

Eude phytochimique et activité antioxydante de quelques plantes antidiabétique au niveau de la wilaya de mascara

Ouldyerou k.^{1*}, Righi S.¹, Meddah B.¹ et Tir touil A.¹, Bouhadi D.¹ et Hariri A.¹

¹ Laboratoire de Bioconversion ; Génie microbiologique et sécurité sanitaire, Faculté des sciences ; Département de biologie ; Université de Mascara -Algérie

Abstract. An ethnobotanical survey of 40 individuals in the Wilaya of mascara identified 40 medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus. Among these plants, *Malva Sylvestris*, *Olea Europea Sylvestris*, *Citrus Aurantium* have been selected. The objective of our work is the phytochemical study and the antioxidant activity of the 3 plants selected. The raw methanolic extracts of *malva sylvestris* and their stems, *olea europea sylvestris* and *citrus aurantium* were obtained by the extraction method: maceration. The quantitative determination of total polyphenols by the Folin Ciocaltieu method and the flavonoids in the presence of AlCl₃, the total polyphenol content in *malva sylvestris* and their stems, *olea europea sylvestris* and *citrus aurantium* represents 556.33 µg EAG / g MS and 443.33ug EAG / G Ms; 557.66 g EAG / g Ms 447.77 µgEAG / gMS. The content of flavonoids is 1032.33 µg EQer / g Ms 898.66ug EQer / g Ms894.33, µg EQer / g Ms 1428.33 µgEQer / g MS. Antioxidant activity of the extracts prepared was measured by two methods. The first is the use of free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and the second reducing power of FRAP iron. These methods show that these plants have good antioxidant activity.

Keywords: *olea europea malva sylvestris, citrus aurantium, total polyphenols, flavonoids,, antioxidant activity, diabetes sweetened.*

Résumé. Une enquête ethnobotanique réalisée auprès 40individus de la wilaya de mascara a permis de recenser 40 plantes médicinales utilisé pour le traitement de diabète sucré. Parmi ces plantes *malva sylvestris ,olea europea sylvestris , citrus aurantium* ont été sélectionnées. l'objectif de notre travail est l'étude phytochimique et l'activité antioxydante des 3 plantes sélectionnées . Les extraits méthanoliques bruts de *malva sylvestris* et leur tiges, *olea europea sylvestris* et *citrus aurantium* ont été obtenus par la méthode d'extraction: macération. Le dosage quantitative des poly phénols totaux par la méthode du Folin Ciocaltieu et des flavonoïdes en présence de AlCl₃,la teneur de polyphénols totaux dans *malva sylvestris* et leurs tiges , *olea europea sylvestris* et *citrus aurantium* représente 556.33 ug EAG/g MS et 443.33ug EAG/g Ms; 557.66ug EAG/g Ms;447.77 ugEAG/gMS. La teneur de flavonoïdes est de 1032.33 ug EQer/g Ms 898.66ug EQer/g Ms894.33,ug EQer/g Ms 1428.33 ugEQer/g MS. Activité antioxydante des extraits préparés a été mesurée par deux méthodes. La première c'est l'utilisation de radical libre 1, 1-diphényl-2 - picrylhydrazyle (DPPH) et la deuxieme pouvoir réducteur du fer FRAP.Ces méthodes montrent que ces plantes ont une bonne activité antioxydante .

Mots clés: *olea europea malva sylvestris, citrus aurantium, polyphénols totaux, flavonoides, , activité antioxydante, diabete sucré.*

1. Introduction

* Corresponding author.

E-mail: mhanine11@yahoo.fr (Ouldyerou k.).

Address: Laboratoire de Bioconversion ; Génie microbiologique et sécurité sanitaire, Université de Mascara –Algérie.

Le diabète sucré est considéré comme un des fléaux du troisième millénaire. L'approche ethnopharmacologique est d'une grande importance dans ce domaine. Elle permet de recenser les remèdes antidiabétiques et de constituer une base de données des plantes médicinales afin de conserver un savoir ancestral qui s'appuie essentiellement sur une tradition orale. *malva sylvestris* famille des Malvaceae ; *olea europea* famille des Oleaceae et *citrus aurantium* famille des Rutaceae ,ces trois plantes sont riches en métabolites secondaires et sont utilisés pour traiter le diabète sucre.

