured at 734 nm using the microplate reader. T was used as standard compound to plot a calibration curve and results were expressed as mM TE/100 g dw of *R. macrophyllus* Desf (Re et al., 1999).

2.7.8. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

The antiradical activity was further tested against the peroxy radical AAPH using the ORAC method as described by Prior et al. (2003). The assay was done using the microplate reader in a 96 well microplate, where 40 µL of the sample were mixed with 120 µL of sodium fluorescein (132.5 nM in 10 mM potassium phosphate buffer) and fluorescence was immediately measured at T0 (excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 520 nm). AAPH solution (40 µL, 0.3 M in 10 mM potassium phosphate buffer) was added and measurements were taken every 45 s for 1 h. The net area under the curve (AUC) of the standard (T) and the samples was calculated. The standard curve was obtained by plotting T concentrations (4–250 µM) against the average net AUC of the three measurements for each concentration. Final ORAC values were

calculated using the regression equation between T concentrations and the net AUC and were expressed as mM TE/100 g dry weight of *R. macrophyllus* Desf.

2.7.9. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Individual polyphenols were measured using a reversed phase HPLC-DAD using a Waters 2695 (Milford, MA, USA) 600 E multi-solvent delivery system, a Waters U6K sampler and a Waters 2996 photodiode-array detector. Samples were dissolved in methanol at 20 mg/mL and filtered through 0.45 µm filters (Sigma). Injection volume was 20 µL. The separation was done on a C18 column (Nova-Pak, 150 × 3.9 mm, 4 µm, Waters) maintained at 25 °C. The detection wavelengths ranged from 210 to 550 nm. A mixture of acetonitrile (A) and acidified distilled water (pH 2 with orthophosphoric acid) (B) was used as the mobile phase, in the following proportions: 1–15 min, 10–20% A; 15–20 min, 20–40% A, 20–25 min 40–10% A, then it was maintained at 10% A until the end of the analysis. The flow rate was 0.8 mL/min. Quantification of identified compounds was made based on external calibration curves using the corresponding external standards (luteolin, apigenin, catechin, caffeic acid and *p*-coumaric acid). The amount of each compound was expressed as mg/100 g dw. It was calculated before and after digestion and used to calculate the bioaccessibility (percentage of compound that remains after intestinal digestion) (Pinacho et al., 2015).

2.8. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate and data were analyzed using GraphPad Prism 7.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The results were expressed as mean values and standard deviation (SD). The differences between the non-digested and digested samples were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's significant difference post hoc test with $\alpha = 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Proximate composition and FA profile

The moisture content affects the texture, taste, appearance, stability and may reflect the consistency of fruits and vegetables (Afify et al., 2017). The amount of moisture in *R. macrophyllus* Desf (Table 1), was within the range of moisture of most regularly consumed vegetables that range from 81 to 96% (Afify et al., 2017). As *R. macrophyllus* Desf. occurs with other dietary vegetables, its overall contribution to total energy is low. To compare proximate composition with other plants, results were expressed as dw (Table 1).

Carbohydrates accounted for the largest portion of *R. macrophyllus* Desf. aerial parts with a meaningful amount of crude proteins and a relatively low crude lipid content (Table 1). With this amount of crude lipid, *R. macrophyllus* Desf. belongs to the group of fruits and vegetables with low lipid content (<10%) (Domínguez-Avila & González-Aguilar, 2019). Other commonly consumed fruits and vegetables have lipid content ranging from 0.2 to 0.4% and crude proteins content between 0.6 and 2.9% (Domínguez-Avila & González-Aguilar, 2019), both crude lipids and total crude proteins from *R. macrophyllus* Desf. were higher. In general, vegetables including *R. macrophyllus* Desf., have a low lipid

content which make them a good food for people with a weight problem (Afify et al., 2017). The low lipid content in *R. macrophyllus* Desf. make it a good addition to a low-fat diet.

The amount of ash in *R. macrophyllus* Desf. reflects its high amount of total minerals. Ash content in 24 commonly consumed vegetables was low compared to *R. macrophyllus* Desf and ranged from 0.23 to 1.91% (Afify et al., 2017). When comparing with similar plants, the wild edible *R. polyanthemos* had similar ash amounts (13.3%) and lower total crude proteins (6.77%) (Karik et al., 2018), while *Caltha polypetala* (Ranunculaceae) had similar amounts of ash (10.9%) (Kibar and Temel, 2015). Whereas the amount of lipids was relatively low, it is still useful to analyze the FA profile to know the possible contribution to the intake of some of the EFA. Considering the amount of crude lipids compared to other commonly consumed vegetables and fruits, it is possible that *R. macrophyllus* Desf. makes a greater contribution to the intake of some of the EFA. The FA profile analysis showed 19 FA in *R. macrophyllus* Desf. with the EFA, α -linolenic and linoleic acid, alongside with palmitic acid as major FA (Table 2). Generally, FA C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 and C18:3, are the main FA in vegetables and fruits with low lipid content (Domínguez-Avila & González-Aguilar, 2019). Some PUFA such as linoleic acid, have several biological activities including anti-lipid peroxidation, anti-inflammatory and anti-obesity activities (Yang et al., 2020).

Unsaturated fatty acids (UFA) were predominant compared to the SFA with the prevalence of PUFA within that group and a low amount of *trans*-FA. Myristic, palmitic, stearic, oleic, linolenic and eicosanoic acids were previously reported in *R. ternatus* (Chen et al., 2006). The same study showed that the amount of UFA was 58.2%, while in *R. pedatus*, 60% of total FA were unsaturated with linoleic as the main FA (Erdogan et al., 2014). Thus, their results were consistent with the amounts found in the present study for the UFA (68%).

The ratios PUFA/SFA and $\omega 6/\omega 3$ are important markers of the

Table 2

Fatty acids composition of *Ranunculus macrophyllus* Desf. aerial parts (g/100 g fatty acids).

