



FÉDÉRATION ALGÉRIENNE DE PHARMACIE

Disponible en ligne sur

ASJP
 Algerian Scientific Journal Platform

<https://www.asjp.cerist.dz/en/PresentationRevue/436>


ARTICLE ORIGINAL

Dosage des composés phénoliques et détermination de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Brocchia cinerea* VIS de l'Algérie (Sud-Est)

Dosage of phenolic compounds and determination of the antioxidant activity of methanolic extracts of *Brocchia cinerea* VIS in Algeria (South-East)

Mohammed Tahar BEN MOUSSA ^{a,b,c} *, Redouane Amine CHERIF ^d, Samia LEKHAL ^e, Abdelhakim BOUNAB ^f, Youcef HADEF ^{e,g}.

^a Laboratoire de Pharmacognosie, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Batna 2, Algérie.

^b Laboratoire de Toxicologie, Centre Hospitalo-Universitaire Batna, Algérie.

^c Laboratoire de Physio-Toxicologie, Pathologie Cellulaire et Moléculaire-Biomolécules.

^d Laboratoire de Chimie Analytique, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Alger 1, Algérie.

^e Laboratoire de Chimie Analytique, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine d'Annaba, Algérie.

^f Laboratoire de Chimie Minérale, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Alger 1, Algérie.

^{e,g} Laboratoire pour le Développement et le Contrôle des Préparations Pharmaceutiques Hospitalières.

Article reçu le 27-12-2020 ; accepté le 01-07-2021

MOTS CLÉS

Brocchia cinerea VIS ;
Composés phénoliques ;
Activité antioxydante ;
Sud-Est algérien.

Résumé

Objectif : Les substances bioactives telles que les antioxydants phénoliques naturels se trouvent en abondance dans les plantes médicinales. L'objectif de cette étude est la détermination de la teneur en composés phénoliques et du potentiel antioxydant de *Brocchia cinerea* VIS du Sud-Est algérien.

Méthodes : Dosage des teneurs en phénols, flavonoïdes, tannins condensés, tannins hydrolysables et anthocyanes, des extraits méthanoliques, par spectrophotométrie, sur dix échantillons authentifiés, cinq provenant de Biskra et cinq d'El Oued. Estimation du potentiel antioxydant par deux essais in vitro : piégeage du radical libre DPPH et réduction du fer ferrique par test FRAP. Les teneurs sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type et le potentiel antioxydant par la moyenne $\pm$ écart-type des CI50. Tests

statistiques exécutés sur logiciel SPSS Statistics avec $p < 0,05$.

Résultats : Le rendement moyen des extraits méthanoliques était de $19,98 \pm 4,17$ %. Les teneurs moyennes étaient respectivement de $2,95 \pm 0,84$ mg d'EAG/g MVS, $44,58 \pm 13,3$ mg d'EQ/g MVS, $1,44 \pm 0,7$ mg d'EC/g MVS, $0,66 \pm 0,59$ mg d'EAT/g MVS et $0,27 \pm 0,12$ mg d'EC3G/g MVS. La moyenne des CI50 des tests au DPPH et FRAP était respectivement de $48,60 \pm 17,7$ $\mu\text{g/mL}$ et $14,32 \pm 3,64$ $\mu\text{g/mL}$. Une corrélation positive a été relevée entre l'activité antioxydante et la teneur en tannins hydrolysables. Les échantillons prélevés aux mois de mars, avril et mai, à Biskra, ont présenté des teneurs et des activités plus importantes.

Conclusion : Les échantillons de *Brocchia cinerea* VIS présentent bien des composés phénoliques actifs et une activité antioxydante appréciable, particulièrement ceux de la Wilaya de Biskra, prélevés aux mois de mars, avril et mai.

© 2022 Fédération Algérienne de Pharmacie. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Brocchia cinerea VIS ;
Phenolic compounds ;
Antioxidant activity ;
South-East Algeria.

Abstract

Objective: Bioactive substances such as natural phenolic antioxidants can be found in abundance in medicinal plants. The objective of this study was to determine the content of phenolic compounds and the antioxidant potential of *Brocchia cinerea* VIS from South-East Algeria.

Methods : Average levels of phenols, flavonoids, condensed tannins, hydrolysable tannins and anthocyanins in the methanolic extracts, were estimated by spectrophotometric methods, on ten authenticated samples, five from Biskra and five from El Oued. Antioxidant potential was studied using two in vitro assays: free radical DPPH scavenging assay and reduction of ferric iron by the FRAP test. Results are presented in form of mean $\pm$ standard deviation and antioxidant potential by the mean $\pm$ standard deviation of the IC50. Statistical tests were run on SPSS Statistics software with a $p < 0,05$.

Results : The average yield of methanolic extracts was $19,98 \pm 4.17\%$. The average levels were respectively $2,95 \pm 0,84$ mg of GAE/g DVM, $44,58 \pm 13,3$ mg of QE/g DVM, $1,44 \pm 0,7$ mg CE/g DVM, $0,66 \pm 0,59$ mg of TAE/g DVM and $0,27 \pm 0,12$ mg of C3GE/g DVM. The mean IC50 for the DPPH and FRAP tests were $48,60 \pm 17,7$ $\mu\text{g/mL}$ and $14,32 \pm 3,64$ $\mu\text{g/mL}$, respectively. A correlation was found between the antioxidant activity and the content of hydrolysable tannins in the extracts. Samples collected during March, April and May from Biskra, showed higher levels and antioxidant activities.

Conclusion : *Brocchia cinerea* VIS samples from the South-East region of Algeria do indeed contain active phenolic compounds and an appreciable antioxidant activity. It is recommended to carry out the pickings in Biskra, during March, April and May.

© 2022 Fédération Algérienne de Pharmacie. All rights reserved.

* Auteur correspondant : Mohammed Tahar BEN MOUSSA

Adresse e-mail : mt.benmoussa@univ-batna2.dz (MT. BEN MOUSSA)

Introduction :

Depuis des millénaires, les plantes médicinales représentent une source précieuse d'agents thérapeutiques, et encore aujourd'hui, de nombreux médicaments sont des produits naturels dérivés de plantes (1-3).

