

Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressium*

Chahrazed HAMIA^{a,*}, Amel GUERGAB^a, Nour elhouda RENNANE^a, Meriem BIRACHE^a, Meriem HADDAD^a, Mokhtar SAIDI^b et Mohamed YOUSFI^a.

^a Laboratoire des Sciences Fondamentales, Université Amar Telidji Laghouat, Laghouat 03000 Algérie

^b Univ Ouargla, Fac. des Mathématiques et des Sciences de la Matière, Lab. Valorisation des Produits de Ressources Sahariennes, Ouargla 30 000 (Algérie)

E-mail : ch_hamia@hotmail.com

ملخص: لقد تم البحث عن كمية الفينولات الكلية و الفلافونويدات و كذا الفعالية المضادة للأكسدة لسيقان و أزهار نبتة *Rhanterium adpressium*. قمنا بتقدير كمية الفينولات الكلية بطريقة Singleton و Ross باستعمال حمض الغاليك كفينول معياري، أما كمية الفلافونويدات فكان تحديدها باستعمال طريقة Lamaison و Carnat. تمت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة اعتمادا على اختبار DPPH. أظهرت النتائج أن كمية الفينولات الكلية و الفلافونويدات تكون محصورة ما بين (0.09-10.50) ملغ/غ و (0.01-4.94) ملغ/غ على الترتيب و أن هذه الأخيرة تعتمد على نوعية المذيب المستعمل للاستخلاص. تبين أن مستخلص الكلوروفورم الناتج من نظام (أسيتون / ماء) يملك فعالية مهمة مقدرة بـ : 10.938×10^{-3} غ/ل، و أن الفعالية المضادة للأكسدة لجميع المستخلصات مستقلة عن كمية الفينولات.

الكلمات المفتاحية: *Rhanterium adpressium*، الفينولات، الفعالية المضادة للأكسدة

RÉSUMÉ : Les quantités en phénols totaux, en flavonoïdes et les activités antioxydantes des extraits de deux parties aériennes (tiges et fleurs) du *Rhanterium adpressium* ont été investiguées. La quantité des phénols totaux a été évaluée par le test de Singleton et Ross en utilisant l'acide gallique comme phénol standard. La quantité des flavonoïdes a été déterminée par la méthode de Lamaison et Carnat. L'activité antioxydante a été évaluée par le pouvoir de piéger le radical stable 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH). Les résultats montrent que les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits dépendent de la nature du solvant d'extraction et que les quantités sont rangées de 0.09- 10.50 mg. EAG/gMS pour les phénols totaux et de 0.01- 4.94 mg ER/g MS pour les flavonoïdes. L'extrait chloroformique issu du système hydroacétonique est le plus puissant antioxydant avec une valeur d'EC₅₀ égale à 9.38×10^{-3} g/L. Une indépendance entre les quantités en phénols totaux et les activités antioxydantes des extraits a été distinguée.

MOTS-CLÉS : *Rhanterium Adpressum*, phénols totaux, activité antioxydante.

ABSTRACT

The antioxidant activities, total phenolic, flavonoids contents of extracts from two different parts (stems and flowers) of *Rhanterium adpressium* were investigated. The antioxidant activities were evaluated using the scavenging of 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH.). The total phenolic content (TPC) was evaluated according to the Singleton and Ross assay in which gallic acid was used as standard. Flavonoids content were evaluated by using the Lamaison and Carnat method. The results show that the extraction yield depends on the nature of the solvents. The total phenolic compounds and flavonoids were in the range of 0.09- 10.50 mg. EAG/gMS and 0.01- 4.94 mg. ER/gMS respectively. The Chloroform extract exhibit the highest antioxidant activity with EC₅₀ value of 9.38×10^{-3} g/L. The antioxidant activities were independent from the amounts of phenolic compounds.

KEYWORDS: *Rhanterium Adpressum*, total phenols, flavonoids, antioxidant activity.

1. Introduction

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives. L'utilisation de ces plantes est encore aujourd'hui une des formes de médecine la plus répandue à travers le monde. Elles représentent la seule source de médicaments pour près de 90 % de la population de certains pays d'Afrique [1]. Le *Rhanterium adpressum* est un arbuste connu sous le nom de «Arfedj» [2], utilisé en médecine traditionnelle pour ses propriétés antidiurétiques et anti inflammatoire [3]. La présente étude est consacrée sur l'analyse qualitative du contenu en composés phénoliques des extraits de tiges et fleurs du *Rhanterium Adpressum*, et sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

La plante de *Rhanterium adpressum*, a été récoltée en Mars 2010 dans la région de Zélfana (Wilaya de Ghardaïa à 640 Km au Sud de la capitale Alger). La partie aérienne de la plante a été divisée en deux parties à savoir : tiges et fleurs. Ces deux parties de la plantes ont été séchées à l'obscurité pendant deux semaines.