Fatty acid	Rt (min)	mean $\pm$ SD
Caprylic C8:0	5.05	0.1 $\pm$ 0.0
Capric C10:0	5.43	0.2 $\pm$ 0.0
Lauric C12:0	6.09	0.1 $\pm$ 0.0
Myristic C14:0	7.26	0.9 $\pm$ 0.0
Palmitic C16:0	9.31	23.6 $\pm$ 0.1
<i>t</i> -Palmitoleic C16:1 Δ 9 _t	10.22	0.9 $\pm$ 0.0
Stearic C18:0	12.24	2.7 $\pm$ 0.1
Oleic C18:1	13.13	1.5 $\pm$ 0.0
<i>c</i> -Vaccenic C18:1	13.20	6.3 $\pm$ 0.1
<i>t</i> -Linoleic C18:2 Δ 9 _t ,12 _t	13.90	0.9 $\pm$ 0.1
Linoleic C18:2 Δ 9 _c ,12 _c	14.47	16.9 $\pm$ 0.1
Arachidic C20:0	15.05	0.8 $\pm$ 0.0
Eicosanoic C20:1	15.94	0.1 $\pm$ 0.0
α -Linolenic C18:3	16.03	40.8 $\pm$ 0.3
Eicosadienoic C20:2	17.23	0.1 $\pm$ 0.0
Behenic C22:0	17.85	1.2 $\pm$ 0.0
Brassicidic C20:1 Δ 13 _t	18.69	0.1 $\pm$ 0.0
Arachidonic C20:4	19.30	0.9 $\pm$ 0.1
Eicopentaenoic C20:5	20.90	2.3 $\pm$ 0.0
SFA		29.5 $\pm$ 0.1
MUFA		7.9 $\pm$ 0.1
PUFA		60.8 $\pm$ 0.5
$\omega 3$		43.0 $\pm$ 0.2
$\omega 6$		17.7 $\pm$ 0.2
$\omega 6/\omega 3$		0.4 $\pm$ 0.0
PUFA/SFA		2.1 $\pm$ 0.0
PUFA + MUFA/SFA		2.3 $\pm$ 0.0
<i>Trans</i>		1.8 $\pm$ 0.1
IA		0.4 $\pm$ 0.0
IT		0.2 $\pm$ 0.0

RT: Retention time; SFA: Saturated fatty acids; MUFA: Monounsaturated fatty acids; PUFA: Polyunsaturated fatty acids; IA: Index of atherogenicity, IT: index of thrombogenicity.

Table 1

Proximate composition of the *Ranunculus macrophyllus* Desf aerial parts.

Nutritional content	
Moisture Content (%)	85 $\pm$ 1
Dry matter (%)	15 $\pm$ 1
Crude proteins (g/100 g dry weight)	15 $\pm$ 1
Crude lipids (g/100 g dry weight)	1.9 $\pm$ 0.1
Ash (g/100 g dry weight)	10.3 $\pm$ 0.5
Carbohydrates (g/100 g dry weight)	72.4 $\pm$ 0.2

nutritional quality of the lipid fraction of foods, the first should be > 0.45 while the second should be < 4 . Results of *R. macrophyllus* Desf. for those ratios were 2.3 and 0.4, respectively, indicating a healthy FA profile. A higher ratio of PUFA:SFA can help to reduce serum cholesterol, atherosclerosis and prevent heart diseases (Mzoughi et al., 2019). More specific indexes such as the index of atherogenicity (IA) and the index of thrombogenicity (IT), were low (Table 2), which suggested the antithrombotic and antiatherogenic potential of the lipidic fraction from *R. macrophyllus* Desf. Studies and guidelines recommend regular consumption of $\omega 3$ FA since they are related to lower cardiovascular diseases risk (Harumi lyda et al., 2019). Although all these data related to the lipid fraction are not nutritionally meaningful when the entire plant is used as food, they could be taken into consideration when an extract is used in other products.

3.2. Mineral composition

Minerals have an important role in maintaining the healthy state of people by influencing biochemical reactions in human cells on a daily basis. Macroelements (Na, K, Ca and Mg) and microelements (Fe, Zn, Cu and Mn) were estimated in the incineration residue from *R. macrophyllus* Desf. aerial parts (Table 3).

K was the major macroelement found, followed by Ca, Na and Mg. The amounts found were high compared to other commonly consumed plants (Kibar & Temel, 2016), while they were found to be comparable to the amounts in edible *R. polyanthemos* L., that had similar amounts of Ca, Mg and K, with a lower amount of Na (Karik et al., 2018). Many lesser-known African vegetables showed higher mineral composition than the commonly consumed ones (Charles Aworh, 2015). K and Na are important for water/electrolyte balance and several other metabolic functions, while Ca and Mg are important for bone health and preventing osteoporosis (Kim et al., 2016). Therefore, *R. macrophyllus* Desf., being a cheap and available source of these minerals, might significantly contribute to their dietary intake.

R. macrophyllus Desf. also had good amounts of the microelements, with Fe as the major one, followed by Zn, Mn and Cu. Lower amounts were reported in 11 commonly consumed vegetables (Kibar & Temel, 2016) while the amounts of the corresponding microelements were high in *R. polyanthemos* (Karik et al., 2018), although, they were still lower than the ones found in this study. The deficiency in any of those microelements leads to problems in mental and body development (Mzoughi et al., 2019). Zn has an important role in cellular immune and antioxidant systems while Fe is important to hemoglobin formation and oxygen transport (Kim et al., 2016). Fe and Zn deficiencies are the most common types of deficiencies. It is estimated that over two billion people are affected by microelements deficiencies and many of them can be alleviated by the introduction of a new source of the relevant element (Flyman & Afolayan, 2006; Kim et al., 2016). With such high amounts, *R. macrophyllus* Desf. can be considered as a cost-effective source of essential microelements that can be beneficial for people suffering from microelements deficiency.

Table 3
Macro and microelements found in *Ranunculus macrophyllus* Desf. aerial parts.