Les effets correctifs bénéfiques des matières végétales sont principalement dus au mélange de substances, appelées métabolites secondaires des plantes (MSdP). Les MSdP constituent un groupe biochimique diversifié de substances produites par la cellule végétale, par des voies métaboliques

secondaires qui sont dérivées des voies métaboliques primaires. Contrairement aux métabolites primaires impliqués dans les principales voies métaboliques vitales pour la survie, les MSdP ne sont pas essentiels à la croissance et à la vie, mais ils jouent un rôle important dans la compétition et la défense entre les espèces, notamment en protégeant les plantes contre les herbivores et les microorganismes (4-7).

Parmi ces MSdP, les phénols sont largement répartis dans le règne végétal et sont les

métabolites secondaires les plus abondants des plantes. Les polyphénols végétaux ont ainsi, et de manière croissante, attiré l'attention des thérapeutes en raison de leurs puissantes propriétés antioxydantes et de leurs effets marqués dans la prévention de diverses maladies associées au stress oxydatif, comme le cancer. En effet, durant les dernières années, un essor considérable a été constaté en ce qui concerne l'identification et le développement de composés phénoliques ou d'extraits de différentes plantes. Des investigations devenues majeures dans le domaine de la recherche médicale et sanitaire (8, 9).

Brocchia cinerea (Delile) Vis. est une plante annuelle herbacée laineuse de 5- 15 cm complètement, tomenteuses. Les feuilles et les tiges vert blanchâtre sont recouvertes de poils minuscules épais (10). C'est une plante xérophyte qui prospère dans des conditions désertiques avec une pluviométrie annuelle moyenne de 100 mm. La plante préfère les sols sablo-limoneux et est retrouvée généralement sur des lits d'oueds non salins, sur des sols sableux graveleux (11). Géographiquement, elle est largement distribuée en Afrique du Nord, en particulier dans les régions sahariennes de l'Algérie et du Maroc, la région de la mer Rouge, le Sinaï, la dépression de Qattara et le Mali (12).

Traditionnellement, elle est largement utilisée dans le traitement de coliques, la toux, la diarrhée et les troubles digestifs. La plante est généralement appliquée sous forme de décoction, de macération, de perfusion ou d'inhalation (13-15).

Une revue de la littérature a cependant permis de constater que des études portant sur *Brocchia cinerea* Vis, restent peu nombreuses, que ce soit l'activité antioxydante ou l'étude des composés phénoliques, particulièrement en Algérie. Un état des lieux qui nous a encouragé à la réalisation de la présente étude, dont l'objectif est la détermination de la teneur des composés phénoliques et l'évaluation du potentiel antioxydant des extraits méthanoliques des parties aériennes de *Brocchia cinerea* VIS dans le Sud-Est algérien. L'étude permettra ainsi d'enrichir les connaissances sur les activités biologiques de la présente plante et de constituer une base de données pour d'éventuels emplois et investigations thérapeutiques futurs.

Matériel et méthodes

Récolte de la plante

Les parties aériennes de *Brocchia cinerea* VIS ont été récoltées par temps sec sur une période de 6 mois, allant de janvier 2016 jusqu'à mai 2016, à partir de deux régions : le M'lili, Wilaya de Biskra (entre 6° et 42' 25" longitude Est et 34° 48' 21"

latitude Nord, une altitude de 158 m) et Souihla, Wilaya d'El-Oued (entre 6°53' 49" longitude Est et 33°31' 8" latitude Nord, une altitude de 56 m). Le climat des deux régions est désertique. Au total, 10 échantillons ont été recueillis, nommés par l'initiale B et suivi d'un numéro indiquant le lieu et le mois de récolte. Les échantillons sont ainsi nommés B1, B2, B3, B4 et B5 et représentent ceux recueillis respectivement en janvier, février, mars, avril et mai dans la Wilaya de Biskra, alors que les échantillons nommés B6, B7, B8, B9 et B10 représentent ceux recueillis respectivement en janvier, février, mars, avril et mai dans la Wilaya d'El-Oued. Les quatre premiers échantillons des deux régions sont dans la période de floraisons par contre B5 et B10 sont dans la période de fructification. Le matériel végétal a été identifié au Centre de Recherche Scientifique et Techniques sur les Régions Arides de la Wilaya de Biskra.

Le matériel végétal récolté, a été séché, à l'abri de l'humidité et de la lumière, puis réduit en poudre à l'aide d'un mortier et soumis aux étapes d'extraction.

Produits chimiques

Le Méthanol, Soude, Réactif Folin-ciocalteu, Acide gallique, Quercétine, Ferricyanure de potassium, Trichlorure de fer, Sulfate de fer, Phosphate de sodium mono hydrogéné, Acide ascorbique, 2,2 diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH), Proanthocyanidine, Acide tannique et Carbonate de sodium, ont été obtenus auprès de la société Sigma (St. Louis, MO, USA). L'acide chlorhydrique, Butanol, Acide trichloracétique et Tween 80 ont été fournis par Biochem Chemopharma (Ligne, COSNE, France). Le Nitrate de sodium a été obtenu auprès des laboratoires Fluka. Le Trichlorure d'aluminium auprès de Panreac (Espagne) et l'Iodate de potassium auprès de Prolabo (Sion, Valais Suisse). L'eau employée est une eau produite par distillation au sein du laboratoire de Pharmacognosie, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Batna 2.

Préparation des extraits méthanoliques

Une prise d'essai de 1 g de chaque poudre végétale de *Brocchia cinerea* VIS est macérée dans 25 mL de méthanol absolu pendant 48 h. Les macérats obtenus sont filtrés sur Büchner et ensuite transférés dans des ballons initialement pesés (m_0). Après évaporation sous vide, à l'aide d'un évaporateur rotatif, les filtrats sont ensuite séchés à l'étuve (45°C) pendant 24 h. Après refroidissement, le ballon est pesé à nouveau (m_f). Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction (16).

