

## Etude de l'activité anti oxydante de *Gelidium Sesquipedale* par chromatographie liquide haute performance

Yassir. Bengueddour<sup>1</sup>, Safâa El Han<sup>1</sup>, Hamid. El Ibaoui<sup>2</sup>, Rachida. El Ayadi<sup>2</sup>, Najiba. Brhadda<sup>2</sup>

(1) : laboratoire de nutrition et santé ; Faculté des sciences ; Université Ibn Tofail Kenitra Maroc

(2) : laboratoire de biodiversité et des substances naturelles ; Faculté des sciences ; Université Ibn Tofail Kenitra Maroc

### Abstract

This work lies within the scope of the valorization of the extracts of sesquipedalian Rhodophycées *Gelidium* as antioxydants. The method applied to measure this activity is that of the trapping of the free radicals by using the 1,1'-diphenyl-2 - picrylhydrazyl (DPPH<sup>o</sup>) and the follow-up of the reaction was carried out by colorimetry and Liquid Chromatography High efficiency. The results obtained show that the extracts of *Gelidium sesquipedale* have a significant antioxydant activity, inhibition of 50% of oxidation of the radical has been achieved by using a dilution of 100 times of the extracts. The characterisation of molecules responsible for this biological activity has shown that extracts of *Gelidium sesquipedale* are rich in phenolic compounds, ascorbic acid and functions thiols. The levels recorded for these molecules are of the order of  $8.71 \pm 6.1$  mg/g of EAG after crushing for the total polyphenols,  $5.35 \pm 4.77$  mg/ml for the ascorbic acid, and  $8.65 \pm 1.12$  mg/ml of equivalent of N- acetylcysteine conjugate for the functions thiols.

**Keywords** : Sesquipedalian *Gelidium*; DPPH method total Polyphenols, Ascorbic acid, Fonctions thiols, HPLC, Colorimetry.

### 1. Introduction

Avec ses 3500 Km de façade maritime, le Maroc dispose d'une flore marine très riche et diversifiée. De nombreux travaux ont permis de répertorier près de 500 espèces[1]

Outre leur rôle écologique et naturel très important, les algues marines regorgent de grandes potentialités Ils constituent une source importante de produits utilisés dans plusieurs domaines particulièrement médical [7] et industriel tels que l'industrie agroalimentaire [2, 3, 4] cosmétique [5, 6], et pharmaceutique [8] Concernant les domaines agroalimentaires et pharmacologique ; ces végétaux représentent une source potentielle d'antioxydants naturels [9, 10, 11], ils peuvent contribuer dans les mécanismes de défense contre le stress oxydatif, défini comme *un déséquilibre* entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser, et à réparer les dommages oxydatif. Il correspond à une *perturbation* du statut oxydatif intracellulaire. Ils peuvent *prévenir* et *lutter* contre les pathologies liées à la formation de dérivés hautement toxique tels que l'oxygène singulet et les radicaux libres [12].

Plusieurs molécules bioactives ont été isolées et identifiées à partir des algues marines [13, 14, 15,16] dont la plupart contiennent des composés phénoliques tels que les *catéchines* et les *flavonoïdes* [18, 19, 20], les *phlorotannins* [21], les *tocophérols* (vitamines E), et *l'acide ascorbique* (Vitamine C) connus pour leur activité antioxydante. [22, 23, 24, 25, 26]. Parmi les nombreuses méthodes utilisées pour l'étude de l'activité antioxydante des végétaux ou de leurs extraits.

Nous avons opté pour la méthode basée sur le test DDPH : Ce radical libre (1,1'-Diphenylpicrylhydrazyl), possède une coloration violet foncé qui passe au jaune pâle lorsqu'il est réduit [2, 27, 28]

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antioxydante des extraits de *Gelidium sesquipedale* au moyen du test DPPH<sup>o</sup>. Cette activité sera reliée à leur contenu en polyphenols totaux, en acide ascorbique et en fonctions thiols [28, 29, 30].