2.2. Préparation des extraits

2.2.1. Macération

Des quantités de 10g de fleurs broyées et de tiges finement découpées sont macérées dans 100 mL de deux systèmes de solvants : mélange hydro- alcoolique (Méthanol/eau) (80/20 : v/v) et un mélange hydro acétonique (acétone/eau) (70/30:v/v) pendant 48 h à température ambiante. Les extraits sont filtrés, et les solvants organiques (Méthanol et Acétone) sont évaporés sous pression réduite à 40 °C. La phase aqueuse de chaque extrait est récupérée dans un flacon.

2.2.2. Extraction liquide-liquide

Chaque phase aqueuse est lavée avec un même volume de quatre solvants à polarité croissante a savoir : Hexane, Chloroforme, Acétate d'éthyle et le n- Butanol. Les phases organiques sont séchées par quelques grammes de sulfate de sodium anhydre puis filtrées et évaporées sous pression réduite à une température de 40°C, chaque résidu obtenu est pesé puis solubilisé dans 5ml de méthanol qui sont conservés au frais à 4°C.

3. Estimation quantitative des phénols totaux et des flavonoïdes totaux

Les teneurs en phénols totaux des différents extraits ont été déterminées par la méthode de Singleton et Ross qui s'avère la plus sensible [4, 5]. Un volume de 0,1 mL de chaque extrait est mélangé à 0,5 mL du réactif de Folin-ciocalteu (diluée 10 fois avec de l'eau distillée) et 2 mL d'une solution aqueuse de 10 % (m/V) de carbonate de sodium. Après 30 minutes d'incubation à la température ambiante, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 760 nm. Une courbe d'étalonnage est obtenue dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant une gamme de concentrations (0,05g/L- 0,3g/L) d'une solution aqueuse d'acide gallique. Les teneurs en phénols totaux des extraits des différentes parties de la plante sont déterminées graphiquement et exprimées en termes d'équivalent d'acide gallique (mg/g de matière sèche).

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Lamaison et Carnat utilisant le tri chlorure d'aluminium [6]. Un volume de 1ml de chaque extrait est mélangé avec 1 ml d'une solution méthanolique de 2% de chlorure d'aluminium. Après incubation à l'obscurité pendant 20min, l'absorbance du mélange est mesuré à 409nm contre un blanc en employant un spectrophotomètre UV-Visible. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la rutine comme flavonoïde de référence. Une solution de 0.2g/l de la rutine préparée dans le méthanol est diluée pour obtenir des solutions de concentration de 0.1g/l à 0.06g/l.

La teneur en flavonoïdes dans chaque extrait est calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes par gramme de la matière sèche équivalent en rutine.

4. Evaluation de l'activité antioxydante par le test au DPPH

La mesure de l'activité antioxydante des différents extraits a été effectuée par l'estimation du pouvoir de piéger le radical stable 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) par les extraits [8]. Un millilitre de chaque extrait dilué dans le méthanol est additionné à un volume de 1mL de DPPH (500 µM) préparé également dans le méthanol. Après homogénéisation, le mélange est incubé 30 minutes à la température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition du DPPH (\%)} = (1 - (\text{DO}_{\text{solution}} / \text{DO}_{\text{blanc}})) \times 100 \quad (1)$$

Où DO représente la densité optique.

Les mesures de l'absorbance de chaque solution d'extrait à différentes concentrations nous ont permis de tracer les courbes des variations des absorbances en fonction des concentrations et de calculer à partir de ces courbes les valeurs de EC_{50} qui représentent les concentrations nécessaires pour neutraliser 50% de taux des radicaux libres initialement présents dans le mélange. Egalement, nous avons testé la vitamine C comme antioxydant de référence afin de comparer les pouvoirs antioxydants de nos extraits.

5. Résultats et discussion

5.1. Estimation quantitative des phénols totaux et des flavonoïdes totaux.

Tableau 1 : Quantité des phénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits tiges de *Rhanterium adpressum*.

Extrais	Teneurs des phénols totaux ^(a)		Teneurs des flavonoïdes totaux ^(b)	
	Méthanol/eau	Acétone/eau	Méthanol/eau	Acétone/eau
Hexane	0.15	0.09	0.02	0.05
Chloroforme	0.52	0.52	0.02	0.23
Acétate d'éthyle	8.79	7.30	3.25	2.37
n-Butanol	2.30	2.63	0.73	1.09

(a)mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche (mg EAG/g MS).