Le rendement d'extraction est estimé par la formule suivante (17):

$$R = (m_f / m_0) * 100$$

Où :

R : Rendement d'extraction (%)

m_f : Masse de l'extrait (g)

m₀ : Masse de la prise d'essai (g).

Un volume de 5 mL de méthanol est ajouté aux ballons pour récupérer l'extrait, le ballon est ensuite séché à l'étuve, refroidi et pesé pour calculer la concentration de l'extrait récupéré dans les 5 mL de méthanol (18).

Dosage des composés phénoliques totaux

La détermination des concentrations des polyphénols totaux de l'extrait brut est effectuée à l'aide de la méthode de Folin-Ciocalteu (19).

Un volume de 200 µL de chaque extrait (dilué au 1/50^{ème} dans le méthanol) est introduit dans un tube à essai, 1 mL de réactif Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10^{ème} dans le méthanol) y est additionné. Après incubation de 5 min à température ambiante, 800 µL de solution aqueuse de carbonate de sodium (7,5 %) sont ajoutés. La solution finale est mélangée et conservée à l'obscurité pendant 30 min dans un bain marie. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme standard, à différentes concentrations (0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 et 20 µg/mL).

La concentration des polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg d'EAG/g MVS) (20).

Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur totale en flavonoïdes est effectuée par la méthode de Zhishen & al (21).

Dans un flacon, 250 µL de l'extrait (dilué au 1/50^{ème} dans le méthanol) sont mélangés avec 1 mL d'eau distillée, auxquels sont ajoutés 75 µL d'une solution aqueuse de NaNO₂ (5%). Après 5 minutes, sont ajoutés 75 mL de solution aqueuse d'AlCl₃ (10 %) suivi de l'addition après 6 minutes de 500 µL de NaOH (1N) et 600 µL d'eau distillée. Le mélange est agité immédiatement. L'absorbance est mesurée à 415 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine comme standard, à différentes concentrations (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 110 et 120 µg/mL).

La concentration des flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme d'équivalent de

quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg d'EQ/g MVS) (22).

Dosage des tannins condensés

La teneur en proanthocyanidine est déterminée par la méthode de Scalbert (23).

Un volume de 200 µL des extraits (dilué au 1/10^{ème} dans le méthanol) est ajouté à 2 mL d'une solution aqueuse ferreuse acide (77 mg de FeSO_{4.7} H₂O dissoute dans 500 mL de HCl / Butanol (2/3)).

La solution est incubée pendant 15 min dans un bain marie.

L'absorbance est mesurée à 530 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration est exprimée en milligramme d'équivalent de cyanidine par gramme de matière végétale sèche (mg d'EC/g MVS). La teneur en tanins condensés a été calculée en utilisant la formule donnée ci-dessous (23, 24) :

$$\text{mg d'EC/g MVS} = \frac{\text{Abs} \times V \times D \times M \times V2}{l \times \epsilon \times v \times m}$$

Où :

Abs : Absorbance de l'échantillon à 530 nm ;

V : Volume total de réaction (mL) ;

D : Facteur de dilution ;

M : Masse molaire de la cyanidine (g/mol) ;

V2 : Volume de l'extrait avant dilution (mL) ;

l : Longueur du trajet (cm) ;

ε : Coefficient d'extinction molaire (34700 L mol⁻¹cm⁻¹) ;

v : Volume de l'extrait dilué 10 fois ;

m : Masse de la matière sèche (g).

Dosage des tanins hydrolysables

La teneur en tanins hydrolysables est déterminée par la méthode de Bossu et al (25).

Un volume de 500 µL des extraits (dilués au 1/50^{ème} dans le méthanol) est ajouté à 2,5 mL d'une solution aqueuse de KIO₃ (2,5%). Le mélange est conservé pendant 2 min à 30°C dans un bain marie, afin que la réaction entre les réactifs puisse avoir lieu.

L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle, dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide tannique comme standard, à différentes concentrations (0, 10, 20, 40, 60, 80 et 100 µg/mL d'acide tannique).

La concentration des tanins hydrolysables est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide tannique par gramme de matière végétale sèche (mg d'EAT/g MVS) (24, 25).

Dosage des anthocyanes

La quantification des anthocyanes totaux a été évaluée par la méthode du différentiel de pH (Giusti & Wrolstad) (26).

Pour le dosage dans les extraits, deux solutions ont été préparées, l'une à pH = 1 à l'aide d'un tampon comprenant du chlorure de potassium (0,03 M) et la seconde à un pH = 4,5 à base d'acétate de sodium (0,4 M).

Un volume de 2 mL de chaque solution tampon est mélangé avec 1 mL de chaque extrait (dilué au 1/50^{ème} dans le méthanol). Les solutions sont ensuite incubées pendant 15 min à l'obscurité puis l'absorbance est mesurée à deux longueurs d'ondes, 510 nm et 700 nm, contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance est calculée par la formule ci-dessous :

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{\lambda 510} - \text{Abs}_{\lambda 700})_{\text{pH}=1} - (\text{Abs}_{\lambda 510} - \text{Abs}_{\lambda 700})_{\text{pH}=4,5} \quad (22, 27).$$

La concentration des anthocyanes est exprimée en mg/L et est calculée selon la formule suivante :

$$\text{mg/L} = \frac{\text{Abs} \times \text{M} \times \text{FD} \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Avec :

Abs : Absorbance de l'échantillon ;

M : Masse moléculaire (g/mol) = 449,2 g/mol pour le cyanidine 3-glucoside ;

FD : Facteur de dilution (FD = 10) ;

ϵ : Coefficient d'extinction pour le cyanidine 3-glucoside (26900 L mol⁻¹cm⁻¹) ;

l : Longueur du trajet (cm).