Mineral element (mg/100 g dw)		Adequate intake mg/day	
		Male	Female
Potassium	2000 $\pm$ 200	2500	2000
Sodium	1800 $\pm$ 100	600	600
Calcium	990 $\pm$ 30	650	550
Magnesium	240 $\pm$ 20	280	230
Iron	45 $\pm$ 4	6.0	5.0 ~ 8.5
Zinc	4.5 $\pm$ 0.2	8	6
Manganese	3.1 $\pm$ 0.1	4.0	3.5
Copper	1.7 $\pm$ 0.1	0.7	0.6

3.3. In vitro gastrointestinal digestion and polyphenol content

Initial phytochemical screening (Folin-Ciocalteu) and evaluation of the in vitro antioxidant activity showed that RMEA had the highest levels of polyphenols and the best antioxidant activity compared to the other fractions (Deghima et al., 2021). Thus, RMEA was used to determine the effect of in vitro digestion on polyphenols content, antioxidant activity and individual polyphenol bioaccessibility. Bioaccessibility was estimated using an in vitro assay that simulated the GI digestion, and allowed an approximation of the amounts available for absorption into the systemic circulation at the different levels of the GI tract (Santos-Sánchez et al., 2019, pp. 1–29).

3.3.1. Polyphenols content

Phenolic compounds in RMEA were measured before and after the in vitro digestion as seen in Fig. 1.

The non-digested RMEA showed high TPC, TFC and FOL, with lower CTC amount. Djenidi et al. (2020) determined the TPC and TFC in 19 vegetables and 14 fruits commonly consumed in Algeria. The results in the present study were expressed in the same units used in that study. Except for beans (*Vicia faba* L.) (360 mg GAE/g extract) (Djenidi et al., 2020), *R. macrophyllus* Desf. had the highest TPC. TFC from the same study ranged from 0.04 for bananas to 34 mg QE/mg extract for Jew's mallow (*Corchorus olitorius* L.). Again, *R. macrophyllus* Desf. showed the highest TFC. Accordingly, *R. macrophyllus* Desf. may be considered as a good cost-effective source of beneficial polyphenols and flavonoids. Polyphenols are important functional compounds that have various bioactivities including antioxidant, anticarcinogenic and anti-inflammatory activities (Barros and Junior, 2019, pp. 113–126).

The simulated in vitro GI digestion significantly affected the different polyphenol compounds in different ways. During the simulated oral digestion, a slight loss of 6.8% of TPC was noted, this may be attributed to the low exposure time (2 min) during this step. TFC were the most affected polyphenols in this step, with a loss of 76%. FOL, as a class of flavonoids, followed the same trend with a loss of 63%. These results were consistent with Chaalal et al. (2018) that reported a loss of 92% of TFC after oral digestion in three different prickly pear varieties. Many studies showed that flavonoids can be transformed metabolically starting from oral digestion, which may lead to a decrease in their bioaccessibility (Ahn-Jarvis et al., 2019). On the other hand, CTC increased by 27% in the same step, although the difference was not statistically significant compared to the non-digested RMEA.

Throughout the simulated gastric digestion, the decrease in TPC was not significant compared to the previous step, which was consistent with previous studies, that reported the stability of polyphenols at the acidic gastric pH (Pinacho et al., 2015). On the other hand, other studies showed a large decrease in TPC during the same step (Ait Chait et al., 2020). The CTC significantly increased by 74% in this step, while 82% of TFC and 80% of FOL were already lost during this step. The bioavailability of flavonoids was reported to be low compared to other phenolic compounds (Ait Chait et al., 2020). TPC and the other classes showed good stability during the simulated intestinal digestion. TPC significantly increased by 8.9% compared to the gastric digestion, while TFC and FOL did not undergo any further loss compared to the gastric digestion. CTC increased by 108% compared to the non-digested sample in this step. Campos-Vega et al. (2015) also reported the release of condensed tannins during intestinal digestion. Moreover, condensed tannins are oligomeric or polymeric catechins, flavan or flavan-3-ols; they are more subjected to degradation by digestive enzymes and alkaline pH. Those molecules are cleaved to produce more units (Adarkwah-Yiadom & Duodu, 2017). As the vanillin assay (Section 2.7.5) is sensitive to monomers and dimers formed during the digestion process this may lead to an increase in their reactivity, giving higher values in the spectrophotometric analytical determination of condensed tannins (Sun et al., 1998).

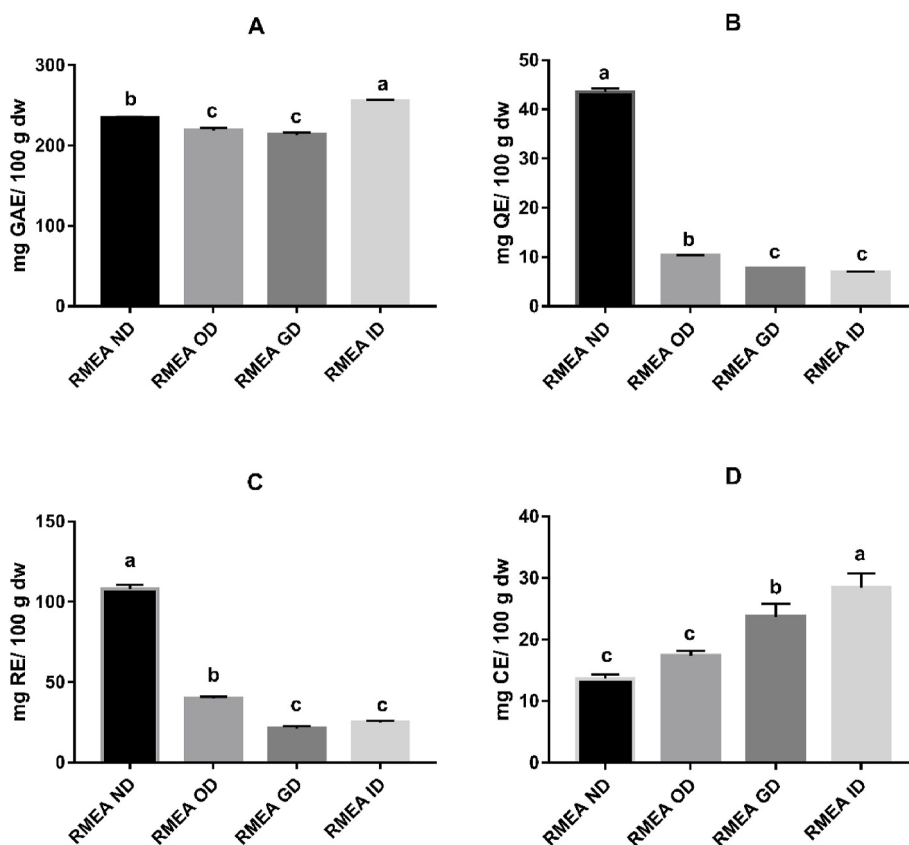


Fig. 1. Effect of *in vitro* digestion on the phenolic classes of the ethyl acetate fraction from the aerial parts of *Ranunculus macrophyllus* Desf.. A: Total polyphenols, B: Total flavonoids, C: Total flavonols, D: Condensed tannins. RMEA: *Ranunculus macrophyllus* ethyl acetate; ND: non-digested; OD: oral digestion; GD: gastric digestion; ID: intestinal digestion. Values are means of triplicates $\pm$ standard deviation (SD), values in columns with different letters are significantly different $p \leq 0.05$.

