

Activités antioxydantes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle d'Algérie

[Antioxidant activities of polyphenol extracts from medicinal plants in Algerian traditional pharmacopoeia]

Boulanouar Bakchiche¹ and Abedelaziz Gherib²

¹Département de Technologie, Université de Laghouat, Algérie

²Département des Sciences, Université de Laghouat, Algérie

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Oxidative stress is responsible for several diseases. This phenomenon has moved researchers into action in looking for new remedies «antioxidants». In this context, the study of the antioxidant activity of hydro-ethanolic extracts of eight (08) plants used in Algerian pharmacopoeia has been performed. These plants are from Laghouat region ((Atlas Sahara). The extracts from these eight plants were obtained by *ultrasound* assisted *extraction*. The quantitative estimation of flavonoids, flavanones and total phenols by the spectrophotometric method showed that the eight extracts contain these compounds. The evaluation of antioxidant capacity by the method of free radical scavenging test showed that all of the extracts have a very good reductive activity, especially for *Arbutus unda* extract which presented a percentage of inhibition equal to 90% with an EC50 estimated to 0.006 mg/ml. On the other hand, the FRAP test revealed that the *Zizyphus lotus* extract has the best reducing power than those of the other extracts, but it remains relatively low compared to the ascorbic acid used as positive control.

KEYWORDS: Medicinal plants, flavonoids, flavanones, total phenols, antioxidant activity.

RESUME: Le stress oxydant, cause de plusieurs maladies, suscite la recherche de nouveaux remèdes antioxydants. Dans cette optique, l'étude de l'activité antioxydante des extraits hydro-éthanoliques de huit (08) plantes utilisées dans la pharmacopée algérienne a été réalisée. Ces plantes sont issues de la région de Laghouat (Atlas Saharien). Les extraits des huit plantes sont obtenus par la sonication. L'estimation quantitative des flavonoïdes, des flavanones et des phénols totaux par la méthode spectrophotométrique a montré que ces huit extraits contiennent ces composés. L'évaluation du pouvoir anti-oxydant par la méthode du piégeage des radicaux libres a montré que les extraits étudiés ont tous une très bonne activité réductrice, surtout pour l'extrait d'*Arbutus unedo* ayant présenté un pourcentage d'inhibition égale à 90% avec une EC50 égale à 0,003 mg/ml. D'autre part, le test de FRAP a révélé que l'extrait *Zizyphus lotus* a le meilleur pouvoir réducteur par rapport ceux des autres extraits, mais qui reste, toutefois, relativement faible par rapport à celui de l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif.

MOTS-CLEFS: Plantes médicinales, flavonoïdes, flavanones, phénols totaux, activité anti-oxydante.

1 INTRODUCTION

Artemisia campestris (Asteraceae), *Anthemis arvensis* (Asteraceae), *Haloxylon scoparium* (Chenopodiaceae), *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae), *Arbutus unedo* (Ericaceae), *Cytisus monspessulanus* (Fabaceae), *Thymus algeriensis* (Lamiaceae), *Zizyphus lotus* (Rhamnaceae) font partie des plantes de la gamme des plantes médicinales algérienne. Les résultats de nos travaux ayant pour objet une démarche contributive sur le screening phytochimique et antioxydant des extraits organiques des nos plantes; ce qui a permis d'une part, de mettre en évidence leur richesse en métabolites secondaires et de dépister d'autre part, leur pouvoir antioxydant.

Le présent travail se propose de quantifier les teneurs en composés phénoliques que renferment ces espèces végétales et d'évaluer leur pouvoir antioxydant.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Le matériel végétal est constitué de la partie aérienne de différentes plantes utilisées, récoltées de la région de Laghouat (400 km de la capitale Alger) en Avril 2010. Les échantillons sont séchés à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante et stockés soigneusement dans des sacs propres en vue de leur analyse (Tableau1). Les plantes ont été identifiées par monsieur M. KOUIDRI, botaniste au département de biologie à université de Laghouat (Algérie).