La concentration est rapportée à la masse en matière végétale. La teneur est alors exprimée en milligramme d'équivalent de cyanidine 3-glucoside par gramme de matière végétale sèche (mg d'EC3G/g MVS).

Activité de piégeage des radicaux libres

Le pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques a été testé par la méthode faisant appel au DPPH (1,1-diphénylpicrylhydrazyl) comme radical libre relativement stable (28, 29).

Dans ce test, le DPPH de couleur violette se réduit en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants présents dans le milieu (30, 31).

La réaction est réalisée dans un volume total de 2,5 mL contenant 0,5 mL de l'extrait méthanolique (pour les tests) ou 0,5 mL de méthanol pur (pour les contrôles), volume auquel est ajouté 2 mL de DPPH à 0,1 mM solubilisé dans le méthanol. Les extraits sont préparés par dissolution dans le méthanol absolu, ces solutions dites solutions mères seront ensuite diluées afin d'obtenir les concentrations finales (32-35).

L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence, dont une solution mère à 0,05 mg/mL est préparée puis progressivement diluée afin d'obtenir des solutions filles de concentrations allant de 1 à 10 µg/mL.

Les échantillons sont ensuite conservés à l'obscurité pendant 60 minutes, et la décoloration, par rapport au témoin négatif contenant uniquement la solution du DPPH, est mesurée à 515 nm.

L'activité antioxydante est estimée selon l'équation suivante (36) :

$$\text{AA} = ([\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}] / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

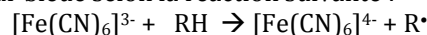
AA : Activité Antioxydante ;

Abs : Absorbance à 515 nm.

Après le calcul des différents pourcentages d'inhibition et sur la base des données obtenues et des droites tracées, on procède au calcul de la CI50.

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

La puissance antioxydante réductrice ferrique, dans les extraits méthanoliques, est déterminée selon la méthode décrite par Oyaiz et Bougandoura (37, 38). Elle est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) par les antioxydants qui donnent une couleur bleue selon la réaction suivante :



RH : Substance active antioxydante.

R[•] : Substance active oxydée.

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 0,5 mL d'une solution aqueuse de tampon phosphate à 0,2 M (pH = 6,6) et 0,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium K₃[Fe(CN)₆] à 1 %. L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 min et ensuite laissé jusqu'à refroidissement. Est alors ajouté un volume de 0,5 mL d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10% pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min. Un aliquote de 0,5 mL du surnageant est mélangé avec 0,5 mL d'eau distillée et 0,1 mL d'une solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl₃ à 0,1 %. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée, permettant ainsi d'étalonner le spectrophotomètre UV-VIS.

Le contrôle positif est représenté par l'antioxydant standard, à savoir l'acide ascorbique, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à l'augmentation de l'activité antioxydante (39).

Le pouvoir réducteur du fer est exprimé par la CI50, qui correspond à la concentration de l'échantillon donnant une absorbance de 0,5.

Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Les résultats exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type. La comparaison des moyennes des variables a été réalisée par le test Student et l'estimation de la corrélation bivariée par le test de Pearson. L'analyse en grappes (clusters) a été réalisée par le test à plages multiples de Duncan. Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel SPSS Statistics version 22 avec un seuil de signification fixé à $p < 0,05$.

Résultats et Discussion

Rendements des extractions méthanoliques

Les rendements sont exprimés en pourcentage, g/100 g de matière végétale sèche. Les résultats sont présentés dans la Figure 1. Le rendement moyen des extraits méthanoliques de *Brocchia cinerea* VIS est convenable, proche environ du 1/5^{ème} ($19,98 \pm 4,17\%$) de la masse en matière végétale sèche employée. Il est intéressant de noter que le rendement enregistré pour les échantillons récoltés au niveau de la Wilaya de Biskra ($21,65 \pm 3,79 \%$) est plus élevé que celui obtenu avec ceux de la Wilaya d'El Oued ($18,31 \pm 4,21 \%$), cependant, la différence reste non significative ($p = 0,421$).

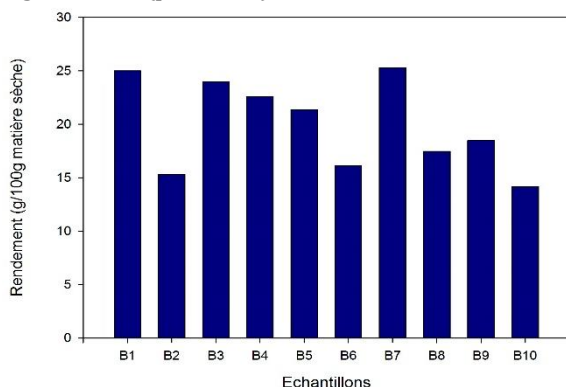


Figure 1. Rendements des extractions méthanoliques des échantillons de *Brocchia cinerea* VIS.

Dosage des polyphénols totaux

La courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard a permis de calculer les concentrations des polyphénols totaux, exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière végétale sèche, dans les 10 échantillons (Figure 2). La méthode de dosage des polyphénols totaux, utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, a donné des résultats fiables et répétables (40). Les résultats en polyphénols totaux révèlent une concentration moyenne de $2,95 \pm 0,84$ mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière végétale sèche.

La concentration moyenne pour les échantillons récoltés au niveau de la Wilaya d'El Oued ($2,96 \pm 1,18$ mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière végétale sèche) est revenue légèrement plus élevée que celle de la Wilaya de Biskra ($2,95 \pm 0,45$ mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière végétale sèche), la différence reste néanmoins statistiquement non significative ($p = 0,241$). Comparativement aux résultats trouvés par Benzaoui et al (39), à savoir, 20 mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière végétale sèche. La teneur en polyphénols totaux de *Brocchia cinerea* Vis trouvée dans la présente étude, reste relativement faible. Ces différences pourraient être dues aux conditions environnementales variables et à la très forte influence génétique (38). L'équation d'étalonnage des polyphénols totaux est la suivante : $y=0.0968x$ $R^2=0.9995$.