La conversion de la forme oxydée du réactif en forme réduite sera suivie par colorimétrie et par chromatographie liquide haute performance.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Matériel biologique

Les algues ont été récoltées au niveau de la plage de Rabat sur la côte atlantique marocaine à marré basse. Les thalles ont été débarrassés des épiphytes et des débris, rincés à l'eau distillée et séchés à l'air libre jusqu'à déshydratation complète. Un broyage est pratiqué dans le but de réduire la taille des thalles en poudre qui servira pour la suite de ce travail.

### 2.2. Préparation des extraits d'algues

Un gramme de broyat de *Gelidium sesquipedale* a été mis en contact de 50 ml de la solution du méthanol – ammonium citrate pH=7,4 (60 :40 v/v). Les systèmes ont été maintenus sous agitation pendant 3 heures à 500 rpm, dans l'obscurité et à température ambiante (22±1°C).

Le mélange est ensuite filtré sur une membrane millipore de 0,45µm de diamètre, et des dilutions des extraits dans le méthanol – ammonium citrate pH=7,4 [60 :40 v/v] ont été effectuées afin d'obtenir les concentrations appropriées.

### 2.3. Etude de l'activité antioxydante

**a) Test DPPH°** : L'activité antioxydante des extraits de *Gelidium sesquipedale* a été déterminée en utilisant le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH°).

Des volumes égaux des extraits d'algues (bruts), et (dilués 100 fois) en présence d'une solution du DPPH° (71µM) préparée dans le mélange méthanol-ammonium-citrate à pH =7,4 [60 :40 v/v] ont été mélangés et maintenus dans l'obscurité à température ambiante 22±1°C pendant 2 heures. Le mélange est ensuite analysé par spectrophotométrie à 515 nm et par CLHP à 330 nm. La courbe d'étalonnage du DPPH° entre (0 et 71 µM) a été utilisée pour calculer les concentrations restantes du DPPH° dans le milieu réactionnel. Le pourcentage du DPPH° restant est calculé selon la relation suivante :

$$\% \text{ DPPH}^\bullet r = [(A_{\text{échantillon}} \times 100) / A_{\text{blanc}}] [17,30].$$

-  $A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance de l'échantillon mis en contact avec la solution du DPPH°.

-  $A_{\text{blanc}}$  : Absorbance de la solution du DPPH°.

**b) Conditions chromatographiques** : Le système chromatographique est constitué d'une pompe (Hitachi Model L6000), d'un injecteur (Rheodyne Valve) équipé d'une boucle à 100 µl, d'une colonne (Croco-cil) et d'un détecteur spectrophotométrique UV Visible (LKB model 2151). La température de la colonne est de 40°C et la pression est de l'ordre de 80 bars. La détection

spectrophotométrique a été effectuée à une longueur d'onde de 330 nm.

### 2.4. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

L'évaluation du contenu en polyphénols totaux de *Gelidium sesquipedale* a été effectuée suivant la méthode de Folin Ciocalteu. Les extraits d'algues contenus dans 1 ml du mélange (méthanol, ammonium-citrate) pH =7,4 [60 :40 v/v] ont été mélangés avec 5 ml du réactif de Folin- Ciocalteu dilué au 1/10 dans l'eau. Par la suite 4 ml de la solution du carbonate de sodium (7,5 v/v) ont été ajoutés. Le mélange a été homogénéisé et incubé à l'obscurité à température ambiante 22±1°C pendant 2heures, et l'absorbance a été déterminée à 765 nm. Les résultats ont été exprimés en équivalent d'acide gallique (mg/g).

### 2.5. Dosage de l'acide ascorbique

Les extraits d'algues contenus dans 1 ml du mélange (méthanol, ammonium-citrate) pH =7,4 [60 :40 v/v] ont été mélangés avec 1 ml de la solution d'orthophénylènediamine. Par la suite 1 ml du tampon  $\text{NH}_3^+/\text{NH}_4^+$  à pH = 9,5 a été ajouté. Le mélange a été homogénéisé et incubé dans l'obscurité à température ambiante (22±1°C) pendant 30 min, et l'absorbance a été déterminée à 323 nm. Les résultats ont été exprimés en mg d'acide ascorbique/ml.