Table 1. Liste des plantes médicinales utilisées pour l'étude

Noms des plantes	Nom local	Famille	Organe utilisé
<i>Artemisia campestris</i> L.	Dgouft	Asteraceae	Fruites + Feuilles
<i>Anthemis arvensis</i> L.	Negd	Asteraceae	Fruites + Feuilles
<i>Haloxylon scoparium</i> Pomel	Remeth	Chenopodiaceae	Fruites + Branches
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	Aar-aar	Cupressaceae	Fruites + Feuilles
<i>Arbutus unedo</i> L.	Lendj	Ericaceae	Fruites + Feuilles
<i>Cytisus monspessulanus</i> L.	Gassa	Fabaceae	Partie aérienne
<i>Thymus algeriensis</i> Boiss et Reut	Djertil	Lamiaceae	Feuilles + Branches
<i>Zizyphus lotus</i> L. (Desf.)	Cedra	Rhamnaceae	Feuilles

2.2 EXTRACTION DES POLYPHÉNOLES

La méthode d'extraction des polyphénols a été réalisée par la sonication sur un bain de glace pendant 6 min en utilisant un appareil à ultrasons VIBRACELL VC300 avec une fréquence de 20 kHz. Un gramme de poudre sèche dans 7 ml d'une solution hydro-éthanolique (70%) a été utilisé. Après sonication, les échantillons ont été centrifugés pendant 20 min à 3000 tours/min à 20 °C et le surnageant a été prélevé et conservé à -20°C.

2.3 DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX

Les teneurs en composés phénoliques totaux ont été évaluées suivant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu [1].

2.4 DOSAGE DES FLAVONOÏDES

Les teneurs en flavonoïdes totaux ont été quantifiés par dosage direct par le trichlorure d'aluminium [2].

2.5 DOSAGE DES FLAVANONES ET DIHYDROFLAVONOLS

Les teneurs en flavanones et en dihydroflavonols ont été déterminées selon la procédure décrite par Popova et al., 2004 [3].

2.6 EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE PAR LE TEST DPPH

Cette activité est déterminée selon la méthode de Brand-Williams et al., 1995 [4]. Le radical DPPH est dissous dans du méthanol à une concentration de $6 \cdot 10^{-5}$ mol.l-1 et gardé à -20°C à l'abri de la lumière avant utilisation. A chaque extrait (0,1 ml) sont ajoutés 4 ml de solution de DPPH et l'absorbance est mesurée après 60 minutes à 517 nm. Le résultat est exprimé en micromoles d'équivalent Trolox par gramme de matière sèche.

2.7 ACTIVITE ANTIOXYDANTE MESUREE PAR LE RADICAL CATION ABTS

Le radical cation ABTS est généré en mélangeant à volume égal une solution de 2,45 mM de persulfate de potassium $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ et une solution stock d'ABTS à 7 mM, le tout est conservé à l'abri de la lumière et à la température ambiante durant 16 h avant utilisation [5]. La solution obtenue est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance comprise entre 0.7 et 0.8 à 734 nm. 990 μl de cette solution fraîchement préparée sont ajoutés à 10 μl d'extrait et la lecture est faite à 734 nm après 6 min pour chaque série d'analyses. Le BHT est utilisé pour le contrôle positif.

2.8 EVALUATION DU POUVOIR CHELATEUR DU FER FRAP

Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé selon la méthode d'Oyaisu., 1986 [6]. Dans un tube à essai contenant 0.1 ml de solution d'échantillon sont ajoutés 2ml de tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) puis 2 ml d'hexacyanoferrate de potassium $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (10g/l). L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 2 ml d'acide trichloracétique (100 g/l) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Enfin, 2 ml du surnageant ont été mélangés avec 2 ml d'eau distillée et 0,4 ml de chlorure ferrique $[\text{FeCl}_3]$ (1g/l). Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. La lecture est mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé pour le contrôle positif.

2.9 ANALYSE STATISTIQUE

Chaque expérience a été répétée trois fois. Les données obtenues ont été traitées par analyse de la variance et les moyennes significativement différentes ont été séparées en utilisant le logiciel SPSS au seuil de probabilité de 5 %.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 TENEURS EN PHENOLS TOTAUX ET EN FLAVONOÏDES

