

Extraction et purification des polyphénols, alcaloïdes et flavonoïdes de deux plantes Libanaises *Punica granatum* et *Anacyclus nigellifolius* Boiss et détermination de certaines de leurs propriétés biologiques

Mots clés : extraction, purification, polyphénols, alcaloïdes, flavonoïdes, antioxydante, antibiofilm.

Contexte scientifique

Le sujet de la phytothérapie a reçu peu d'importance dans la littérature libanaise. Pourtant que ce petit pays est considéré comme étant une région riche en nombreuses espèces de plantes possédant des propriétés médicinales. 2607 espèces sauvages parmi lesquelles 92 sont endémiques peuvent être trouvées dans seulement 10452 km².

Dans le monde, 80 % des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Aujourd'hui, le savoir des tradi-praticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques.

Les produits d'origine naturelle sont plus acceptés par les consommateurs qui doutent de la sécurité d'usage des médicaments contenant des produits chimiques surtout que certaines études ont prouvé que ces derniers sont cancérogènes et donc ils représentent des effets indésirables pour l'être humain [Velioglu Y S, Mazza G, Gao L and Oomah B D (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, p 4113-4117]. Pour cela, de nombreuses études ont mis en évidence différentes propriétés

biologiques des métabolites secondaires tels que les polyphénols, les alcaloïdes, les flavonoïdes,...etc, (Epifano *et al.*, 2007).

Objectifs :

L'objectif principal de notre étude est d'approfondir une purification des composés actifs (polyphénols, alcaloïdes et flavonoïdes, tannins) de deux plantes endémiques libanaises.

Les objectifs spécifiques de ce travail de recherche sont :

- 1. Extraction, Isolation et caractérisation** des polyphénols, alcaloïdes et flavonoïdes en utilisant différentes techniques telles que HPLC-MS, LC/MS, RMN parmi d'autres ;
- 2. Quantification** des phénols totaux, flavonoïdes totaux, tannins et alcaloïdes totaux dans les feuilles et les tiges de deux plantes libanaises *Punica granatum* et *Anacyclus nigellifolius*.
- 3. Activités Biologiques *in vitro*** (antioxydante, antimicrobienne, antiinflammatoire, antibiofilm...) de ces composés actifs de ces deux plantes.
- 4. Activité environnementale** (adsorption aux polluants chimiques et métaux lourds...).

Matériels et méthodes

- 1- Collection des deux plantes choisies**
- 2- Extraction et purification des polyphenols, alcaloïdes et flavonoïdes en utilisant des techniques spécifiques pour chaque type de métabolites cités**
- 3- Purification des phénols totaux, flavonoïdes totaux, tannins et alcaloïdes totaux**
- 4- Quantification des métabolites**
 - a- Détermination du contenu total de polyphénols totaux (CTP)**

La méthode de Folin-Ciocalteu sera utilisée pour estimer la CTP. 100 µL of chaque extrait et 0.5 mL du réactif Folin-Ciocalteu (1/10 dilution dans l'eau) sont mélangés avec 1.5 mL de Na₂CO₃ (2%). Le mélange est incubé à l'abri de la lumière à la température ambiante pour 30 minutes. L'absorption de la solution est mesurée à 765 nm en utilisant le Gene-Quant 1300 UV-Vis spectrophotomètre. Le blanc est composé de 0.5

mL de solvant et 1.5 mL de Na₂CO₃. Les résultats sont exprimés en milligramme de l'acide gallique équivalent (GAE) par un gramme d'extrait (mg GAE/g) ^{1,4,9,10}.

b- Détermination du contenu total en flavonoïdes (CTF)

La méthode du chlorite d'aluminium sera utilisée pour la détermination de CTF. 1 mL de concentrations variables des extraits est mélangé avec 1 mL de 2 % de solution méthanoïque du chlorite d'aluminium. Après une période d'incubation pour 1 h à la température ambiante à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 415 nm en utilisant le Gene-Quant 1300 UV-Vis spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en milligramme de rutin équivalent (RE) par un gramme d'extrait (mg RE/g) ^{1,4,10,11}.