1. Matériels utilisés

1.1. Matériels végétaux

A partir des résultats de l'enquête ethnopharmacologique et des données bibliographiques, nous avons sélectionné trois plantes médicinales sur les quelles porte notre étude expérimentale :

- *Olea europaea sylvestris*
- *Citrus aurantium*
- *Malva sylvestris*

3. Méthodes

3.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Après collecte, le matériel végétal est bien nettoyé, lavé avec l'eau de robinet puis dans de l'eau distillée. Puis essuyé et séché dans un endroit aéré et frais et à l'abri de soleil. Après séchage les plantes sont concassées.

L'extrait brut des plantes est obtenu par macération, opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant (méthanol) . La séparation se fait par filtration. Elle est utilisée couramment dans l'extraction des terpènes, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des acides gras, des amines.....etc.

La poudre végétale (*citrus aurantium* , *olea europaea sylvestris* , *malva sylvestris*) sont mise à macérer pendant 24 heures à température ambiante, dans un mélange méthanol-eau (80/20 ;V/V). L'extraction est refaite 3 fois avec renouvellement du solvant. Les macérats sont réunis et filtrés sur papier filtre. Le solvant est éliminé du filtrat sous vide à 45°C à l'aide d'un Rotavapeur.

3.2. Dosage des phénols Totaux

Dans des tubes à essai on introduit un volume de 100 µl d'extrait végétal brut avec 500 µl du réactif folin-Ciocalteu (1N) après 4 min on ajoute 400µl de carbonate de sodium Na₂CO₃ (20%), L'ensemble est incubé à une température ambiante pendant 1heure 30 min.La lecture est effectuée contre un blanc sans extrait à l'aide d'un spectrophotomètre à 760 nm

▪ Préparation de la courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de l'acide gallique comme contrôle positif.

La teneur en polyphénols totaux des extraits des plantes étudiées est exprimée en milligramme (mg) équivalent de l'acide gallique par 100 gramme de la matière végétale sèche (mg EC/100g).

▪ Expression des résultats

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$) établie avec des concentrations précises d'acides gallique Comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon

3.3. Dosage des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium

▪ Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation de complexes entre les composés phénoliques et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits sont de couleur jaune absorbent dans le visible à 510 nm. (G.Alyafi ,2007)

▪ Mode opératoire

Dans des tubes à essai on introduit 500 ul de l'extrait de l'échantillon.Mélangés avec 150 ul d'eau distillée Suivis de 150 ul de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5%.Mélanger et laissé agir pendant 5 min .Après ajouté, 150 ul de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10% (m/v) est ajouté au mélange .Après 6 min d'incubation à la température ambiante

150 ul de NaOH (1M) additionné Immédiatement, Le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu.L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre un blanc.

▪ Préparation de la courbe d'étalonnage

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercitrine (1%) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait .les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercitrine par gramme de matière sèches totales (MST).

3.4. Tests, in vitro, de l'activité antioxydante

3.4.1. Méthode DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl)

▪ Principe

L'activité antiradicalaire des composés polyphénoliques contenus dans les extraits préparés est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (capté par les produits testés). (Zeghad ,2009)

▪ Mode opératoire

Préparer une séries de dilution contenue 5 tubes la solution mère ajouté dans le1er 10ml de méthanol, 10 mg d'échantillon de méthanol les 4 tubes reste contient que 5 ml de méthanol dans chaque tube .

- préparer le blanc : 750 ul de méthanol, DPPH 1,5 ml
- pour chaque tube fait 3 essais (répétition) : 750 ul d'échantillon, 1,5 ml de DPPH.

▪ Expression des résultats

$$\% \text{ de piégeage} = [(A1-A2)/A1] * 100$$

A 1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait) le blanc.

A2 : absorbance en présence d'extrait.

Chaque test est répété trois fois, les résultats ont été présentés par la moyenne des trois essais.

▪ Calcul des IC₅₀

IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH•. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. (Pokorny et al., 2001)

3.4.2. Test du pouvoir antioxydant par Réduction du Fer (FRAP)

▪ Principe

L'évaluation est basée sur la réaction de réduction du (Fe+3) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en (Fe+2), la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe+3) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe+2), l'intensité de cette coloration est mesuré par spectrophotomètre à 700 nm. (F.Belkhiri, 2009)

▪ Mode opératoire

Préparer une série de dilution contenue 5 tubes la solution mère ; ajouté dans le 1er tube 10 ml de méthanol, 10 mg d'échantillon, les 4 tubes reste contient que 5 ml de méthanol dans chaque tube

- Le blanc : 1,25 ml de solution tampon phosphate, 1,25, cyanure de potassium, 500 ul de méthanol

- pour chaque tube on fait 3 essais 1,25 ml de tampon phosphate, 1,25 ml potassium hexoferrocyanure, 500 ul d'échantillon.