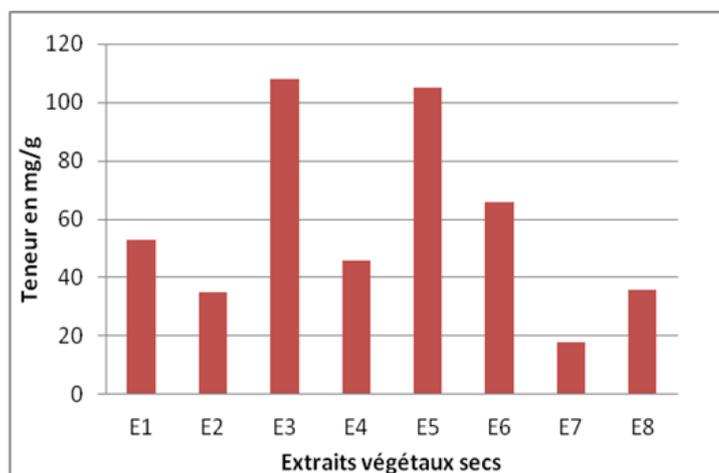
La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de plante est exprimée en milligrammes équivalents en acide gallique par gramme de la matière sèche, La teneur des flavonoïdes est exprimée en milligrammes équivalents en quercétine par gramme de la matière sèche et la quantification en flavanones et dihydroflavonols est exprimée en milligrammes équivalents en équivalent d'eriodictyol par gramme de la matière sèche.

La teneur en phénols totaux dans les extraits (E1-E8) varie entre $18,73 \pm 4,59$ et $108,41 \pm 4,59$ mg EAG/g de matière sèche (Figure 1). Les résultats indiquent que deux plantes ont les teneurs les plus élevées en phénols totaux à savoir: *H. scoparium* ($108,41 \pm 4,59$ mg EAG/g) et *A. unedo* ($104,98 \pm 4,59$ mg EAG), ensuite viennent *C. monspessulanus* et *A. campestris* avec des teneurs en phénols totaux respectives de $66,25 \pm 4,59$ mg EAG et $53,84 \pm 4,59$ mg EAG. Les quatre autres plantes ont des teneurs variant de $18,73 \pm 4,59$ mg EAG à $46,61 \pm 4,59$ mg EAG. Si l'on compare nos résultats avec ceux obtenus par rached et al., 2010 [7], l'on peut dire que presque tous nos extraits notamment *H. scoparium*, *A. unedo*, *C. monspessulanus* et *A. campestris* sont particulièrement très riches en substances phénoliques.

Au vu de la Figure 2, nous notons que la teneur en flavonoïdes totaux varie d'une plante médicinale à une autre (Figure 1). L'extrait *C. monspessulanus* enregistre la plus forte teneur ($20,44 \pm 0,54$ mg EQ/g de matière sèche) suivies des extraits *A. unedo* ($17,46 \pm 0,54$ mg EQ/g), *A. campestris* ($15,58 \pm 0,54$ mg EQ/g), *Z. lotus* ($14,79 \pm 0,54$ mg EQ/g) et *A. arvensis* ($10,92 \pm 0,54$ mg EQ/g). par contre les teneurs les plus faibles remarquer dans les extraits *H. scoparium* et *T. algeriensis* avec des teneurs $2,72$ et $2,10 \pm 0,54$ mg EQ/g respectivement.

Pour les différentes teneurs en flavanones et dihydroflavonols (Figure 3). Les valeurs les plus élevées sont observées avec les extraits de *A. arvensis* ($6,70 \pm 0,60$ mg/g de matière sèche). *C. monspessulanus* ($5,46 \pm 0,60$ mg/g) et de *Z. lotus* ($5,00 \pm 0,60$ mg/g). Les teneurs les moins élevées sont *H. scoparium* ($1,52 \pm 0,60$ mg/g) et *T. algeriensis* ($3,24 \pm 0,60$ mg/g).

Cette augmentation des teneurs phénoliques résulte vraisemblablement du fait que le dosage par le réactif Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif comme les protéines, les sucres, donnant un taux phénolique apparent élevé.



E1 : *A. campestris* ; E2 : *A. arvensis* ; E3 : *H. scoparium* ; E4 : *J. phoenicea* ;
E5 : *A. unedo* ; E6 : *C. monspessulanus* ; E7 : *T. algeriensis* ; E8 : *Z. lotus*

Figure 1: Histogramme de la teneur en phénols totaux dans les extraits E1-E8

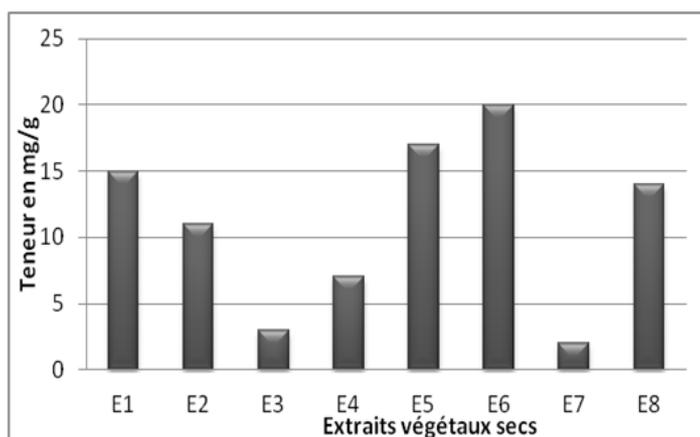


Figure 2: Histogramme de la teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits E1-E8