### 2.6. Dosage des fonctions thiols

Les extraits d'algues contenus dans 1 ml du mélange (méthanol, ammonium-citrate) [60 :40 v/v] pH =7,4 ont été mélangés avec 200 µl de la solution de DTNB (dithio bis (2-nitrobenzoïacide), après 10 min de contact à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 412 nm. Les résultats ont été exprimés en mg/ml d'équivalent de N- acétylcystéine.

## 3. Résultats et Discussion

### 3.1. Test DPPH°

**Analyse par spectrophotométrie** : La réaction entre le 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH°) et les antioxydants produit une forme oxydée de l'antioxydant et réduit le radical en 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazine ou DPPH-H.

La réaction a été étudiée dans le mélange méthanol citrate d'ammonium (pH= 7,4) et a été suivie par spectrophotométrie à 515 nm correspondant au maximum d'absorbance du DPPH° dans le visible.

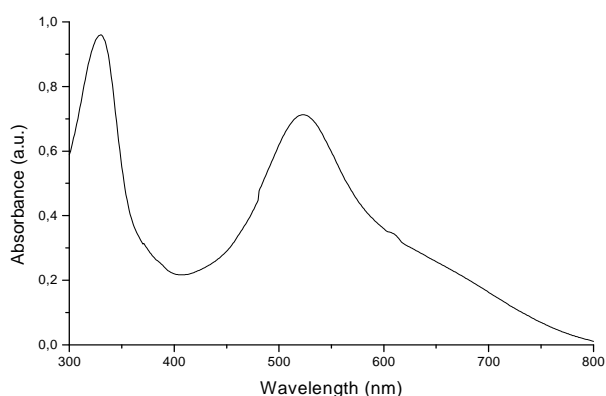


Figure 1 : spectre d'absorbance du DPPH dans le visible et par chromatographie liquide haute performance à 330 nm.

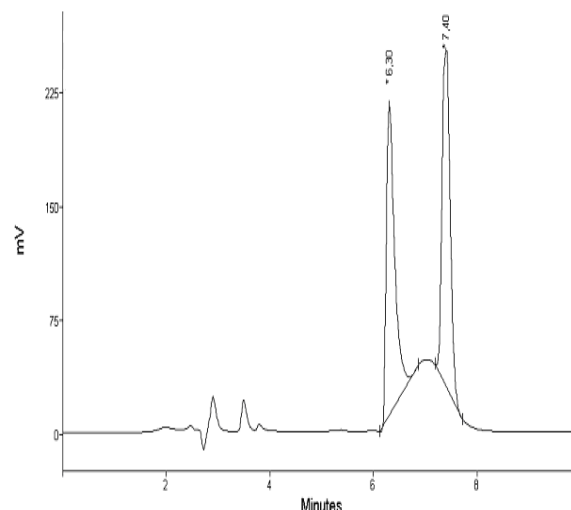


Figure 2: Chromatogramme de la solution du DPPH° (71 µM)  
Phase stationnaire : C18 (3 µm), phase mobile : Méthanol - Citrate d'ammonium 10 mM (70:30, V/V), 0,8 ml/min.

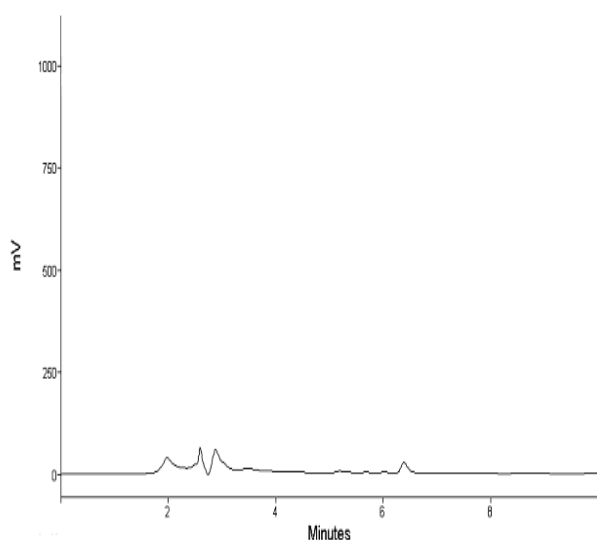


Figure 3: Chromatogramme correspondant à l'analyse de l'extrait seul de Gelidium sesquipedale.