3.3.2. Antioxidant activity

The antioxidant activity of RMEA was measured against DPPH[•], ABTS^{•+} and the peroxy radical AAPH in the ORAC assay. Results were compared to antioxidant activity of commonly consumed fruits and vegetables. The effect of *in vitro* digestion on the antioxidant activity of RMEA is shown in Fig. 2.

RMEA showed good radical scavenging abilities against DPPH[•], ABTS^{•+} and peroxy radicals. The ABTS^{•+} quenching ability of RMEA was higher than it is in some extracts from regularly consumed vegetables and fruits, their activity ranged from 1.6 to 108 mM Trolox E/100 g dw (Yang et al., 2020). The antioxidant activity of RMEA against DPPH[•] was also higher than the tested fruits and vegetables from Algeria in the study of Djenidi et al. (2020). The radical scavenging ability of RMEA may be attributed to its polyphenols content, as polyphenols are the main antioxidants in plant extracts (Righi et al., 2020). Moreover, the radical scavenging ability of the ethyl acetate fraction from roots of *R. macrophyllus* Desf. was also highly correlated with its polyphenols content (Deghima et al., 2020).

The ability of RMEA to inhibit the free radical DPPH[•] was not significantly affected by the oral digestion, while after the gastric digestion a 23% decrease in the activity of the sample was measured, and in the intestinal digestion the activity decreased by 32% ($p \leq 0.05$). The effect of *in vitro* digestion on the inhibition of ABTS^{•+} radical followed the same trend, oral digestion slightly decreased this activity, gastric and intestinal digestion significantly affected the ABTS^{•+} inhibition, with a maximum loss of 34% after the intestinal digestion ($p \leq 0.05$). The DPPH[•] and ABTS^{•+} scavenging effects were found to be highly correlated with flavonoids and especially with flavonols content (r between 0.68 and 0.74) ($p > 0.05$), while they were negatively correlated with total polyphenols and condensed tannins content. The results were consistent with Yang et al. (2016) and Seraglio et al. (2017), who

also reported a decrease in the antioxidant activity of basil and ginger extracts after *in vitro* digestion.

On the other hand, the antioxidant activity as tested using the ORAC assay increased after each step of the digestion to reach a total increase of 43% at the gastric digestion stage. The increase in the ORAC value despite the decrease in total flavonoids and the relative stability of polyphenols may be attributed to the observed increase in the condensed tannins. The ORAC values were significantly correlated with condensed tannins ($r = 0.94$). The ethyl acetate fraction may also contain other non-phenolic compounds that cause the increase in ORAC values (Pavan et al., 2014). Yang et al. (2016) also reported that the *in vitro* digestion affected the antioxidant activity of ginger and basil when tested using ABTS^{•+} and FRAP but it did not have any significant effect when tested with the ORAC assay. On the other hand, Burgos-Edwards et al. (2017) reported that the effect of simulated GI digestion on the antioxidant activity depended on the assay being used showing higher or lower values. The different methods used may not detect the structural transformation in polyphenols and their related activity the same way (Pavan et al., 2014). Even after the entire digestion process the remaining antioxidant activity of RMEA was still higher than the antioxidant activity of fruits and vegetables reported in Yang et al. (2020) and Djenidi et al. (2020). This suggested that *R. macrophyllus* Desf. may be used for the development of new functional foods that have antioxidant activity even after digestion.

3.3.3. Extract characterization and compounds bioaccessibility

The compounds identified in RMEA using HPLC-DAD are shown in Table 4 along with their bioaccessibility.

The analysis showed the presence of 5 compounds, caffeic and p-coumaric acids were the two identified phenolic acids, in addition to three flavonoids: two flavones (apigenin and luteolin) and a flavanol