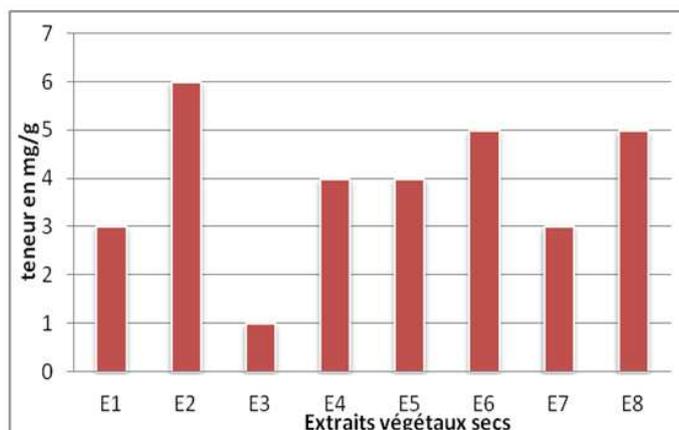


Figure 3: Histogramme de la teneur en flavanones et dihydroflavonols dans les extraits E1-E8

3.2 ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante in vitro a été évaluée de trois manières différentes : le test au DPPH, la technique de décoloration du radical cation ABTS et la mesure du pouvoir réducteur. Pour ce dernier test, les résultats obtenus (Tableau II) montrent que nos extraits présentent des absorbances élevées par rapport au control négatif. Les deux extraits de *A. unedo* et *Z. lotus* sont les plus actifs parmi les extraits testés suivi les extraits *A.arvensis*, *H. scoparium* et *T. algeriensis* respectivement, mais ces activités restent significativement identique à celle de l'acide ascorbique utilisé comme control positif. En ce qui concerne les activités de piégeage du radicaux DPPH et ABTS (Tableau II), nous remarquerons que les huit extraits réduisent la concentration de ce radical libre DPPH.

L'activité varie entre 0.006 et 0.235 mg/ml pour la méthode DPPH et 0.009 et 0.150 mg/ml pour la méthode ABTS (Tableau II). Les valeurs trouvées par le radical ABTS sont plus importantes que celles trouvées par le radical DPPH. Les extraits *A. unedo* et *C. monspessulanus* ont l'activité antioxydante la plus élevée par les deux méthodes de dosage par comparaison à celle de l'antioxydant synthétique BHT. Seules extraits présentant les valeurs les plus élevées en phénols, flavonoides totaux et dihydroflavonols ce qui suggère que les deux activités antioxydante soient en grande partie dues à la présence et la quantité en composés phénoliques.

Une corrélation négative a été trouvée entre la teneur des phénols totaux et l'activité anti-oxydante ABTS et DPPH (figures 4 et 5). Telle n'a pas été observé pour les flavanones et dihydroflavonols qui peut révéler l'importance d'autres groupes phénol dans la capacité de piéger les radicaux libre. Telle à également été déjà signalé par *Albano et Miguel 2011* [8] pour des extrais d'autres plantes. En conclusion, ces résultats préliminaires montrent que les huit extraits témoignent d'activités antioxydantes in vitro. D'autres études sont nécessaires pour évaluer le potentiel in vivo de ces extraits sur des modèles animales.

Tableau 2: Activités antioxydante mesurées par DPPH, ABTS et FRAP dans les extraits E1-E8