c- Détermination du contenu en alcaloïdes

La méthode de Harborne sera utilisée pour la détermination des alcaloïdes. 100 mL de 10% d'acide acétique en éthanol est ajoutée à 1 g de poudre de l'extrait pour 4 h. Ensuite, l'extrait sera filtré et concentré en bain d'eau de 25 mL du volume initial. Des gouttes d'hydroxyde d'aluminium sont ajoutées à l'extrait jusqu'à la précipitation totale. Ensuite les précipitantes sont lavés par une solution diluée et filtrée d'hydroxyde d'aluminium en utilisant un papier filtre whatman N1 0.45µm. Les résidus sont séchés en four à 40 °C et mesurés. Le contenu en alcaloïdes est déterminé en utilisant la formule suivante :

$\% \text{ Alcaloïde} = [\text{masse finale de l'échantillon} / \text{masse initiale de l'extrait}] \times 100$ ⁴.

d- Quantification des phénols totaux, flavonoïdes totaux, tannins et alcaloïdes totaux

a- High-performance liquid chromatography (HPLC-MS)

b- Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)

c- Infrared Spectroscopy (IR)

d- Nuclear magnetic resonance spectroscopy (RMN)

e- Etude de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante sera effectuée selon la méthode DPPH (Rammal *et al*).

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DDPH) est un colorant cristallin noir en poudre possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote avec une activité antioxydante. Des

concentrations variables des extraits (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 mg mL⁻¹) sont préparées. 1 mL de chaque concentration des extraits est ajouté à 1 mL du réactif DPPH. La solution est incubée à l'abri de la lumière à la température ambiante pour 30 min et l'absorbance est mesurée à 517 nm par le Gene-Quant 1300 UV-Vis spectrophotomètre. Le % de l'activité antioxydante est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ activité antioxydante} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

Le contrôle est préparé en mélangeant 1 mL DPPH avec 1 mL du solvant. Le blanc est composé de 1 mL du solvant ^{1,4,9,12}

f- Etude de l'activité antiinflammatoire

Des lignées cellulaires murines (RAW 264.7), sont cultivées dans un milieu de culture DMEM supplémentée de 10% de FBS et 1% pénicilline G-streptomycine dans un atmosphère contenant 5% CO₂ à 37°C. Les macrophages sontensemencés dans des plaques à 12 puits (1×10⁶ cellules/puits) en utilisant un milieu frais. Après préincubation pour 24 h, les plaques sont traitées avec LPS à 100 ng / ml et 2 différents concentrations de médicaments (100 µg/ml et 50 µg/ml) dans le DMEM sans FBS pendant 24 h (pour l'extraction de l'ARN et l'activité COX-2) ¹³.

g- Etude de l'activité antibactérienne contre plusieurs souches

a- Souche bactérienne :

Trois bactéries à Gram-positive (*Staphylococcus epidermidis* (CIP 444), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)) et une bactérie à Gram-négative (*Escherichia coli* (ATCC35218)) seront utilisées pour étudier l'activité antibactérienne des extraits de plantes. Ces souches sont stockées à -80°C dans un cryotube contenant de glycérol à 50%. La souche bactérienne *S. epidermidis* (CIP 444) est une souche clinique, qui a été isolée et à partir d'un patient ayant un implant médical infecté à l'hôpital Mignot de Versailles en France ¹⁴.

b- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB)

Dans des conditions stériles, les CMI et CMB seront déterminées par la méthode de microdilution recommandée par «l'institut des standards des laboratoires et cliniques»

(CLSI) ¹⁵. Des plaques de 96 puits seront utilisées, un volume précis (100 µL) du milieu de culture (Muller Hinton Broth) sera ajouté à chaque puits. Des dilutions successives en série (1/2) de l'extrait de plante seront réalisées dans les puits. Un même volume de la suspension bactérienne sera ajouté à chaque puits de façon à avoir une concentration de 0,5 McF. Un puits sans extrait de plante contenant le milieu de culture et la suspension bactérienne sera utilisé comme contrôle positif. Un puits contenant le milieu de culture et l'extrait sans bactéries sera utilisé comme contrôle négatif. La dernière colonne contenant juste le milieu de culture sera utilisée comme blanc. Les plaques seront ensuite incubées à 37°C pour 24 h.