- homogénéisation et incubation 30 min à 50°C

ajouter 1,25 ml de trichloracétique a 10%

- centrifugation 3000/10 min

- récupérer le surnagent

- ajouter 1,25 ul de surnagent ,

- 1,25 ul H₂O ,

- 250 ul de FECL3
- mélanger et lire l'absorbance a 700 nm .

▪ **Expression des résultats**

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

4. Résultats et Discussion

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin- Ciocalteu. On a trouvé que *Olea europea* et *Malva sylvestris* ont riche en poléphénols (557 ,66 µg de EAG/plante et 556,33) par contre les teneurs en poléphenosls de *Citrus aurantium* et les tiges de *Malva sylvestris* moins élevés que les autre (477,77 et 443, 33µg EAG /plante) respectivement. Les résultats montrent que les composés phénoliques sont abondants dans les plantes étudiées. La teneur élevé en polyphénols dans l'extrait hydrométhanolique est liée à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires (Ghedadba et al., 2014)

(Faten et al., 2013) ont réalisé des dosages quantitatifs de l'extrait méthanolique des feuilles de l'olivier de deux variétés chemlali et neb jmel en Tunisie, ils ont montrés que la teneur en polyphénols totale des feuilles de chemlali (de 219,85 octobre à 464,27 mg/100 g janvier) est la variété de neb jmel (de 197,60 octobre à 270,53 mg/100 g ps janvier). Or, notre récolte des feuilles de l'olivier sauvage a été faite au mois de Mars. Ce qui confirme que le maximum des polyphénols totaux a été obtenu dans la phase terminale de la croissance des feuilles c'est-à-dire le mois Mars, montrant la pauvreté de notre variété en polyphénols totaux. Cette différence de teneur peut être dépendre également du profil variétal (exemple *sylvestris*) et de la zone géographique, ainsi, la variation de teneurs en polyphénols semble être liée à la zone géographique oléicole (**Baccouri et al., 2007 ; Rotondi et al., 2004**).

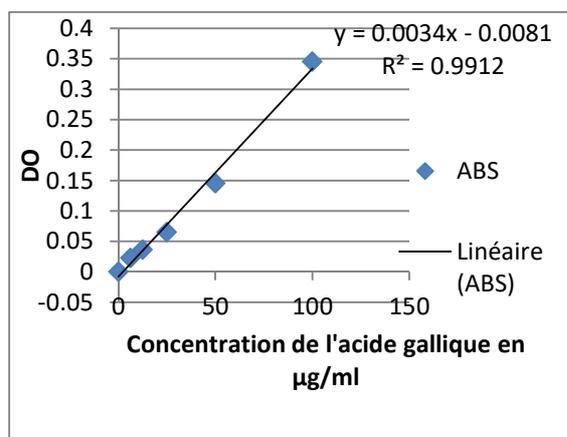


Figure1: courbe d'étalonnage de l'acide gallique

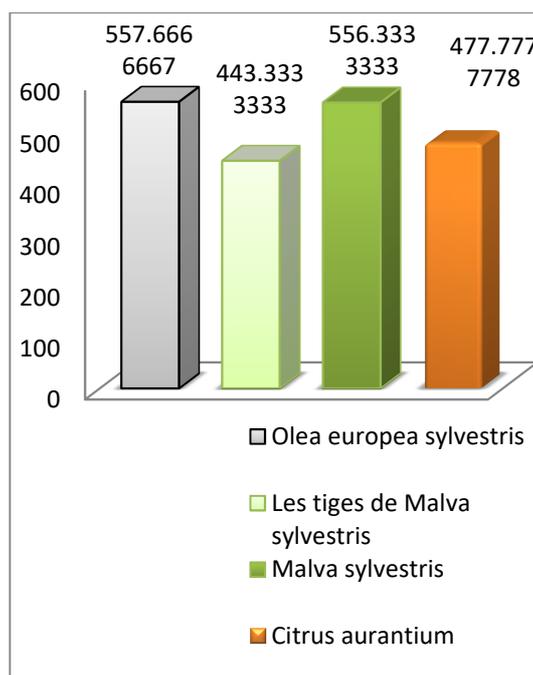


Figure 2: les teneurs en polyphénols en µg EAG/g de plante Discussion

4.2. Les teneur en flavonoïdes

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être "veino-actifs", c'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (Bruneton, 1999)