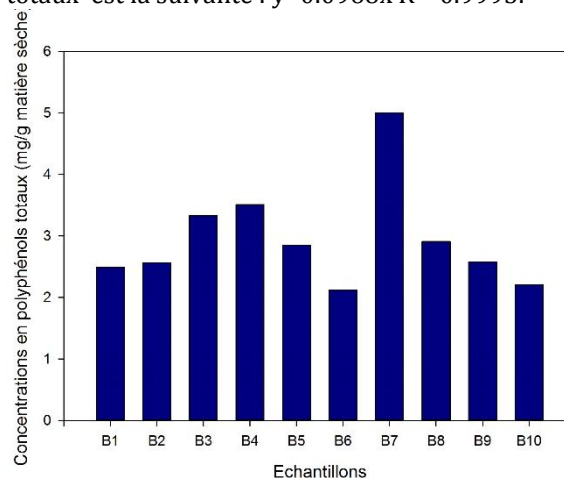


Figure 2. Concentrations des polyphénols totaux dans les échantillons de *Brocchia cinerea* VIS.

Dosage des flavonoïdes totaux

La courbe d'étalonnage utilisant la quercétine comme standard a permis de calculer les concentrations des flavonoïdes totaux, exprimées en mg d'équivalent de quercétine/g de matière végétale sèche dans les 10 échantillons (Figure 3). La teneur moyenne retrouvée sur l'ensemble des échantillons de la présente étude ($44,58 \pm 13,3$ mg d'équivalent de quercétine/g de matière végétale sèche) est relativement comparable à celle retrouvée dans l'étude de Benzaoui & al (38 mg d'équivalent de quercétine/g de matière végétale sèche) (41). La teneur moyenne obtenue à partir des échantillons provenant de la Wilaya de Biskra ($48,76 \pm 11,8$ mg d'équivalent de quercétine/g de matière végétale sèche) est revenue plus élevée que celle de la Wilaya d'El-Oued ($40,4 \pm 14,65$ mg d'équivalent de quercétine/g de matière végétale sèche). Une différence qui reste statistiquement non significative ($p = 0.241$). L'équation d'étalonnage des flavonoïdes est la suivante : $y=0.0017x-0.0142$ $R^2=0.9971$

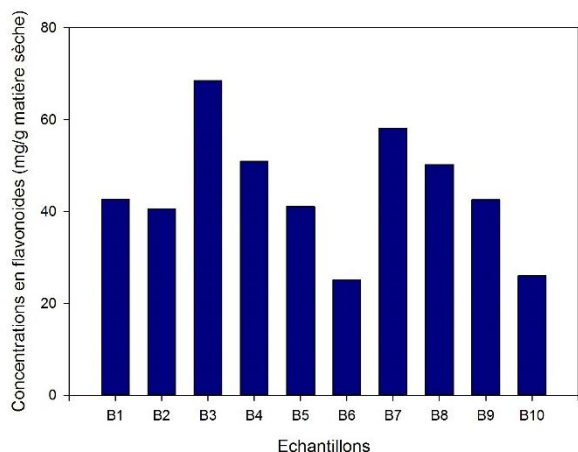


Figure 3. Concentrations des flavonoïdes totaux dans les échantillons de *Brocchia cinerea* VIS.

Dosage des tannins condensés

Les concentrations en tannins condensés, exprimées en mg d'équivalent de cyanidine/g de matière végétale sèche dans les 10 échantillons sont représentées dans la Figure 4. Les résultats révèlent une faible teneur moyenne ($1,44 \pm 0,7$ mg d'équivalent de cyanidine/g de matière végétale sèche) comparativement à celle retrouvée dans l'étude de Benzaoui et al (130 mg d'équivalent de cyanidine/g de matière végétale sèche) (41). La teneur moyenne obtenue des échantillons provenant de la Wilaya de Biskra ($1,97 \pm 0,58$ mg d'équivalent de cyanidine/g de matière végétale sèche) est revenue plus élevée que celle de la Wilaya d'El-Oued ($0,92 \pm 0,29$ mg d'équivalent de cyanidine/g de matière végétale sèche) avec une différence statistiquement significative ($p = 0,008$).

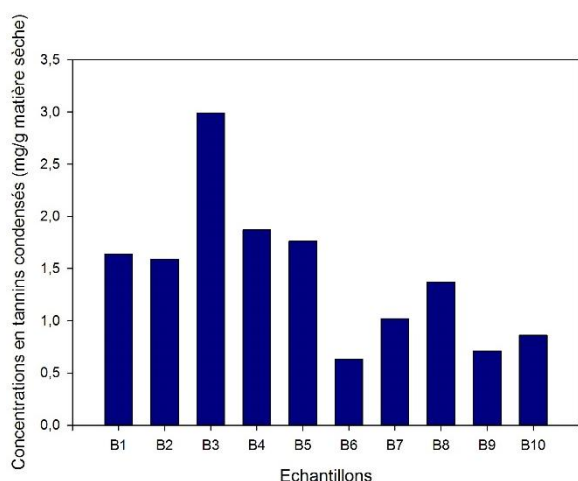


Figure 4. Concentrations en tannins condensés dans les échantillons de *Brocchia cinerea* VIS.