Extraits	Activité antioxydante (CE ₅₀ mg/ml)		
	DPPH	ABTS	FRAP
A. campestris	0.039 ± 0.018 ^{cd}	0.015 ± 0.002 ^e	ND
A.arvensis	0.191 ± 0.018 ^b	0.083 ± 0.002 ^d	0.017±0.006 ^{cd}
H. scoparium	0.044 ± 0.018 ^{cd}	0.027 ± 0.002 ^{de}	0.002± 0.006 ^d
J.phoenicea	0.029 ± 0.018 ^d	0.019 ± 0.002 ^e	ND
A. unedo	0.006 ± 0.018 ^d	0.009 ± 0.002 ^e	0.001± 0.006 ^d
C. monspessulanus	0.014 ± 0.018 ^d	0.009 ± 0.002 ^e	ND
T. algeriensis	0.235 ± 0.018 ^b	0.150 ± 0.002 ^c	0.025± 0.006 ^c
Z. lotus	0.042 ± 0.018 ^{cd}	0.049 ± 0.002 ^{de}	0.001± 0.006 ^d
Acide ascorbique	ND	ND	0.001± 0.006 ^d
BHT	0.089 ± 0.018 ^c	0.004 ± 0.002 ^e	ND

♦ Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P \leq 0.05$ avec le test de Newman
♦ND : non déterminer

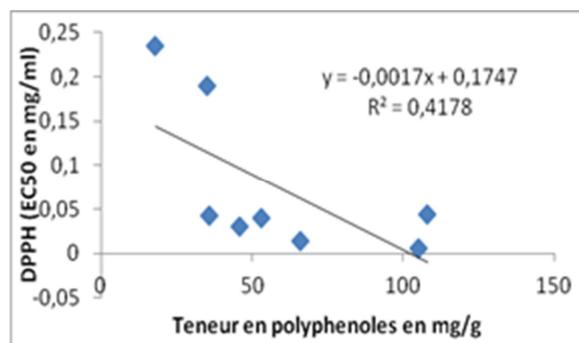


Figure 4 : Corrélation entre les valeurs d'activité antioxydante DPPH et des teneurs en phénols totaux

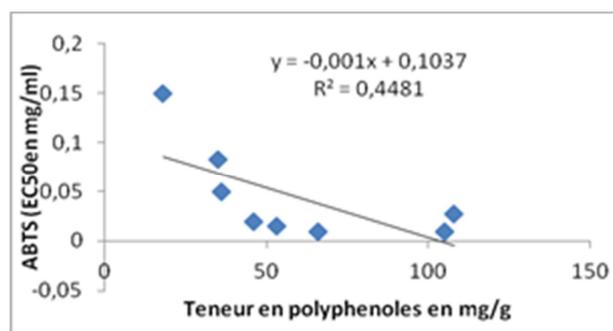


Figure 5 : Corrélation entre les valeurs d'activité antioxydante ABTS et des teneurs en phénols totaux

4 CONCLUSION

La présente étude s'est proposé de réaliser la quantification de composés polyphénoliques et l'évaluation par spectrophotométrie de l'activité antioxydante de huit plantes de la flore algérienne utilisées dans le traitement traditionnelle. Les résultats de cette présente étude indiquent que les plantes aromatiques sélectionnées sont riches en antioxydants tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et flavanones et dihydroflavonols qui possèdent la propriété de piéger les radicaux libres et de réduire les oxydants. L'étude confirme également une certaine corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire.

Un des résultats le plus important, c'est que l'extrait de la plante *A.unedo* découvre partiellement des activités antioxydantes très intéressantes, ce qui nous encourage d'investir dans ce domaine afin de caractériser les molécules responsables de ces activités par des méthodes chromatographiques tel que LC-MS. Ce travail a fourni de nouvelles connaissances ethnopharmacologiques et phytochimiques au sujet des plantes locales de la région de Laghouat et constitue une contribution à l'étude du rôle des polyphénols naturels dans la régulation du stress oxydatif.

REFERENCES

- [1] Slinkard K and Singleton VL (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. Am. J. Enol. Viticult. 28: 49-55.
- [2] Ahn, M; Kumazawa, S; Usui, Y; Nakamura, J; Atsuka, M; Zhu, F., Nakayama, T. (2007) Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food Chemistry. 101: 1400-1409.
- [3] Popova, M; Bankova, V; Butovska, D (2004) Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis Phytochem Analysis 15(4):235-40.
- [4] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 28, 25-30.
- [5] Dorman HJD, Hiltunen R (2004). Fe (II) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. Food Chem., 88: 193-199.
- [6] Oyaizu M. (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. Japn. J. Nutri. 44: 307-315.
- [7] Rached, W, H. Benamar, M. Bennaceur, A. Marouf 2010 screening of the antioxidant potential of some algerian indigenous plants, journal of biological sciences .10(4) : 316-324
- [8] Albano, S.M. and M.G. Miguel. 2011. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. Ind. Crop. Prod., 33: 338-343.