La méthode du trichlorure d'aluminium (Dehpeur et al., 2009) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits méthanolique de trois plantes

Une courbe d'étalonnage de quercétine. A été tracée pour cet objectifs des mesures de densités pour chaque extrait se sont réalisées à 510 nm pour les flavonoïdes. Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent gramme de l'étalon utilisé et déterminé par l'équation suivante : $y=0.001x+0.004$

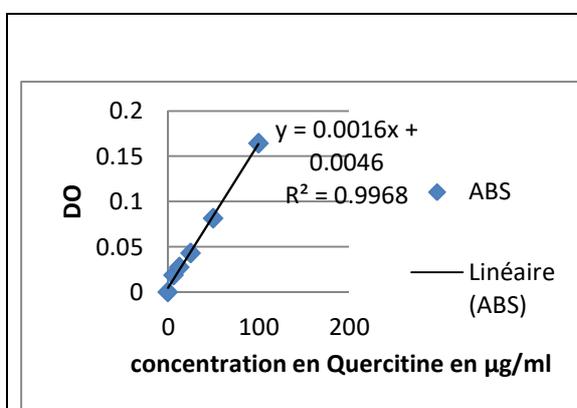


Figure 3: courbe d'étalonnage de la Quercitine

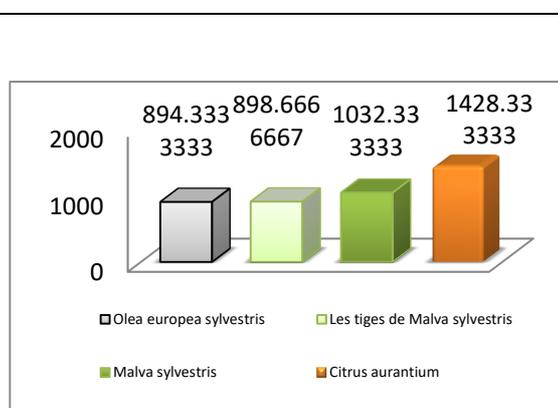


Figure 4: les teneurs en flavonoïdes en µg EQ/g de l'extrait

▪ Discussion

Les résultats, présentés dans la figure, montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différentes plantes. La grande distinction entre les parties étudiées apparait au niveau de la richesse de certaines et la pauvreté des autres. Citrus aurantium enregistre un maximum de flavonoïdes (1428,33 µg EQ/g en moyenne). Tandis que l'autre plantes Malva sylvestris, leur tige et Olea europea sylvestris renferment des teneurs 1028,33, 898,66 et 894,33µg EQ/g en moyenne, respectivement.

Les flavonoïdes sont doués des propriétés hypoglycémiantes et antidiabétiques suivant les résultats de plusieurs travaux réalisés (Guerci et al., 2001 ; Huang et al., 2004 ; Racciah, 2004 ; Punitha et al., 2006 ; Kim et al., 2006 ; Kebieche, 2009). Plusieurs mécanismes sont attribués aux flavonoïdes pour cette activité. Selon ces auteurs (Tringali 2001 ; Huang et al., 2004 ; Racciah, 2004) les flavonoïdes préviennent le diabète en inhibant l'alcalose réductase. En outre, plusieurs études ont démontré que la consommation d'aliments riches en flavonoïdes est inversement corrélée au risque de développer des maladies cardio-vasculaires (Pietta, 2000 ; Hollman, 2001)