Dosage des tannins hydrolysables

La courbe d'étalonnage utilisant l'acide tannique comme standard a permis de calculer les concentrations en tannins hydrolysables,

exprimées en mg d'équivalent d'acide tannique/g de matière végétale sèche dans les 10 échantillons (Figure 5). Pour la teneur moyenne en tannins hydrolysables, sur la totalité des échantillons de *Brocchia cinerea* VIS, une concentration de $0,66 \pm 0,59$ mg d'équivalent d'acide tannique/g de matière végétale sèche. Les échantillons provenant de la Wilaya de Biskra étaient en moyenne plus riches ($0,87 \pm 0,82$ mg d'équivalent d'acide tannique/g de matière végétale sèche) que ceux de la Wilaya d'El Oued ($0,45 \pm 0,09$ mg d'équivalent d'acide tannique/g de matière végétale sèche), avec une différence statistiquement non significative ($p = 0,139$). L'équation d'étalonnage des tannins hydrolysables est la suivante :

$$y = 0.0075x + 0.0055 \text{ et } R^2 = 0.9948$$

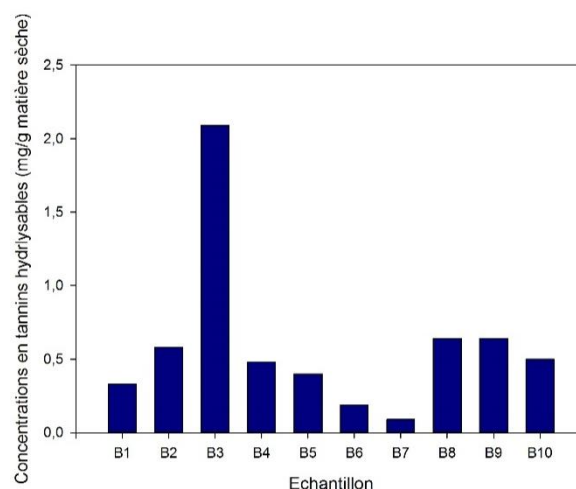


Figure 5. Concentrations en tannins hydrolysables dans les échantillons de *Brocchia cinerea* VIS.

Dosage des anthocyanes totaux

Les concentrations en anthocyanes totaux, exprimées en mg d'équivalent de cyanidine 3-glucoside/g de matière végétale sèche dans les 10 échantillons, sont représentées dans la Figure 6. La teneur moyenne en anthocyanes dans les échantillons de *Brocchia cinerea* VIS est revenue égale à $0,27 \pm 0,12$ mg d'équivalent de cyanidine 3-glucoside/g de matière végétale sèche. La teneur moyenne des échantillons récoltés au niveau de la Wilaya de Biskra ($0,29 \pm 0,17$ mg d'équivalent de cyanidine 3-glucoside/g de matière végétale sèche) est supérieure à celle retrouvée sur les échantillons de la Wilaya d'El Oued ($0,26 \pm 0,07$ mg d'équivalent de cyanidine 3-glucoside/g de matière végétale sèche), avec une différence statistiquement non significative ($p = 0,841$).

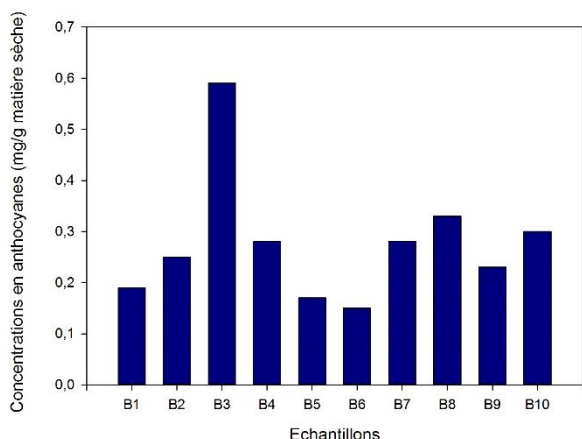


Figure 6. Concentrations des anthocyanes totaux dans les échantillons de *Brocchia cinerea* VIS

Activité antioxydante

La surproduction des radicaux libres dans l'organisme et le déficit du système de défense endogène, sont une composante importante dans la physiopathologie de plusieurs affections (maladies cardiovasculaires, neurologiques et processus néoplasiques).

Actuellement, la recherche vise à renforcer ces défenses endogènes par des substances naturelles issues de plantes, qui sont douées des propriétés antiradicalaires. L'intérêt croissant des effets bénéfiques des antioxydants sur la santé a mené au développement d'un grand nombre de tests pour déterminer les capacités antioxydantes des extraits végétaux naturels. Deux méthodes ont été employées lors de la présente étude: Le piégeage du radical libre DPPH (capacité antiradicalaire) et la réduction de l'ion ferrique (pouvoir réducteur).

Piégeage des radicaux libres

Sur la base de la courbe d'étalonnage utilisant l'acide ascorbique comme antioxydant de référence (Figure 7), et des résultats des CI50 obtenues pour les 10 échantillons de *Brocchia cinerea* VIS (Figure 8), les résultats révèlent que les extraits méthanoliques de *Brocchia cinerea* VIS possèdent une activité faible par rapport à celle de l'acide ascorbique. En effet, le résultat de l'activité antiradicalaire a révélé une CI50 moyenne (pour les 10 échantillons) de $48,60 \pm 17,7 \mu\text{g/mL}$. Pour les extraits méthanoliques des échantillons issus de la Wilaya de Biskra, ces derniers ont présenté une activité de piégeage des radicaux libres plus intense, avec une CI50 moyenne ($43,13 \pm 20,82 \mu\text{g/mL}$) plus faible que celle des échantillons issus de la Wilaya d'El Oued ($54,08 \pm 16,57 \mu\text{g/mL}$), bien que la différence restait statistiquement non significative ($p = 0,548$).

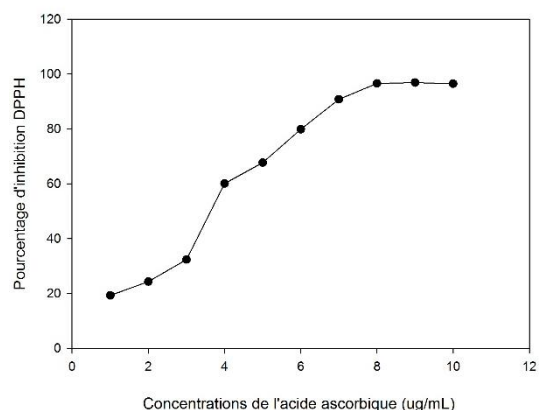


Figure 7. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test de piégeage des radicaux libres.