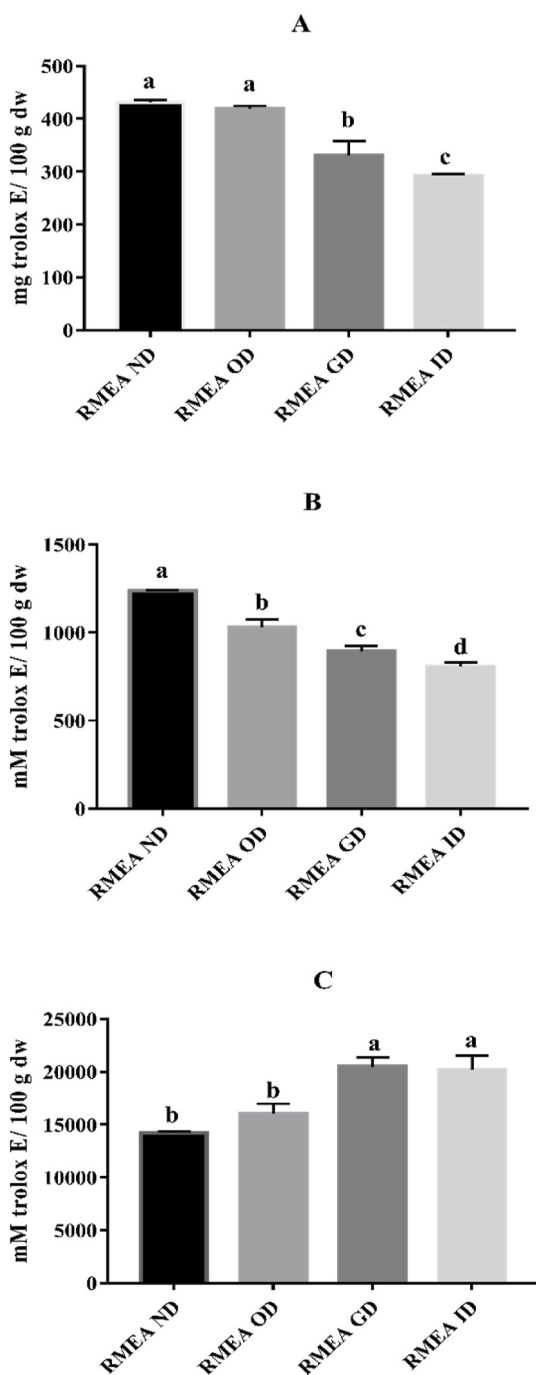


Fig. 2. Antioxidant activity of digested and non-digested ethyl acetate fraction from aerial parts of *Ranunculus macrophyllus* Desf. A: DPPH inhibition; B: ABTS inhibition; C: ORAC assay. RMEA: *Ranunculus macrophyllus* ethyl acetate; ND: non-digested; OD: oral digestion; GD: gastric digestion; ID: intestinal digestion. Values are means of triplicates $\pm$ standard deviation (SD), values in columns with different letters are significantly different $p \leq 0.05$.

(catechin), that was the major compound. *R. macrophyllus* Desf. had higher amounts of catechin than many varieties of apple, blackberry and mango, while it was not found in many vegetables (Arts et al., 2000). The luteolin content of *R. macrophyllus* Desf. was comparable to that of celery (8 mg/100 g dw) and broccoli (7.4 mg/100 g dw) and higher than green chili, carrot and white radish (Miean & Mohamed, 2001). Caffeic acid was previously reported in the roots of the same species but at higher levels (Deghima et al., 2020), and in other *Ranunculus* species, with *p*-coumaric acid, apigenin and luteolin, but these compounds were

not quantified (Aslam et al., 2012; Da-Cheng, 2018). Except for caffeic acid, all these compounds in *R. macrophyllus* Desf. have not been previously reported. Catechin had not been found previously in the genus *Ranunculus*.

Flavonoids such as catechin and luteolin are major cancer-preventive compounds of medicinal importance, they have anti-inflammatory, antimicrobial, antiulcer and hepatoprotective activities (Ahmadi et al., 2020). However, to exert these activities polyphenols need to reach the targeted tissues in adequate concentrations. Consequently, it is not enough to know the amount of a compound in a dietary supplement or a functional product, the amount of the compound that will be available for absorption into the systemic circulation should also be determined. Therefore, the bioaccessibility of the compounds was studied using an in vitro digestion model (Table 4).

Phenolic acids (caffeic and coumaric) were resistant to the in vitro digestion process. This was consistent with the spectrophotometric estimation of TPC that also showed high stability during the digestion process. Coumaric and caffeic acids did not show any significant variation compared to the non-digested sample during the GI digestion, which reflects their high bioaccessibility. These results were consistent with Seraglio et al. (2017) who reported the high stability of coumaric and caffeic acids during the digestion process, similarly to other phenolic acids and their derivatives (Gayoso et al., 2018). On the other hand, the flavonoids (catechin, luteolin and apigenin) were strongly affected by the in vitro digestion. At each step of the digestion there was a statistically significant decrease. These results were consistent with the spectrophotometric determination of TFC and FOL during the digestion process. The bioaccessibility of catechin was higher than luteolin during OD and GD, while in ID, luteolin had the best bioaccessibility. Apigenin was found at all stages but the quantities were below the quantification limit. The results were consistent with flavanols showing higher bioaccessibility than other classes of flavonoids. Gayoso et al. (2018) reported similar bioaccessibility values for luteolin derivatives found in *Lavandula latifolia* and *Origanum vulgare* extracts. The loss of flavonoids during oral and gastric digestion is supported by many studies, but the intestinal step appears to have more effect on their bioaccessibility. The loss of flavonoids during this step could be ascribed to their sensitivity to alkaline pH that can cause structure modifications. The interaction with the digestive enzymes and biliary salts could also reduce their bioaccessibility (Spínola et al., 2019). Gong et al. (2019), however, reported an increase in some phenolic compounds during the intestinal digestion compared to the undigested samples. The bioaccessibility of phenolic compounds depends on many factors including their own structure, physico-chemical properties and their interaction with digestive enzymes and pancreatin/bile salts (Gayoso et al., 2016; Seraglio et al., 2017).

4. Conclusions

R. macrophyllus Desf. can be considered as a valuable source of essential minerals (Fe, Zn, K and Na) especially for people with a mineral deficiency, its lipid fraction could be a valuable source of EFA in nutraceutical formulations and functional foods. RMEA showed high amounts of phenolic compounds and good antioxidant activity. Chromatographic analysis showed the presence of catechin, luteolin, caffeic acid and *p*-coumaric acid. Phenolic acids (caffeic acid and *p*-coumaric acid) showed good bioaccessibility during the simulated GI digestion. Despite the effect of simulated GI digestion, substantial antioxidant activity was observed after the intestinal digestion. The equilibrated nutritional profile and bioaccessible bioactive compounds combined with the strong antioxidant activity can make *R. macrophyllus* Desf. aerial parts a potentially good dietary supplement or a functional food ingredient.

Table 4Quantification of main compounds identified in the RMEA before and during *in vitro* digestion.

Compound	Rt (min)	ND (mg/100 g dw)	<i>In vitro</i> digestion (mg/100 g dw)		
			OD	GD	ID
Catechin	4.89	32 ^a ± 1	28.7 ^b ± 0.2	21.3 ^c ± 0.2	12.4 ^d ± 0.3
Caffeic	6.18	1.5 ^b ± 0.0	1.6 ^b ± 0.0	1.9 ^a ± 0.1	1.5 ^b ± 0.1
<i>p</i> -Coumaric	9.55	0.8 ^a ± 0.1	0.7 ^a ± 0.0	0.7 ^a ± 0.0	0.7 ^a ± 0.0
Luteolin	20.87	7.2 ^a ± 0.3	3.7 ^b ± 0.0	3.0 ^c ± 0.0	2.4 ^d ± 0.0
Apigenin	21.92	0.07 ± 0.0	BQL	BQL	BQL

BQL: Below quantification limit; ND: Before digestion; GD: Gastric digestion; ID: Intestinal digestion; OD: Oral digestion; RT: Retention time. Results are expressed as means of triplicates ± standard deviation. Values on the same line with different superscript letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

Authors contributions

A. Deghima: Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Review & Editing. D. Ansorena: Conceptualization, Validation, Resources, Review & Editing, Supervision. M. I. Calvo: Conceptualization, Validation, Resources, Review & Editing, Supervision. I. Astiasarán: Conceptualization, Validation, Resources, Review & Editing, Supervision. F. Bedjou: Conceptualization, Validation, Resources, Review & Editing, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors confirm that they have no conflict of interest with respect to the work described in this manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (DGRSDT/MESRS) through the National Exceptional Program (PNE) and the Plan de Investigación Universidad de Navarra (PIUNA). The authors are grateful to Gwenaëlle Cenicerros, Katherine Gutiérrez Luna and Righi Nadjat for their help and advices during the analysis of samples.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100904>.

