

ACTION ANTIRADICALEIRE DE FLAVONOÏDES ET D'EXTRAITS DE *CHRYSANTHELLUM INDICUM*

par Th. BRASSEUR *, L. ANGENOT *, J. PINCEMAIL ** et C. DEBY **

* Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie, Université de Liège,
5, rue Fusch, B-4000 Liège (Belgique).

** Laboratoire de Biochimie et de Radiobiologie, Institut de Chimie, Bâtiment B6,
Université de Liège, Sart Tilman, B-4000 Liège (Belgique).

MOTS-CLÉS

Chrysanthellum indicum, flavonoïdes, activité antiradicalaire, extraits, thermostabilité, hydrolyse.

RÉSUMÉ

Les flavonoïdes de *Chrysanthellum indicum* possèdent une bonne activité antiradicalaire contre le radical diphenylpicrylhydrazyle et semblent responsables de l'activité antiradicalaire de la drogue. Les extraits de *Chrysanthellum* ne peuvent être réalisés avec de l'alcool de titre faible car les hétérosides sont rapidement hydrolysés dans ces conditions.

SUMMARY

Chrysanthellum indicum shows an antiradicalar activity against diphenylpicrylhydrazyl radical. This activity seems to be due to the flavonoids. Dilute alcoholic solutions can not be used for extract preparation because the glycosides are rapidly hydrolysed.

INTRODUCTION

Le *Chrysanthellum indicum* DC subsp. *afroamericanum* B.L. Turner est une plante récemment introduite en thérapeutique et commercialisée sous le nom malencontreux de *Chrysanthellum americanum*. Peu toxique, le *Chrysanthellum* est réputé doué de propriétés hépatoprotectrices, anti-lithiasiques, vasculotropes et hypolipémiantes. Il est préconisé dans l'insuffisance de la sécrétion biliaire, les séquelles d'hépatite, les intoxications alcooliques, les lithiases salivaires, rénales ou biliaires, les troubles entérocolitiques chroniques, les affections vasculaires telles varices, hémorroïdes, purpura, artérite des membres inférieurs, troubles oculaires d'origine vasculaire et les perturbations du métabolisme lipidique. Les doses journalières préconisées sont de 12 g de drogue sèche, 6 cuillères à café d'extrait fluide ou 2,4 g de nébulisat administré sous forme de gélules [5, 6].

L'étude chimique de la drogue révèle des saponosides (chrysanthellines A et B) et des dérivés phénoliques constitués de dérivés de l'acide caféique et surtout d'une association assez rare de flavonoïdes : glucosyl-7 lutéoline (flavone), glucosyl-7 ériodictyol et glucosyl-7 isookanine ou flavonomaréine (flavanones), glucosyl-4' okanine ou maréine (chalcone) et glucosyl-6 maritimétine ou maritiméine (aurone) ; ces dernières molécules possèdent un groupement orthodiphénolique sur le cycle B [5] (Fig. I).

Les flavonoïdes constituent l'un des plus importants groupes de produits phénoliques naturels. On estime qu'environ deux pour cent de tout le carbone photosynthétisé par les plantes (soit environ un milliard de tonnes par année) sont convertis en flavonoïdes ou en substances apparentées telles les tanins catéchiques. Les flavonoïdes sont ubiquitaires dans les plantes vertes à l'état de génines ou d'hétérosides. Comme ils sont généralement difficiles à isoler et ont souvent des structures complexes, c'est surtout au cours des vingt-cinq dernières années que de nouvelles substances ont été caractérisées en nombre croissant [7]. Ce sont les travaux de RUSZNYAK et SZENT-GYORGYI qui sont à l'origine de l'utilisation des flavonoïdes en thérapeutique [8]. Depuis et particulièrement ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés sur leurs propriétés biochimiques, physiologiques et pharmacologiques [11]. Dans une revue récente de ces diverses propriétés (cent trente-trois références citées), les flavonoïdes ont été décrits comme des produits naturels de haute potentialité pharmacologique [4].

Une étude des propriétés antiradicalaires, antilipoperoxydantes et antioxydantes *in vitro* d'une série de flavonoïdes, nous a permis d'établir une relation structure-activité qui révélait la grande importance d'un groupement orthodiphénolique sur le cycle B [1] ; une relation semblable peut, par exemple, être déduite de l'étude de l'action inhibitrice *in vitro* de flavonoïdes vis-à-vis de l'aldose réductase [10] ou de leur action antiagrégante plaquettaire *in vivo* [9]. L'autooxydation des acides gras polyinsaturés faisant appel à un processus radicalaire, on comprend l'effet néfaste que peut entraîner pareil processus au sein des membranes cellulaires dont les principaux éléments constitutifs sont des acides gras polyinsaturés ; la membrane cellulaire va perdre progressivement sa fluidité permettant ainsi à des éléments étrangers de pénétrer dans la cellule avec comme conséquence ultime la mort de celle-ci. Nous avons donc jugé intéressant de tester les activités antiradicalaires de la maréine, de la maritiméine et du glucosyl-7 ériodictyol ainsi que de trois teintures préparées au laboratoire, de deux extraits fluides et d'un nébulisat du commerce afin de vérifier, d'une part, s'il y avait une corrélation entre l'activité du *Chrysanthellum* et celle des flavonoïdes et, d'autre part, la valeur des différents extraits.