La CMI est définie comme la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination sera faite par observation visuelle de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés dans chaque puit.

La CMB est définie comme la plus faible concentration de produit utilisée qui tue 99,99% des bactéries. Elle est déterminée après culture du contenu des puits où aucune croissance bactérienne n'est visible sur des boîtes de Pétri, contenant un milieu de culture (Brain Heart infusion Agar), incubées à 37°C pour 24 h.

La boîte de Pétri où le nombre de colonies est inférieur à 5 UFC correspond à la plus faible concentration de l'extrait qui est considérée être la CMB.

h- Etude de l'activité antibiofilm

a- Formation de biofilm

Le dosage de la formation de biofilms en polystyrène sera effectué essentiellement selon le protocole standard où *S. epidermidis* a été précultivée en milieu TSB supplémenté à 25 % de glucose à 37 °C pendant une nuit. Un inoculum de 5×10^5 bactéries seront inoculés par puits. Les plaques de 96 puits utilisées seront ensuite incubées à 37 °C pour 24 h. Leur contenu sera éliminé et les biofilms formés dans les puits seront fixés par chauffage à 80°C pour 1 heure. Après fixation, les biofilms formés sont colorés en ajoutant 100 µL de Cristal violet (0.1%) pour 5 min, ensuite lavés plusieurs fois par 100 µL d'eau

distillée. Finalement, 100 µL d'eau distillée est ajoutée et la D.O à 570 nm est mesurée via le spectrophotomètre Trio Star 2 *Multimode Reader* (BERTHOLD TECHNOLOGIES).

b- Eradication de biofilm par les extraits de plantes

Après fixation de biofilm formé, des dilutions successives en série (1/2) de l'extrait de plante seront réalisées dans les puits, dans l'eau stérile. À l'exception de la dernière colonne, contenant juste le milieu de culture, utilisait comme blanc. Les plaques seront incubées à 37 °C pour 18 h. Leur contenu est ensuite éliminé et ensuite, 100 µL de Cristal violet (0.1%) sera ajouté à chaque puits délicatement afin de colorer les biofilms pour 5 minutes. Les puits sont lavés par 100 µL de l'eau distillée et leurs contenus sont ensuite jetés. Finalement, 100 µl de l'eau distillée ont été ajoutés et la D.O a été mesurée à 570 nm via le spectrophotomètre Trio Star 2 *Multimode Reader* (BERTHOLD TECHNOLOGIES).

c- Activité préventive des extraits de plantes

La préculture bactérienne (*S. epidermidis*) sera faite en milieu TBS supplémenté de 0,25% glucose pendant une nuit à 37°C. Les plaques de 96 puits à utiliser seront remplies de 100 µL du milieu de culture et la première colonne sera remplie de 100 µL des extraits et réaliser la dilution en série à l'exception de la colonne 12 comme un contrôle négatif (qui contient seulement le milieu stérile). Un inoculum de 5×10^5 bactéries seront inoculés par puits. Les plaques sont incubées à 37°C et après 24 h leur contenu sera éliminé et les biofilms formés seront fixés par chauffage à 80 °C pour 1 h. Les biofilms formés seront colorés en ajoutant 100 µL de Cristal violet (0.1 %) pour 5 minutes. Ensuite une étape de lavage par l'eau distillée sera faite. Finalement, 100 µl de l'eau distillée seront ajoutés et la D.O a été mesurée à 570 nm via le spectrophotomètre Trio Star 2 *Multimode Reader* (BERTHOLD TECHNOLOGIES).

i- Caractérisation moléculaire des gènes impliqués dans la formation de biofilm chez *S.epidermidis*