References

- Adarkwah-Yiadom, M., & Duodu, K. G. (2017). Effect of extrusion cooking and simulated *in vitro* gastrointestinal digestion on condensed tannins and radical scavenging activity of type II and type III whole grain sorghum. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 2282–2294. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13510>
- Afify, A., Abdalla, A., Elsayed, A., Gamuhay, B., Abu-Khadra, A., Hassan, M., Ataalla, M., & Mohamed, A. (2017). Survey on the moisture and ash contents in agricultural commodities in Al-Rass governorate, Saudi Arabia in 2017. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 48(6), 55–62. <https://doi.org/10.21608/ajas.1999.5752>
- Ahmadi, S. M., Farhoosh, R., Sharif, A., & Rezaie, M. (2020). Structure-antioxidant activity relationships of luteolin and catechin. *Journal of Food Science*, 85(2), 298–305. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14994>
- Ahn-Jarvis, J., Parihar, A., & Doseff, A. (2019). Dietary flavonoids for immunoregulation and cancer: Food design for targeting disease. *Antioxidants*, 8(7), 202. <https://doi.org/10.3390/antiox8070202>
- Ait Chait, Y., Gunenc, A., Bendali, F., & Hosseini, F. (2020). Simulated gastrointestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of carob polyphenols: Bioaccessibility and bioactivity. *LWT – Food Science and Technology*, 117(October 2018), 108623. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108623>
- Ansorena, D., Echarte, A., Ollé, R., & Astiasarán, I. (2013). No trans fatty acids in Spanish bakery products. *Food Chemistry*, 138(1), 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.096>
- AOAC. (2003). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (17th ed.). Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Arts, I. C. W., Putte, B. Van De, & Hollman, P. C. H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1746–1751. <https://doi.org/10.1021/jf000025h>
- Aslam, M. S., Choudhary, B. A., Uzair, M., & Ijaz, A. S. (2012). The genus *Ranunculus*: A phytochemical and ethnopharmacological review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(5), 15–22.
- Barak, T. H., Celep, E., & Yesilada, E. (2019). Influence of *in vitro* human digestion on the bioavailability of phenolic content and antioxidant activity of *Viburnum opulus* L. (European cranberry) fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 131(January), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.037>
- Barros, H. D., de, F. Q., & Junior, M. R. M. (2019). Phenolic compound bioavailability using *in vitro* and *in vivo* models. In M. R. S. Campos (Ed.), *Bioactive compounds: Health Benefits and potential applications*. Oxford, UK: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00006-2>
- Burgos-Edwards, A., Jiménez-Aspee, F., Thomas-Valdés, S., Schmeda-Hirschmann, G., & Theodulou, C. (2017). Qualitative and quantitative changes in polyphenol composition and bioactivity of *Ribes magellanicum* and *R. punctatum* after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 237, 1073–1082. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.060>
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastro-intestinal digestion and *in vitro* colonic fermentation of spent coffee (*Coffea arabica* L.): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77(2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>
- Chaalal, M., Ydjedd, S., Harkat, A., Namoune, H., & Kati, D. E. (2018). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on antioxidant potential of three prickly pear variety extracts. *Acta Alimentaria*, 47(3), 333–339. <https://doi.org/10.1556/066.2018.47.3.9>
- Charles Aworh, O. (2015). Promoting food security and enhancing Nigeria's small farmers' income through value-added processing of lesser-known and under-utilized indigenous fruits and vegetables. *Food Research International*, 76(4), 986–991. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.003>
- Chen, J., Yao, C., Xia, L. M., & Ouyang, P. K. (2006). Determination of fatty acids and organic acids in *Ranunculus ternatus* Thunb using GC-MS. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 26(8), 1550–1552. In Chinese.
- Da-Cheng, H. (2018). Biodiversity, chemodiversity, and pharmacotherapy of *Ranunculus* medicinal plants. In H. Da-Cheng (Ed.), *Ranunculales medicinal plants: Biodiversity, Chemodiversity and pharmacotherapy* (pp. 357–383). London: Academic Press.
- Deghima, A., Righi, N., Rosales-Conrado, N., Leon-Gonzalez, M. E., Gomez-Mejía, E., Madrid, Y., ... Bedjou, F. (2020). Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. roots: Quantification, identification and antioxidant activity. *South African Journal of Botany*, 132, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.036>
- Deghima, A., Righi, N., Rosales-Conrado, N., Leon-Gonzalez, M. E., Gomez-Mejía, E., Madrid, Y., ... Bedjou, F. (2021). Anti-inflammatory activity of ethyl acetate and n-butanol extracts from *Ranunculus macrophyllus* Desf. and their phenolic profile. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, Article 113347. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113347>
- Dénes, A., Papp, N., Babai, D., Czúcz, B., & Molnár, Z. (2012). Wild plants used for food by Hungarian ethnic groups living in the Carpathian Basin. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(4), 381–396.
- Djenidi, H., Khenouf, S., & Bouaziz, A. (2020). Antioxidant activity and phenolic content of commonly consumed fruits and vegetables in Algeria. *Progress in Nutrition*, 22(1), 224–235. <https://doi.org/10.23751/pn.v22i1.7701>
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Domínguez-Avila, J. A., & González-Aguilar, G. A. (2019). Lipids. In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 273–292). Oxford, UK: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00013-0>
- Erdogan, T., Gonenc, T., Demirci, B., Kivçak, B., & Baser, K. H. C. (2014). Determination of fatty acid and essential oil constituents and biological activities on *Ranunculus pedatus* Subsp. *pedatus*. *Asian Journal Of Chemistry*, 26(7), 2156–2160. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.16762>
- Flyman, M. V., & Afolayan, A. J. (2006). The suitability of wild vegetables for alleviating human dietary deficiencies. *South African Journal of Botany*, 72(4), 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2006.02.003>
- García-Herreros, C., García-Íñiguez-de-Ciriano, M., Astiasarán, I., & Ansorena-Artieda, D. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of water extracts of *Borago officinalis* L: Influence of plant part and cooking procedures. *Italian Journal of Food Science*, 22(2), 156–164.