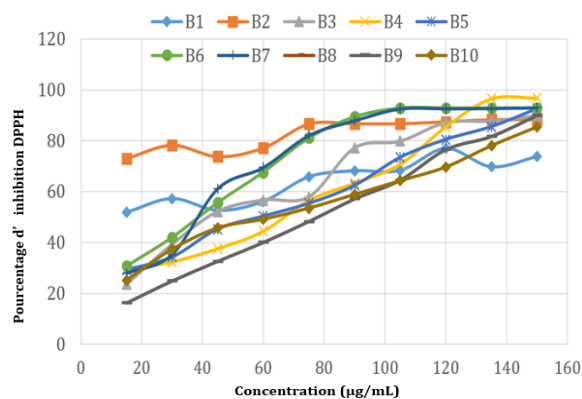


Figure 8. Résultats de la CI50 par le test à la DPPH des extraits méthanoliques de *Brocchia cinerea* VIS.

Réduction de l'ion ferrique (Ferric Reducing Antioxidant Power ou FRAP)

Sur la base de la courbe d'étalonnage utilisant l'acide ascorbique comme antioxydant de référence (Figure 9), et des résultats des CI50 obtenues pour les 10 échantillons de *Brocchia cinerea* VIS (Figure 10), les résultats révèlent que l'activité antioxydante des extraits méthanoliques est plus faible que celle de l'acide ascorbique. En effet, l'activité réductrice a révélé une CI50 moyenne (pour les 10 échantillons) de $14,32 \pm 3,64 \mu\text{g/mL}$ pour les extraits méthanoliques de *Brocchia cinerea* VIS.

Pour les échantillons issus de la Wilaya de Biskra, ces derniers ont présenté une activité réductrice supérieure, avec une CI50 moyenne ($14,26 \pm 1,82 \mu\text{g/mL}$) plus faible que celle des extraits provenant de la Wilaya d'El Oued ($14,39 \pm 5,15 \mu\text{g/mL}$), avec une différence statistiquement non significative ($p = 1$).

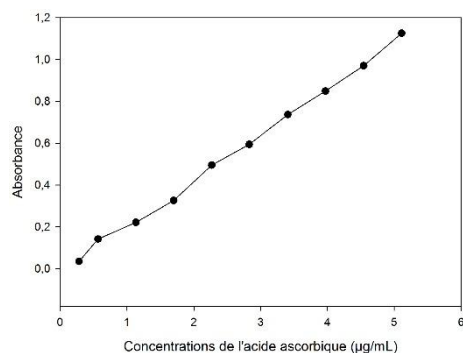


Figure 9. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test FRAP.

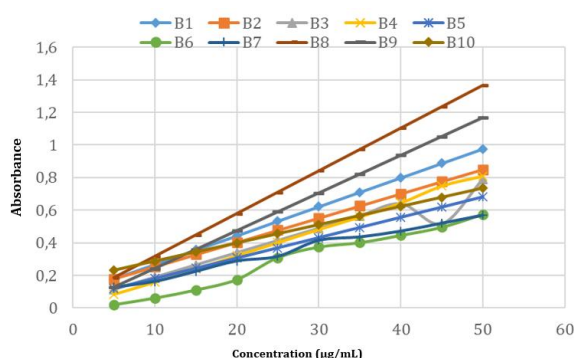


Figure 10. Résultats de la CI50 par le test FRAP des extraits méthanoliques de *Brocchia cinerea* VIS.

Analyse en grappes

Sur la base des valeurs trouvées pour chaque paramètre, sur les 10 échantillons de *Brocchia cinerea* VIS, une analyse en grappes (cluster) a pu être réalisée afin de faire ressortir des groupes d'affinité. Les résultats indiquent que les échantillons pourraient être classés en deux groupes (Figure 11), à différentes échelles, lorsque la distance horizontale est de 25.

Le premier groupe, comprend les échantillons B3, B4, B5, B7, B8, B9 et B10, alors que le deuxième, comprend les échantillons B1, B2 et B6. Le premier présente des valeurs relativement plus élevées que le deuxième groupe pour les paramètres étudiés. Ces résultats peuvent être utilisés comme de nouvelles lignes directrices pour la sélection des périodes de récoltes et de production. En effet, de par les données provenant des deux groupes, on constate que les échantillons susceptibles de fournir le plus de substances actives, sont ceux récoltés durant les mois de mars, avril et mai, avec des quantités plus élevées en phénols et autres antioxydants tels que les tannins hydrolysables, ces derniers étant le facteur le plus important dans la séparation des grappes. Constatation confortée par une corrélation positive, relevée entre l'activité antioxydante et la teneur en tannins hydrolysables des extraits.

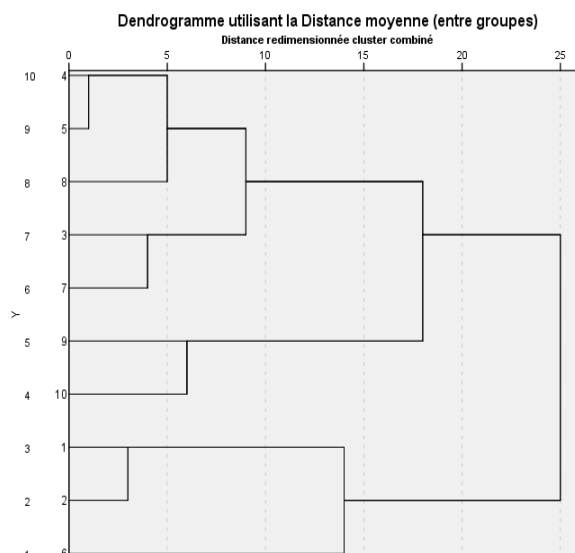


Figure 11. Analyse en grappes, basée sur la teneur en composés phénoliques et activités antioxydantes des dix échantillons de *Brocchia cinerea* VIS.

Conclusion

Suite à la réalisation de la présente étude, il a été établi que les échantillons de *Brocchia cinerea* VIS présentent bien des composés phénoliques actifs et une activité antioxydante. Afin de maximiser les effets de la plante, il est conseillé de procéder aux prélèvements durant les mois de mars, avril et mai, au niveau de la Wilaya de Biskra.