a- Extraction de l'ARN bactérien

Une concentration bactériale de 10^8 sera suspendu dans 1 mL du milieu de culture TSB. Une centrifuge à 4°C pour 5 minutes à une vitesse de $13000\times g$ sera effectuée. Le surnageant est éliminé et on resuspendre le culot en 200 μL lysis buffer (Tris 10mM-EDTA 1mM-SDS 0.6%). On ajoute 10 μL de protéinase K (concentration finale de 1 mg/mL) et 20 μL de lysozyme (concentration finale de 1 mg/mL). Incubation à 37°C pour 30 min. 1 mL de Trizol est ajouté et on l'incube à la température ambiante pour 5 min. 300 μL de chloroforme est ajouté et on les incube pour 5 min à la température ambiante. Une centrifuge à 4°C pour 15 min à une vitesse de $12000\times g$ sera effectuée. La phase aqueuse, contenant l'ARN, sera transférée et on ajoute 500 μL d'isopropanol et une centrifuge à 4°C pour 10 min à une vitesse de $12000\times g$. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1 mL de 75% d'éthanol. Ensuite une centrifugation à 4°C pour 10 min à une vitesse de $12000\times g$ sera faite. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 20 μL de l'eau sans nucléase. Finalement, incubation à 55°C pour 10 min.

b- Polymerase chain reaction (PCR)

j- Etude environnementale des résidus de l'extraction

a- Adsorption des polluants chimiques (pesticides, colorants alimentaires, métaux lourds,..)

b- Fabrication des fibres polymériques

Calendrier :

	Première année	Temps (mois)	Deuxième année	Temps ((mois)	Troisième année	Temps (mois)
Liban	Collection des plantes	1	Activité antioxydante et antiinflammatoire des extraits	2	Etude moléculaire de l'activité antibiofilm	4
	Extraction	3	Purification des phénols, flavonoïdes, tannins et alcaloïdes totaux	3	Rédaction de la mémoire et soutenance	2
	Purification des phénols, flavonoïdes, tannins et alcaloïdes totaux	3	Activité antibactérienne et antibiofilm des extraits	3		
France	Quantification par HPLC, LC/MS	4	Activité environnementale des extraits	3	Rédaction de la mémoire et soutenance	4

Références

1. Aiyegoro, O. A. & Okoh, A. I. Preliminary phytochemical screening and In vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complement. Altern. Med.* **10**, (2010).
2. Oyedemi, S. O. & Afolayan, A. J. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **4**, 952–958 (2011).
3. Roja, G., Vikrant, B. H., Sandur, S. K., Sharma, A. & Pushpa, K. K. Accumulation of vasicine and vasicinone in tissue cultures of *Adhatoda vasica* and evaluation of the free radical-scavenging activities of the various crude extracts. *Food Chem.* **126**, 1033–1038 (2011).
4. Sabbah, A. *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Activity of Lebanese *Punica Granatum* Peels. *Int J Pharma Res Heal. Sci* **5**, 1552–1557 (2017).
5. Hossain, M. A., AL-Raqmi, K. A. S., AL-Mijzy, Z. H., Weli, A. M. & Al-Riyami, Q. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3**, 705–710 (2013).
6. Verpoorte, R. Some phytochemical aspects of medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology* **25**, 43–59 (1989).
7. Ismail, A. M. *et al.* Preliminary phytochemical screening, plant growth inhibition and antimicrobial activity studies of *Faidherbia albida* legume extracts. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **15**, 112–117 (2016).
8. Banso, A. & Adeyemo, S. Phytochemical screening and antimicrobial assessment of *Abutilon mauritanium*, *Bacopa monnifera* and *Datura stramonium*. *Biokemistri*

- 18**, 39–44 (2006).
9. Farhan, H. *et al.* Phytochemical screening and antioxidant activity of Lebanese *Eryngium creticum* L. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**, (2012).
 10. Farhan, H. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of a Lebanese plant *Euphorbia macroclada schyzoceras*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3**, 542–548 (2013).
 11. Quettier-Deleu, C. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.* **72**, 35–42 (2000).
 12. Farhan, H. *et al.* In vitro antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts from crude *Malva parviflora* L. grown in Lebanon. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **5**, 234–238 (2012).
 13. Kallassy, H. *et al.* Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antiproliferative Activities of the Plant Lebanese *Crataegus Azarolus* L. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **23**, 270–284 (2017).
 14. Chokr, A. *et al.* Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 381–388 (2006).
 15. M. P. Weinstein, B. L. Z. F. R. C. M. A. W. J. A. M. N. D. G. M. E. M. J. F. D. J. H. D. W. H. J. A. H. J. B. P. M. P. J. M. S. R. B. T. M. M. T. J. D. T. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standar- Ninth Edition* **32**, (2012).