- Gayoso, L., Claerbout, A.-S., Calvo, M. I., Caverro, R. Y., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2016). Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the *in vitro* gastrointestinal digestion models. *Journal of Functional Foods*, 26, 428–438. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.003>
- Gayoso, L., Roxo, M., Caverro, R. Y., Calvo, M. I., Ansorena, D., Astiasarán, I., & Wink, M. (2018). Bioaccessibility and biological activity of *Melissa officinalis*, *Lavandula latifolia* and *Origanum vulgare* extracts: Influence of an *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 44(January), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.003>
- Gong, L., Li, Y., Zhang, Y., Wang, J., & Sun, B. (2019). *In vitro* evaluation of the bioaccessibility of phenolic acids in different whole wheats as potential prebiotics. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 100, 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.071>
- Guarrera, P. M., & Savo, V. (2016). Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 202–234. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.050>
- Harumi Idya, J., Fernandes, Á., Calhela, R. C., Alves, M. J., Ferreira, F. D., Barros, L., Amaral, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Nutritional composition and bioactivity of *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy: An underexploited edible wild plant. *Food Chemistry*, 295(February), 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.139>
- Jelena, C. H., Justyna, R. G., Neda, M.-D., Natasa, S., Artur, B., & Giuseppe, G. (2018). Beneficial effects of polyphenols on chronic diseases and ageing. In C. M. Galanakis (Ed.), *Polyphenols: Properties, recovery and applications* (pp. 69–102). Oxford, UK: Woodhead Publishing.
- Karik, U., Eryigit, T., Tuncuturk, R., & Tuncuturk, M. (2018). The mineral and nutrient contents of some edible wild plants grown in rural environment of eastern Anatolia, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(12A), 9076–9082.
- Kibar, B., & Temel, S. (2016). Evaluation of mineral composition of some wild edible plants growing in the eastern Anatolia region grasslands of Turkey and consumed as vegetable. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(1), 56–66. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12583>
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mouc, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Kumaran, A., & Karunakaran, R. J. (2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 40(2), 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.011>
- Miean, K. H., & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3106–3112. <https://doi.org/10.1021/jf000892m>
- Mrduljaš, N., Krešić, G., & Bilušić, T. (2017). Polyphenols: Food sources and health benefits. In M. C. Hueda (Ed.), *Functional food - improve health through adequate food* (pp. 23–41). London: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68862>
- Mzoughi, Z., Chahdoura, H., Chakroun, Y., Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Morales, P., Mosbah, H., Flamini, G., Snoussi, M., & Majdoub, H. (2019). Wild edible Swiss chard leaves (*Beta vulgaris* L. var. cicla): Nutritional, phytochemical composition and biological activities. *Food Research International*, 119, 612–621. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.039>
- Nakaya, S., Usami, A., Yorimoto, T., & Miyazawa, M. (2015). Characteristic chemical components and aromaactive compounds of the essential oils from *Ranunculus nipponicus* var. submersus used in Japanese traditional food. *Journal of Oleo Science*, 64(6), 595–601. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14265>
- Ouarghidi, A., Martin, G. J., Powell, B., Esser, G., & Abbad, A. (2013). Botanical identification of medicinal roots collected and traded in Morocco and comparison to the existing literature. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9, 59–72. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-59>
- Pavan, V., Sancho, A. R. S., & Pastore, G. M. (2014). The effect of *in vitro* digestion on the antioxidant activity of fruit extracts (*Carica papaya*, *Artocarpus heterophyllus* and *Annona marcgravii*). *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 59(2), 1247–1251. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.040>
- Pinacho, R., Caverro, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., & Calvo, M. I. (2015). Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*, 19, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.015>
- Prieto, J. M., Recio, M. C., Giner, R. M., Máñez, S., & Ríos, J. L. (2003). Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 131–137. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00271-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00271-X)
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3273–3279. <https://doi.org/10.1021/jf0262256>
- Rai, M., Acharya, D., & Ríos, J. L. (2011). *Ethnomedicinal plants: Revitalization of traditional knowledge of herbs*. Enfield, NH, USA: CRC Press.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Righi, N., Boumerfeg, S., Fernandes, P. A. R., Deghima, A., Baali, F., Coelho, E., Cardoso, S. M., Coimbra, M. A., & Baghiani, A. (2020). *Thymus algeriensis* Bioss & Reut: Relationship of phenolic compounds composition with *in vitro/in vivo* antioxidant and antibacterial activity. *Food Research International*, 136, Article 109500. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109500>
- Rivera, D., Obón, C., Heinrich, M., Inocencio, C., Verde, A., & Fajardo, J. (2006). *Gathered Mediterranean food plants – ethnobotanical investigations and historical development*. In M. Heinrich, W. E. Müller, & C. Galli (Eds.), Vol. 59. *Karger Local mediterranean food plants and nutraceuticals*. Basel: Switzerland.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Sánchez, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. In E. Shalaby (Ed.), *Antioxidants*. London: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Seraglio, S. K. T., Valse, A. C., Daguer, H., Bergamo, G., Azevedo, M. S., Nehring, P., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Oliveira Costa, A. C. (2017). Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys. *Food Research International*, 99(April), 670–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.024>
- Shaheen, S., Ahmad, M., & Haroon, N. (2017). Edible wild plants: A solution to overcome food insecurity. In S. Shaheen, M. Ahmad, & N. Haroon (Eds.), *Edible wild plants: An alternative approach to food security* (pp. 41–57). Cham, Switzerland: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63037-3>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- Sola-Larrañaga, C., & Navarro-Blasco, I. (2009). Chemometric analysis of minerals and trace elements in raw cow milk from the community of Navarra, Spain. *Food Chemistry*, 112(1), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.062>
- Spínola, V., Pinto, J., Llorent-Martínez, E. J., & Castilho, P. C. (2019). Changes in the phenolic compositions of *Elaeagnus umbellata* and *Sambucus lanceolata* after *in vitro* gastrointestinal digestion and evaluation of their potential anti-diabetic properties. *Food Research International*, 122(January), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.030>
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267–4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet*, 338(8773), 985–992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91558-P](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91558-P)
- Yang, M., Hardin, R., Ogutu, S., Verghese, M., & Boateng, J. (2016). Preliminary analysis of *in vitro* digestion and bioactivity assessment of basil and ginger in human liver cancer cell line. *Journal of Biological Sciences*, 16(6–7), 202–214. <https://doi.org/10.3923/jbs.2016.202.214>
- Yang, Q., Zhang, D., Kabeer, A., Yang, X., Li, H., Kong, K., Zhang, J., Chan, C., Lu, W., Corke, H., & Gan, R. (2020). Phytochemicals, essential oils, and bioactivities of an underutilized wild fruit Cili (*Rosa roxburghii*). *Industrial Crops and Products*, 143, Article 111928. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111928>. October 2019.