(b)mg d'équivalent de rutine par g de matière sèche (mg ER/g MS).

Tableau 2 : Quantité des phénols totaux et des flavonoïdes totaux dans les extraits fleurs de *Rhanterium adpressum*.

Extrais	Teneurs des phénols totaux ^(a)		Teneurs des flavonoïdes totaux ^(b)	
	Méthanol/eau	Acétone/eau	Méthanol/eau	Acétone/eau
Hexane	0.09	0.15	0.03	0.01
Chloroforme	0.39	0.37	0.38	0.10
Acétate d'éthyle	10.50	9.92	4.94	4.81
n-Butanol	4.50	2.92	1.86	0.96

(a)mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche (mg EAG/g MS).

(b)mg d'équivalent de rutine par g de matière sèche (mg ER/g MS).

Dans les Tableaux 1 et 2, nous présentons les résultats relatifs aux quantités des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes. Nous rappelons que les quantités des phénols totaux et des flavonoïdes ont été déterminées dans quatre fractions d'extraction obtenues à partir de l'extrait aqueux et en utilisant quatre solvants organiques à polarité croissante : hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et le butanol. Les résultats du dosage révèlent que la quantité des composés phénoliques dans les extraits bruts est plus importante en utilisant le système hydrométhanolique comme solvant d'extraction comparativement au système hydroacétonique. Ces résultats expriment ainsi la bonne capacité du méthanol à faire extraire les composés phénoliques. Nous constatons aussi que la quantité en phénols totaux est variable d'un système solvant à un autre et d'une fraction à une autre.

La plus grande quantité en phénols totaux est enregistrée dans les fractions acétate d'éthyle et cela quel que soit le solvant d'extraction. Ces quantités sont égales à 8.79 mg EAG/gMS pour les tiges et 10.50 mg EAG/gMS pour les fleurs en utilisant le système hydrométhanolique comme solvant d'extraction, par contre ces quantités démuniraient lorsqu'on utilise le système solvant hydroacétonique, les valeurs des quantités sont : 7.30mg EAG/gMS pour les tiges et 9.92mg EAG/gMS pour les fleurs. Les fractions butanoliques renferment aussi des quantités en composés phénoliques importantes, on enregistre les quantités suivantes 2.30mg EAG/gMS pour les tiges et 4.50mg EAG/gMS pour les fleurs et cela dans les extraits hydrométhanoliques, par contre les quantités sont voisines dans le cas des extraits hydroacétoniques ; 2.63mg EAG/gMS pour les tiges et 2.92mg EAG/gMS pour les fleurs. Mis à part les fractions acétate d'éthyle et butanol les deux autres fractions hexaniques et chloroformiques contiennent moins de quantité en phénols totaux. Si on compare la quantité des composés phénoliques dans les plantes étudiées. Comparativement à d'autres plantes médicinales locales déjà étudiées et qui appartiennent à la même famille que notre plante (*Asteraceae*) telles que : *Anthemis arvensis* (32.32mg EAG/gMS), *Artemisia campestris* (20.38mg EAG/gMS) et *Artemisia herba halba* (13.06mg EAG/gMS), on peut dire que notre plante est relativement faible en composés phénoliques [8]. Mais si on la compare à d'autres plantes appartenant à d'autres familles telles que : *Salvia verbenaca* (10.81mg EAG/gMS), *Thapcia garganica* (1.84mg EAG/gMS) et *Arenarea rubra* (6.21mg EAG/gMS) [9], il est clair qu'elle représente une source prometteuse en ces composés.

La quantité des flavonoïdes dans les différentes fractions est inférieure à celle des phénols totaux. Les fractions d'acétate d'éthyle sont les plus riches en flavonoïdes, les quantités varient de 2.37 mg ER/g MS dans les tiges à 4.94mg ER/g MS dans les fleurs, suivies par les fractions butanoliques dont les quantités s'échelonnent de 0.73mg ER/g MS dans les tiges à 1.86mg ER/g MS dans les fleurs. Il est important de noter que les fractions chloroformique et hexanique sont moins riches en flavonoïdes par rapport aux deux autres fractions, et que les flavonoïdes dans la fraction chloroformique de fleurs pour le système de solvant méthanol/eau représentent 97% de la quantité des phénols totaux.

L'examen de ces résultats nous a permis de trouver une corrélation linéaire entre la quantité en flavonoïdes et la quantité en composés phénoliques totaux (Figure -1-). Ce résultat peut être traduit par le fait que la quantité en flavonoïdes varie proportionnellement avec tout le contenu en phénols totaux d'un extrait à un autre et d'une fraction à une autre.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols [10].