4.3. Activité antioxydante

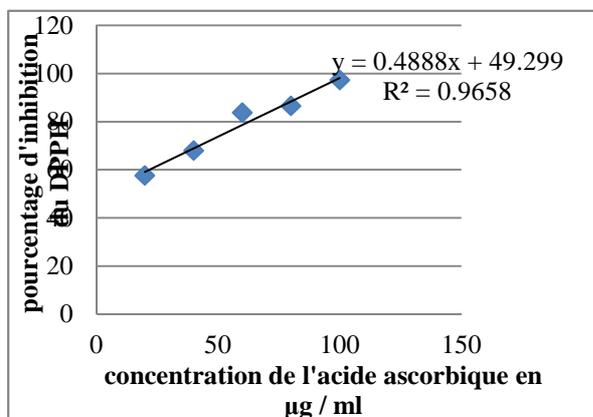


Figure 5: activité anti-radicalaire de l'acide ascorbique par le test DPPH

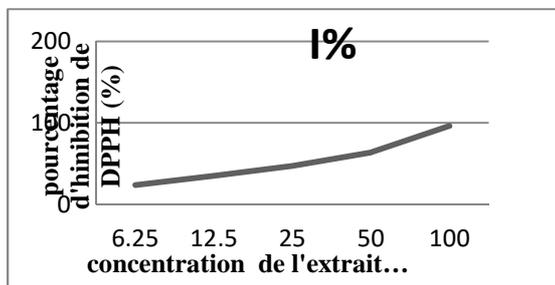


Figure6: Activité anti- radicalaire de l'extrait hydrométhanoliques de *Malva sylvestris* par le test de DPPH

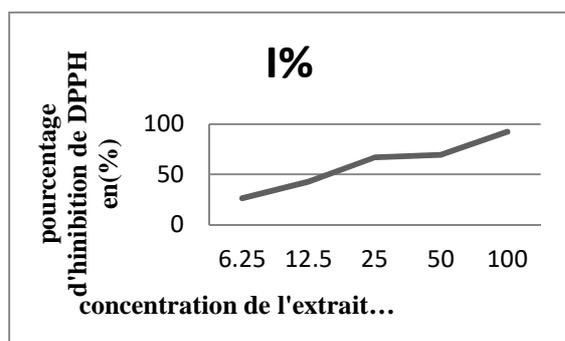


Figure7:Activité anti- radicalaire de l'extrait hydrométhanoliques de *citrus aurantium* par le test de DPPH

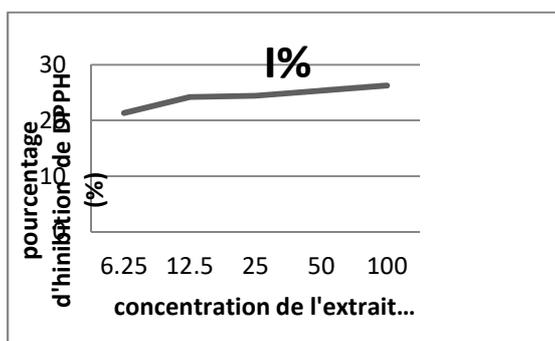


Figure8:Activité anti- radicalaire de l'extrait hydrométhanolique d'olea europea sylvestris par le test de DPPH

Discussion

D'après ces résultats, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration. Les taux d'inhibition du DPPH enregistrés en présence des différents extraits sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique. L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée .L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin (antioxydant de référence) (µg/ml).

L'activité antioxydant des extraits est exprimée en CI50, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Allali et al., 2008), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. (Couleur). Ces CI50 sont déterminées à partir des graphes dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonné l'activité antioxydant en pourcentage.

4.3.2. Résultats du pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur des extraits méthanolique des plantes étudiées est déterminé selon la méthode (de yildirim et al 2001 et topcu et al. ; 2007) La lecture de l'absorbance est faite à 700 nm les résultats sont présentés dans la figure suivante :

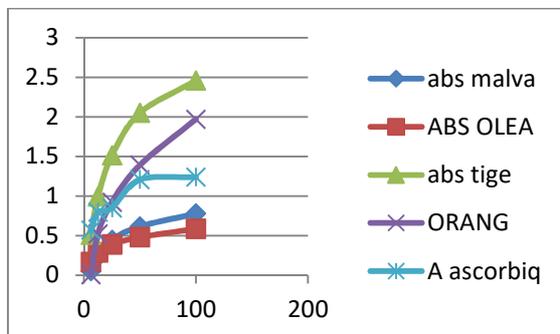


Figure9: Courbe représente réduction de fer de différents extraits

Discussion

Le pouvoir réducteur de fer des tiges de malva sylvestris et citrus aurantium sont élevés par rapport à l'acide ascorbique. L'extrait brut de ces plantes sont composées de plusieurs substances phénoliques actives. On suppose que les tiges et citrus aurantium aient une synergie entre les différents métabolites secondaires. C'est pour cela la réduction de fer est élevée dans ces plantes.

L'activité antioxydante dépend généralement sur le nombre et la position des groupements hydroxyles par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels. La structure des composés phénoliques est un facteur déterminant de leur piégeage des radicaux libres qui sont des pathogènes dans de nombreuses maladies. Certains de ces composés sont capables de chélater le fer, et donc de réduire son excès.