Phase stationnaire : C18 (3 µm), phase mobile : Méthanol - Citrate d'ammonium 10 mM (70:30, V/V), 0,8 ml/min.

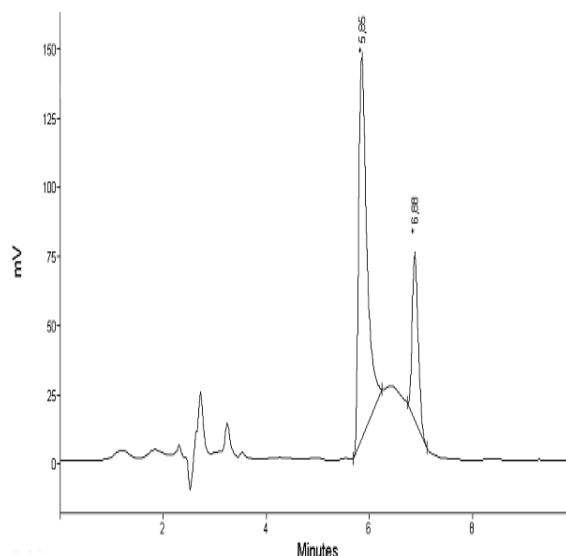


Figure 4: Chromatogramme correspondant à l'analyse de réaction entre la solution du DPPH° (71 µM) et l'extrait dilué 20 fois de Gelidium sesquipedale.

Phase stationnaire : C18 (3 µm), phase mobile : Méthanol - Citrate d'ammonium 10 mM (70:30, V/V), 0,8 ml/min.

Les pourcentages du DPPH restant ont été déterminés en utilisant différentes concentrations de l'extrait d'algue. Les résultats obtenus montrent qu'une dilution de 20 fois permet d'avoir de manière approximative une inhibition de 50% d'oxydation du radical.

**Analyse chromatographique :** L'analyse chromatographique de la solution du DPPH° à 71 µM montre la présence de deux pics relatifs à la forme réduite

et la forme oxydée du réactif enregistrés à des temps de rétention de 7,74min et 6,30min respectivement (fig 2).

Le chromatogramme relatif à l'analyse de l'extrait d'algue seul ne montre aucun pic caractéristique de l'une des formes du DPPH° (figure 3).

L'analyse chromatographique de la réaction entre la solution du DPPH° et l'extrait dilué 20 fois montre la présence de deux pics enregistrés à des temps de rétention de 5,86 min et 6,88 min, et qui correspondent à la forme réduite et oxydée respectivement (figure 4).

Une dilution de 50 fois de l'extrait permet une inhibition totale de l'oxydation du radical (figure 5). L'analyse de réaction entre l'extrait d'algue et la solution du DPPH<sup>•</sup> montre un seul pic caractéristique de la forme réduite du réactif (DPPH-H) obtenu à un temps de rétention de 6,45 min.