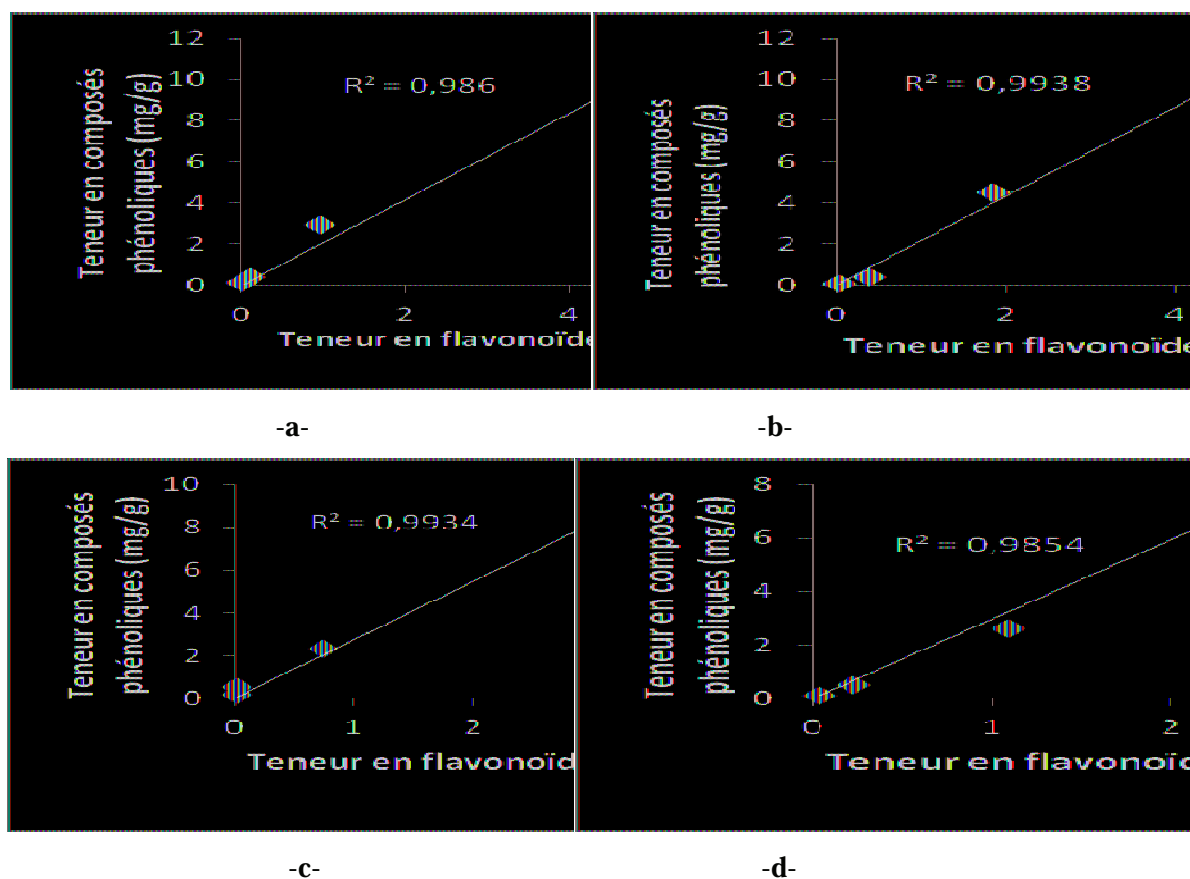


Figure 1 : Variation de la teneur en composés phénoliques en fonction de la teneur en flavonoïdes (-a- Fleurs: Méthanol/eau, -b- Fleurs: Acétone/eau, -c- Tiges: Méthanol/eau, -d- Tiges: Acétone/eau)

5.2. Activité antioxydante des extraits

L'activité antioxydante de tous les extraits a été évaluée par le test DPPH, ce test nous a permis de déterminer la capacité de nos extraits à neutraliser le radical stable DPPH présent dans le milieu réactionnel. L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par le calcul de la valeur EC_{50} qui indique la concentration nécessaire de l'extrait qui inhibe 50% du radical libre DPPH. Il est à noter que plus la concentration de l'extrait est petite plus l'extrait est un bon antioxydant.