L'étude pourrait aider à l'orientation des conduites à tenir inhérentes à l'emploi et à la sélection de *Brocchia cinerea* VIS, en se basant plutôt sur les teneurs en composés phénoliques et antioxydants que sur l'apparence ou les rendements d'extraction.

Il est également recommandé de poursuivre à l'avenir ces études, idéalement sur chaque composé actif seul, ainsi que les associations et les interactions, afin de se familiariser davantage avec l'usage de la plante et de mieux tirer profit de ses potentiels effets bénéfiques.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun intérêt financier concurrent ou de relations personnelles connues pouvant influencer les travaux rapportés dans cet article.

Références bibliographiques

1. Kinghorn AD, Pan L, Fletcher JN, Chai H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *Journal of natural products*. 2011;74(6):1539-55.
2. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30

years from 1981 to 2010. Journal of natural products. 2012;75(3):311-35.

3. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E-M, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology advances. 2015;33(8):1582-614.

4. Hussein RA, El-Anssary AA. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. Herbal Medicine. 2018.

5. Zaynab M, Fatima M, Abbas S, Sharif Y, Umair M, Zafar MH, et al. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. Microbial pathogenesis. 2018;124:198-202.

6. McCreath SB, Delgoda R. Pharmacognosy: Fundamentals, applications and strategies: Academic Press; 2017.

7. Shitan N. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2016;80(7):1283-93.

8. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010;15(10):7313-52.

9. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative medicine and cellular longevity. 2009;2.

10. Quézel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 1963.

11. Boulos L. Medicinal plants of North Africa. Medicinal plants of North Africa. 1983.

12. Ozenda P. Flora and vegetation of the Sahara: CNRS; 1991.

13. Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle. 1997.

14. Beloued A. Plantes médicinales d'Algérie: Offices des publications universitaires; 2005.

15. Djellouli M, Moussaoui A, Benmehdi H, Ziane L, Belabbes A, Badraoui M, et al. Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of South West Algeria. Asian journal of natural & applied sciences. 2013;2:59-65.

16. Ghedadba N, Hambaba L, Ayachi A, Aberkane M, Bousselsela H, Oueld-Mokhtar S. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de

Marrubium deserti de Noé. Phytothérapie. 2015;13(2):118-29.

17. Stanojević L, Stanković M, Nikolić V, Nikolić L, Ristić D, Čanadanovic-Brunet J, et al. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of Hieracium pilosella L. extracts. Sensors. 2009;9(7):5702-14.

18. Mamyrbekova-Bekro JA, Boua BB, Diaby A, Bekro Y-A. Screening phytochimique bio guidé et évaluation in vitro des propriétés purgatives de Anchomanes difformis (Blume) Engl., une plante utilisée en Côte d'Ivoire dans le traitement folklorique de la constipation. Nature & Technology. 2013(9):20.

19. Cheok C, Chin N, Yusof Y, Talib R, Law C. Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (Garcinia mangostana Linn.) hull using ultrasonic treatments. Industrial crops and Products. 2013;50:1-7.

20. Hatami T, Emami SA, Miraghaee SS, Mojarab M. Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of Artemisia biennis Willd. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2014;13(2):551.

21. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry. 1999;64(4):555-9.

22. Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. Food Chemistry. 2011;128(1):14-21.

23. Scalbert A, Monties B, Janin G. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1989;37(5):1324-9.

24. Naima R, Oumam M, Hannache H, Sesbou A, Charrier B, Pizzi A, et al. Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan Acacia mollissima barks. Industrial Crops and Products. 2015;70:245-52.

25. Bossu CM, Ferreira EC, Chaves FS, Menezes EA, Nogueira ARA. Flow injection system for hydrolysable tannin determination. Microchemical journal. 2006;84(1):88-92.

26. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Wrolstad REaS, R.E., , editor. New York: John Wiley; 2001.
27. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry. 2001.
28. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181(4617):1199.
29. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry. 2009;113(4):1202-5.
30. Kiers CT, De Boer J, Olthof R, Spek A. The crystal structure of a 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) modification. Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry. 1976;32(8):2297-305.
31. Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food science and technology international. 2002;8(3):121-37.
32. Huang C-Y, Wu S-J, Yang W-N, Kuan A-W, Chen C-Y. Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. Food chemistry. 2016;197:1121-9.
33. El Youbi AEH, Bousta D, Jamoussi B, Greche H, El Mansouri L, Benjilali J, et al. Activités antioxydante, apoptotique et antiproliférative de *Tetraena gaetula* (Emb. & Maire) Beier & Thulin et de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. originaires du Maroc. Phytothérapie. 2012;10(3):151-60.
34. Amarti F, El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Farah A, et al. Composition chimique, activité antimicrobiennne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. Phytothérapie. 2011;9(3):149.
35. Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Fazel NS, Mohammad NS. Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. Grasas y aceites. 2009;60(4):405-12.
36. Fatima KT, Azed KM, Nacira A, Cherifa B. Antioxydant activity and preventive possibility of Algerian medicinal plant *Matricaria pubescens* on hepatic toxicity. Analele Stiintifice ale Universitatii" Al I Cuza" din Iasi. 2016;62(1):148.
37. Oyaizu M. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. Jap J Nut. 1986;44:307-15.
38. Bougandoura N, Bendimerad N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. Nature & Technology. 2013(9):14.
39. Ghaisas M, Navghare V, Takawale A, Zope V, Deshpande A. In-vitro antioxidant activity of *Tectona grandis* Linn. Pharmacologyonline. 2008;3:296-305.
40. Boizot N, Charpentier J-P. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. 2006:79-82.
41. Benzaoui F, Houari A. Contribution à l'étude des activités biologiques de *Brocchia cinerea*(Vis.) et *Matricaria pubescens*(Desf.): KASDI MERBAH, OUARGLA; 2016.