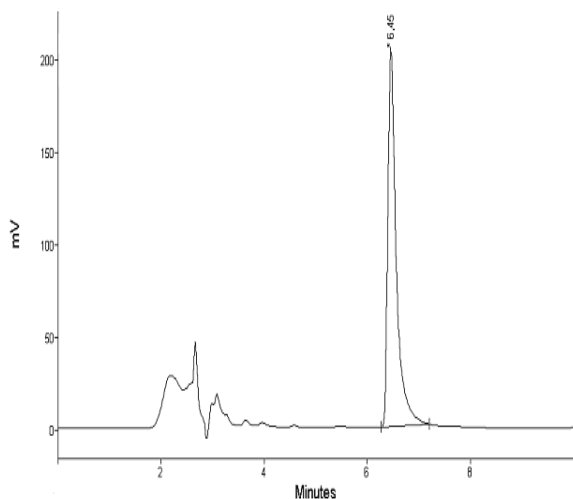


Figure 5: Chromatogramme correspondant à l'analyse de réaction entre la solution du DPPH<sup>•</sup> (71 µM) et l'extrait dilué 50 fois de *Gelidium sesquipedale*. Phase stationnaire : C18 (3 µm), phase mobile : Méthanol - Citrate d'ammonium 10 mM (70:30, V/V), 0,8 ml/min.

### 3.2. Teneur en Polyphénols totaux

L'estimation de la teneur en polyphénols dans l'extrait d'algue a été effectuée selon la méthode de Folin et le contenu total a été exprimé en équivalent d'acide gallique / g d'échantillon.

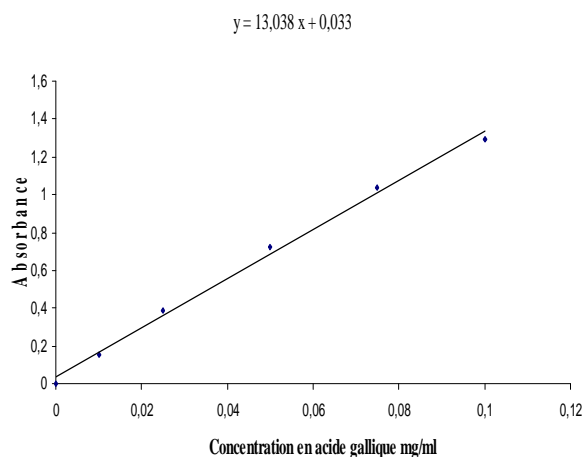


Figure 6: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

D'après les résultats obtenus, la rhodophycée *Gelidium sesquipedale* renferme une quantité importante de

polyphénols qui est de l'ordre de 8,71 mg ± 6,1 EAG / g de broyat.

### 3.3. Dosage de l'acide ascorbique

Le dosage de l'acide ascorbique dans l'extrait de *Gelidium sesquipedale* a été réalisé en utilisant sa courbe d'étalonnage. La teneur enregistrée est de l'ordre de 5,35 ± 4,77 mg/ ml, ce qui montre la richesse des tissus de *Gelidium sesquipedale* en cette vitamine.

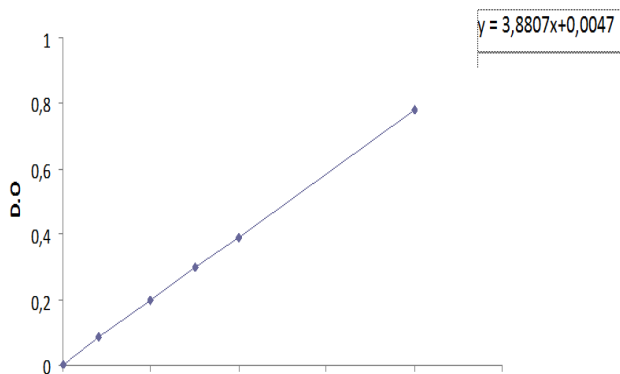


Figure 7: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

D'après les résultats obtenus, la rhodophycée *Gelidium sesquipedale* renferme une quantité importante de polyphénols qui est de l'ordre de 8,71 mg ± 6,1 EAG / g de broyat.

### 3.4. Détermination de la teneur en fonction thiols

La détermination de la concentration en thiols dans le broyat de *Gelidium sesquipedale* a été effectuée suivant la méthode d'Ellman. La courbe d'étalonnage de N-acétylcystéine a été utilisée pour calculer la teneur en ces fonctions dans l'échantillon d'algue, et les résultats obtenus montrent que les extraits d'algues présentent une quantité de fonctions thiols équivalente à 8,65 ± 1,12 mg/ ml d'équivalent de N- acétylcystéine.