Les résultats relatifs à ce test sont consignés dans le Tableau 3. D'après ces résultats, on remarque que les valeurs d' EC_{50} varient d'une fraction à une autre et que les extraits des tiges sont généralement les plus antioxydants par rapport aux extraits des fleurs car les valeurs d' EC_{50} dans les extraits des tiges sont relativement faibles par rapport à celles des extraits de fleurs. Il faut noter que la plus petite valeur d' EC_{50} (l'extrait le plus antioxydant) est enregistrée dans la fraction chloroformique des tiges issue de l'extrait hydroacétonique, malgré qu'elle ne contienne pas une grande quantité en phénols totaux ni en flavonoïdes par rapport aux autres fractions telles que l'actétate d'éthyle et butanol. Ce résultat peut être expliqué que cette fraction chloroformique renferme des molécules en petites quantités et qui sont douées par des activités antioxydantes importantes.

Afin de comparer l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons également calculé la valeur d' EC_{50} de la vitamine C commerciale utilisée comme antioxydant de synthèse dans les industries agroalimentaires, nous avons remarqué que tous ces extraits ont un pouvoir antioxydant très faible par rapport à la vitamine C ($EC_{50} = 6.6 \times 10^{-5} \text{ g/l}$).

Nous n'avons pas trouvé une corrélation linéaire qui relie les valeurs d'EC₅₀ et les quantités en phénols totaux ou en flavonoïdes. Ce résultat est attendu car d'après les valeurs consignées des tableaux 1, 2 et 3 qui montrent une indépendance de l'activité antioxydante aux quantités des phénols totaux et des flavonoïdes. La seule explication de cette indépendance est que l'activité antioxydante des extraits de cette plante dépend des structures chimiques des composés antioxydants renfermés dans ces extraits. Une étude approfondie est nécessaire afin de caractériser les molécules responsables à l'activité antioxydante, et par conséquent établir une relation activité-structure chimique.

Tableau 3 : Le pouvoir d'inhibition EC₅₀ (g/l) des extraits tiges et fleurs de *Rhanterium adpressum*

Extraits	Tiges		Fleurs	
	Méthanol/eau	Acétone/eau	Méthanol/eau	Acétone/eau
Hexane	4.78	5.21	4.87	4.57
Chloroforme	0.02	9.38x10 ⁻³	0.02	4.07
Acétate d'éthyle	0.01	0.01	2.90	0.03
n-Butanol	0.02	0.01	0.01	0.03

6. Conclusion

Ce travail nous a permis de faire une étude phytochimique de deux parties aériennes de la plante *Rhanterium adpressum* (tiges et fleurs). Cette étude a été consacrée à la quantification des phénols totaux et des flavonoïdes ainsi d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits des deux parties de la plante (Tiges et fleurs). Les résultats indiquent que les tiges et les fleurs de la plante ne contiennent pas les mêmes quantités en composés phénoliques et que les solvants d'extraction ont une influence sur la teneur en phénols totaux ainsi sur le pouvoir antioxydant.

De même l'activité antioxydante des extraits de la plante est indépendante des quantités des phénols totaux ce qui suppose l'existence dans les extraits des molécules antioxydante en très petites quantités et par conséquent il faut continuer l'étude afin d'isoler et caractériser les molécules responsables à cette activité et de déduire des relations structure chimique-activité.

Références

- [1] Cong A.; *phytochemical investigation of plants used in African traditional medicin* thèse de doctorat 17 décembre 2002.
- [2] Chehma A.; *Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional Algérien*; Ed: Dar El Houda, 140 (2006).
- [3] Bouheroum M., Benayache S., Benayache F., Zaiter L., Barrera J.M. et Francisco L.; *Terpenoids and Triynepoxide from the aerial parts of Rhanterium adpressum*, Chemistry of Natural compounds, 110-111 (2007).
- [4] Singleton V.L. and Ross J.A.; *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158 (1965).
- [5] Vermerris W. and Nicholson R.; *Phenolic compounds biochemistry*. Library of congress, 276 (2006).
- [6] Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards JF. and Stocker P.; *Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity*, European Food Research and Technology, 801-809 (2007).
- [7] Bondet V., Brand-Williams W. and Berset C.; *Kinetics and Mechanisms of antioxidant activity using the DPPH Free Radical Method*, Lebensm.-wiss. Technol, 609-615 (1997).

- [8] Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. and Vidal N.; *Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds*, Food Chemistry, 654-660 (2006).
- [9] Djeridane A., Yousfi M., Brunel J. M. and Stocker P.; *Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from Cleome arabica in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants*, Food and Chemical Toxicology, 2599-2606 (2010).
- [10] Aganga A.A. and Mosase K.W.; *Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of Lonchocarpus capussa, Ziziphus mucropata, Sclerocarya birrea, Kirkia acuminata and Rhus lancea seeds*. Animal Feed Science and Technology, 107-113 (2001).