Pour cela, nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits par la technique de réduction du fer FRAP, qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes. Les résultats montrent que la capacité réductrice de l'extrait hydrométhanolique est plus élevée.

Tableau1: Les valeurs des EC50 des extraits des plantes étudiées

Les extraits	EC50 (µg/ml)
Acide ascorbique	1,45491803
<i>olea europea sylvestris</i>	41,6845329
<i>malva sylvestris</i>	34,3519782
<i>tige de malva sylvestris</i>	23,0213465
<i>citrus aurantium</i>	59,5054945

La méthode du radical de DPPH, utilisée dans la présente étude, est une procédure commune dans laquelle l'activité antioxydant de l'échantillon étudié est estimée par le degré de décoloration de la solution de DPPH. Ce chromogène violet est facile à utiliser, a une grande sensibilité, permet l'analyse rapide de l'activité antioxydant d'un grand nombre d'échantillons et donne des résultats reproductibles (Gulçin et al., 2010).

5. Conclusion

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et l'activité anti oxydante des extraits bruts préparés par macération des trois plantes médicinales appartient à la famille des malvacées ,oléacées ,rutacées de la wilaya de mascara grâce à

leurs propriétés thérapeutiques (traiter le diabète sucré..). Les dosages colorimétriques ont montré les fortes concentrations en polyphénols totaux, des flavonoïdes ; le potentiel anti-radicalaire des extraits a été déterminé par les méthodes FRAP et DPPH, dont les résultats montrent que les extraits possèdent une bonne activité.

6. Références bibliographiques

- Allali H., Benmehdi H. , Dib M.A., Tabt B., Ghalem S., Benabadji N., 2008:Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. Asian journal of chemistry; 20 (04): 2701-2710.
- Baccouri B., Zarrouk W., Krichene D., Nouairi I., Ben Youssef N., Daoud D., Zarrouk M. 2004: Influence of fruit ripening and Crop yield on chemical properties of virgin olive oils from seven selected Oleasters (*Olea europaea* L.). J. Agro. 6 (3), 2007; 388-396. In Rotondi A., Magli M. Ripening of olives var. Correggiolo: Modification of oxydative stability of oils during fruit ripening and oil storage. J. Food Agric. Env. 2.; 193-199.
- Bruneton J ., 1999: Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.l.], p. 647-673.
- Dehpeur, M. A. Ibrahimzadeh, N. seyed Fazel et N. Seyed Mohammad., 2009: Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. Grasas Y Aceites. Vol. 60. pp. 405-412.
- Faten Brahmi, Beligh Mechri, Madiha Dhibi, Mohamed Hammami. , 2013: Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activityof *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. Industrial Crops and Products 49); 256–264.
- GHEDADBA N., HAMBABA L., ABERKANE M.C., OUELD-MOKHTAR S.M., FERCHA N., BOUSSELSA H., 2014 : Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. Algerian Journal of Natural Products. Vol. 2(2): 64-74 .
- Guerci B, Bohme P, Kearney-Schwartz A, Zannad F et Drouin P, 2001 : Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Diabetes Metab, 27: 436-447.
- Guerci et al., 2001 ; Huang et al., 2004 ; Raccah, 2004 ; Punitha et al., 2006 ; Kim et al., 2006 ; Kebieche, 2009
- Hollman PCH., 2001: Evidence for health benefits of plant phenols : local or systemic effects ? Journal of the Science of Food and Agriculture 81(9), 842-852.
- Huang, C.L.; Sumpio, B.E. 2008: Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. J. Am. Coll. Surg. 207.; 407–416.
- Pietta P. ,2000: Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products 63(7) : 1035-1042.
- Pokorny J ;N.et Gordon M,2001 :Antioxidant in food ,practical applications.woodhead publishing limited .ISBN 185573463 X
- Raccah D, 2004 : Epidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. EMC-Endocrinologie, 1(1) : 29-42.

- **Rangae, S., Abdel-Hal, E.S.M., Noaman, K. 2006:** Antioxydant activity and nutrient composition of selected cereals for food use, Science direct, Food chem, 98: 32-38
- **Topçu G, Ay M , Bilici A, Sarıkurku C, Ozturk M and Ulubelen A., 2007:** A new flavones from antioxidant extracts of Pistacia terebinthus. Food Chemistry, 103, 816-822
- **Tringali C. 2001:** Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation Characterization and Biological Properties. Taylor & Francis, 36 : 339- 367.
- **Yildirim A., Mavi A., Kara A.A., 2001 :** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 4083-4089.