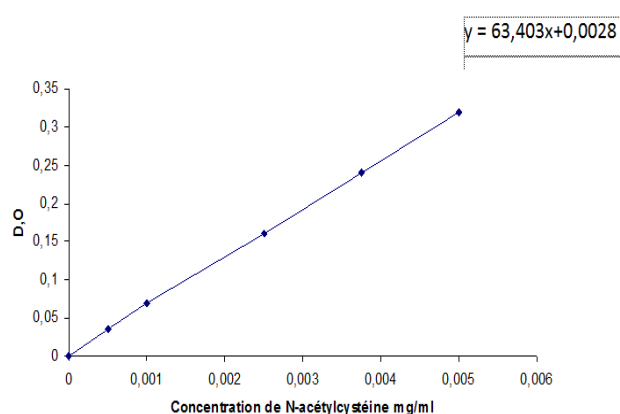


Figure 8: Courbe d'étalonnage de N- acétylcystéine mg/ml.

#### 4. Conclusion

L'étude de l'activité antioxydante de *Gelidium sesquipedale* a été suivie par colorimétrie et par Chromatographie Liquide Haute Performance. Dans les deux cas, les résultats obtenus montrent que l'inhibition de 50 % d'oxydation est atteinte en utilisant des extraits dilués 20 fois. Une inhibition totale de l'oxydation du radical a été obtenue en présence des extraits dilués 50 fois.

Le contenu en polyphénols totaux dans les extraits d'algue a été estimé à 8,71 mg ± 6,1 EAG / g de broyat, ce qui montre que *Gelidium sesquipedale* renferme une teneur importante en composés phénoliques. L'évaluation de la quantité de l'acide ascorbique et des fonctions thiols dans le broyat d'algue a été aussi effectuée, les valeurs enregistrées sont de l'ordre de 5,35 ± 4,77 mg/ ml d'acide ascorbique et 8,65 ± 1,12 mg/ ml d'équivalent de N- acétylcystéine pour l'acide ascorbique et les fonctions thiols respectivement.

La richesse de *Gelidium sesquipedale* en ces biomolécules peut lui conférer un rôle important dans des domaines variés, ainsi, sa valorisation dans le domaine agroalimentaire, pharmaceutique et médicale est d'un grand intérêt. [31, 32, 33].