ملخص

نبات الموتور (*Ranunculus macrophyllus* Desf.) يستخدم تقليدياً لخصائصه الطبية وللطهي. الهدف من هذا العمل هو دراسة تركيبته الكيميائية، نشاطه البيولوجي وإمكانية التوفر البيولوجي لمركباته الفينولية. تم استخدام الاستخلاص الميثاني متبوعاً بالتجزئة السائلة - السائلة لاستخراج المركبات النشطة بيولوجياً، وقد تم استخدام طرق القياس الطيفي والكروماتوغرافي لدراسة التركيب الكيميائي لهذا النبات. بينما تم استخدام طرق مختلفة في المختبر وداخل الجسم الحي وخارجه لتقييم نشاط مضاد الأكسدة والمضاد للالتهاب ودعم الغشاء الخلوي بالإضافة إلى دراسة السمية وإمكانية التوفر الحيوي للمركبات الفينولية. أظهرت النتائج أن نبات الموتور غني جداً بالمركبات الفينولية، بحيث أظهر التحليل الكروماتوغرافي وجود 12 مركباً فينولياً موزعة بين الأحماض الفينولية والفلافونويد والستيلبين. أظهرت المستخلصات التي تم اختبارها نشاطاً ممتازاً كمضاد للأكسدة، وقدرة على حماية خلايا الدم الحمراء من هجمات الجذور الحرة والضغط الحراري وخفض التوتر. تمنع المستخلصات بشكل فعال الالتهاب الحاد عند الفئران. كانت هذه الأنشطة الحيوية مصحوبة بسمية حادة / شبه حادة منخفضة نسبياً مع إمكانية توفر بيولوجي جيدة جداً لمركبات البوليفينول. النتائج لا تظهر فقط سلامة نبات الموتور ولكن أيضاً الآثار الصحية الإيجابية المرتبطة بالاستهلاك المنتظم لهذا النبات.

كلمات المفتاحية: *Ranunculus macrophyllus* Desf، الموتور، المركبات الفينولية، مضادات الأكسدة، مضادات الالتهاب، السمية، التوفر البيولوجي

Abstract

Ranunculus macrophyllus Desf. is traditionally used for its medicinal and culinary properties. The goal of this work is to study its chemical composition, biological activities and the bioaccessibility of its phenolic compounds. Methanolic extraction followed by liquid-liquid fractionation were used to extract the bioactive compounds, while spectrophotometric and chromatographic methods were used to study the phytochemical composition of this plant. Different *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* methods were used to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, membrane stabilization activity, the toxicological profile and the bioaccessibility of phenolic compounds. The results show that *R. macrophyllus* Desf. is very rich in phenolic compounds, chromatographic analysis revealed the presence of 12 phenolic compounds distributed between phenolic acids, flavonoids and stilbenes. The fractions tested showed excellent antioxidant activity, an ability to protect red blood cells against free radical attacks and hypotonic and thermal stress. The fractions also effectively inhibited acute inflammation in mice. These bioactivities were accompanied by a relatively low acute / subacute toxicity and a very good bioaccessibility of the polyphenols. The results not only demonstrate the safety of *R. macrophyllus* Desf. but also the health promoting effects associated with the regular consumption of this plant.

Key words: *Ranunculus macrophyllus* Desf; polyphenols; antioxidant, anti-inflammatory; Toxicity; bioaccessibility

Résumé

Ranunculus macrophyllus Desf. est traditionnellement utilisé pour ses propriétés médicinales et culinaire. Le but de ce travail est d'étudier sa composition chimique, ses activités biologiques et la bio accessibilité de ses composés phénoliques. Une extraction méthanolique suivie d'un fractionnement liquide-liquide ont été utilisés pour extraire les composés bioactifs, alors des méthodes spectrophotométriques et chromatographiques ont été utilisées pour étudier la composition phytochimique de cette plante. Différentes méthodes *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydants, anti-inflammatoire, stabilisation membranaire, le profil toxicologique et la bio accessibilité des composés phénoliques. Les résultats montrent que *R. macrophyllus* Desf. est très riche en composés phénoliques, l'analyse chromatographique a révélé la présence de 12 composé phénoliques répartie entre acides phénoliques, flavonoïdes et stilbènes. Les fractions testées ont montré une excellente activité antioxydants, une capacité à protéger les globules rouges contre les attaques radicalaires et le stress hypotoniques et thermique. Les fractions ont efficacement inhibé l'inflammation aigue chez les souris. Ces bio activités se sont accompagnées par une toxicité aigüe/ subaigüe relativement faible et une très bonne bio accessibilité des polyphénols. Les résultats démontrent non seulement l'innocuité de *R. macrophyllus* Desf. mais aussi les effets favorables à la santé liés à la consommation régulière de cette plante.

Mot clés: *Ranunculus macrophyllus* Desf; polyphénols ; antioxydants ; anti-inflammatoire ; toxicité ; bio accessibilité