#### Références Bibliographiques

- [1] Benhissoune. S, Boudouresque. C, M Verlaque. 2001. A check list of marine seaweeds of the Mediterranean and Atlantic Coast of Morocco. I. Chlorophyceae wille L. Botanica Marina. 44: 171-182.
- [2] Norziah. M.H, Chiang. C.Y. 2002. Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. Food chemistry, 68: 69 – 79.
- [3] Oohusa, T.1993. Recent trends in Nori products and markets in Asian Journal of Applied Phycology, 5, 155 – 159.
- [4] Ioto. K, Hori, K. 1989. Seaweed: Chemical composition and potential foods uses. Food reviews International, 5, 101- 144.
- [5] Dabouineau. L. 2004. Un autre regard sur les algues marines. *Le rôle d'eau*. Vol. 118 : 1-4.
- [6] Chiadmi. N. 2001. Biologie et Biochimie de quelques carraghénophytes de la côte Nord Atlantique Marocaine, thèse de Doctorat. Université Ibn Tofail. Faculté des Sciences Kenitra. 143 p.
- [8] Moore. R.E., Patterson. M.L, Garmichael. W.W. 1988. – News pharmaceuticals from cultured blue-green algae. In: Fautin, D. G. (Eds.), Biomedical Importance of Marine Organism, California Academy of Science, San Francisco, p 143-150.
- [7] Katagiri. S, Takahashi. Y. 1987. Seasonal variation of the hemagglutinating activities in the red alga *Gracilaria verrucosa*. Nippon Suisan Gakkaishi 53: 2133 – 2137.
- [9] Matanjun. P, Mohamed. S, Mustapha, N.M., Muhammad, K., Ming, C. H., 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. J. Appl. Phycol. 20 (4). 367-373.
- [10] Li. HB, Cheng. K.W, Wong.C.C. Fan. KW, Chen. F., Jiang. Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food Chemistry, 102 (3), 771-776.
- [11] Nagai. T, Ykimoto. T. 2003. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. Food Chemistry. 81 (3) 327-332.
- [12] Dodet. B. 1991. La chasse aux radicaux libres oxygénés. Biofutur., 101, p 23-34.
- [13] Aneiros. A, Garateix. A., 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. Journal of Chromatography B, 803,(15), 41-53.
- [14] Vairappan, C.S., 2003. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomolecular Engineering*. 20 (4-6), 255-259.
- [15] Mundt. S, Kreitlow. S, Nowotny. A, Efmert. U. 2001. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 203 (4), 327-334.
- [16] Vairappan. C.S, Suzuki.M, Abe. TM. 2001. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species. *Phytochemistry* 58, (3), 517-523.
- [17].Belkheiri. N. 2010. Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse, France., 244 pages.
- [18] Yoshie-Stark. Y, Hsieh. YP, Suzuki, T. 2003. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. Journal of Tokyo University of Fisheries, 89, 1-6.
- [19] Santoso. J, Yoshie.Y, Suzuki T. 2002. The distribution and profile of nutrients and catechins of some Indonesian seaweeds. Fisheries Science, 68 (supplement), 1647-1648.
- [20] Yoshie, Y, Wang. W, Petillo. D., et Suzuki. T. 2000. Distribution of catechins in Japanese seaweeds. Fisheries Science, 66 (5), 998-1000.
- [21] Koivikko, R, Lopone. J, Pihlaja.K, Jormalainen. V. 2007. High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. Phytochemical Analysis, 18 (4). 326-332.
- [22] Ragubeer. N, Beukes. DR, Limson.J. L. 2010. Critical assessment of voltammetry for rapid screening of antioxidants in marine algae. Food Chemistry. 121, 227-232.
- [23] Al-Amoudi. OA, Mutawie. H.H, Patel. A.V, Blunden. G. 2009. Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah cornice algae, Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences. 16, 23-29
- [24] Wang. T, Jónsdóttir. R, Ólafsdóttir. G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chemistry 116, 240-248.
- [25] Kuda. T, Tsunekawa. M, Goto. H, Araki, Y. 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. Journal of Food Composition and Analysis 18 (2005) 625-633.
- [26] Richard.S.,2004. Algues la nouvelle vague. Ria, n° 651., P 42- 48.
- [27] Kabran. G R M, Ambeu N C, Mamyrbékova. BJA, Békro. YA. 2012. Phenols et Flavonoïdes Totaux Dans Les Extraits Organiques de Dix Plantes Utilisées Dans la Tradithérapie du Cancer du Sein en Côte d'Ivoire. European Journal of Scientific Research; Vol.68 No.2, pp. 182-190
- [27] Mohammedi. Z, Atik. F.2012.Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas*. Nature & Technologie . 6, 34 à 39
- [28] Khady. B, Tine. E, Destain. J, Cissé N, Thonart. P. 2010. Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2010 14(1), 131-139
- [29] Cheriot. S. 2007. Rôle des produits de réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides. Thèse de Doctorat l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). 271p
- [30] Etahiri. S, El Kouri. A, Bultel -Ponce, V, Guyot. M, Assobhei.O., 2007. Antibacterial bromophenol from the marine red alga *Pterosiphonia complanata*. Natural Product communication 2. 749-752.
- [31] Rocha De Souza. M. C, Texeira – Masques. C, Guera - Dore,C.M, Ferreira Da Silivia., Olivera – Rocha, H. A., Lisboa – Leite, E., 2007. Antioxydant activity of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds, Journal of applied Phycology, 19 (2007) 153-160.
- [32] Zubia, D., Ubia, D., Robledo, Y., Freile - Pelegrin, Y., 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan peninsula Mexico, Journal of Applied Phycology, 19. 449-458.