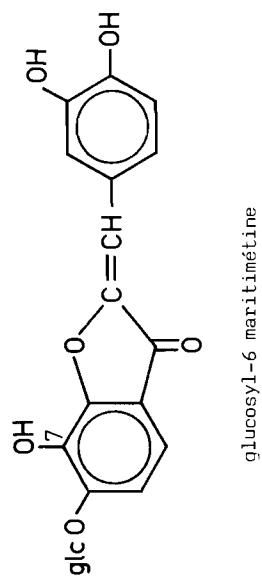
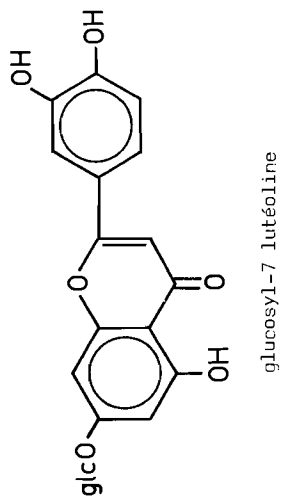
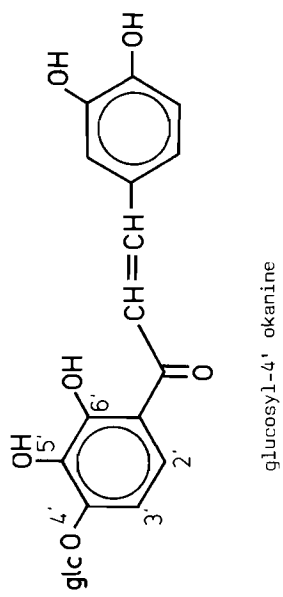
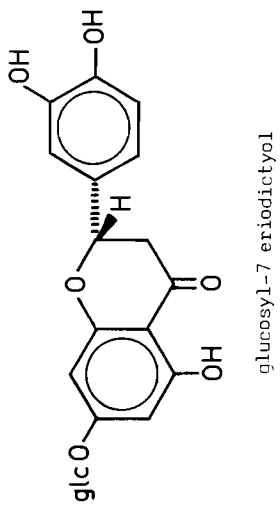
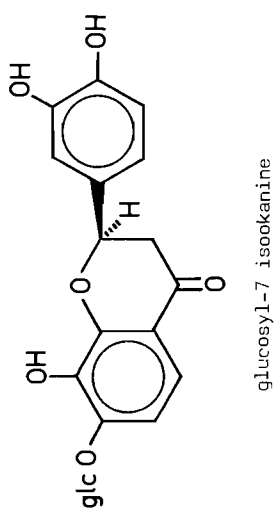


Fig. 1

PARTIE EXPÉRIMENTALE

— La drogue achetée sur le marché français est macroscopiquement et chromatographiquement identique à une drogue de référence authentifiée par le Professeur TURNER et conservée dans les collections du service de Pharmacognosie de l'Institut de Pharmacie de l'Université de Liège.

— Les teintures ont été préparées par percolation de poudre (tamis 0,3 mm) au moyen d'alcool à 30°, 60° et 90° ; cinq parties de teinture correspondent à une partie de drogue.

— Les extraits fluides et le nébulisat proviennent du circuit commercial.

— La détermination du résidu sec a été réalisée en évaporant au bain-marie bouillant, 3 g de préparation galénique placée dans une capsule tarée puis en maintenant le résidu 4 h à 105°.

— La chromatographie des génines a été réalisée sur couche mince de cellulose en utilisant une solution aqueuse d'acide acétique à 60 % (v/v) comme phase mobile.

— Le dosage densitométrique du glucosyl-7 ériodictyol a été réalisé en chromatographiant 3 μ l d'extrait (nébulisat dilué au 1/20 avec de l'alcool à 20°) sur couche mince de gel de silice en utilisant le mélange EtOAc-HCOOH-H₂O (6 : 1 : 1) comme phase mobile. La révélation est effectuée par une solution méthanolique à 1 % de diphénylborate d'aminoéthanol et à 5 % de PEG 400 [2]. La lecture est réalisée après 18 h au densitomètre Vitatron muni d'un filtre de 533 nm. Une relation linéaire est obtenue pour des dépôts compris entre 1 et 3 μ g de glucosyl-7 ériodictyol.

— L'action antiradicalaire contre le radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) a été déterminée en ajoutant à 1,35 ml de tampon phosphate pH 7, 150 μ l de solution à tester et 3 ml de solution méthanolique de DPPH (2,7 mg/100 ml). On agite et après 5 min., on extrait le radical intact par 4 ml de toluène. L'absorbance de la solution violette est mesurée à 517 nm [3]. Les résultats expriment le pourcentage de destruction du radical. Les flavonoïdes sont en solution 10⁻⁵ M dans le méthanol ; le flavonoïde de référence est constitué par la rutine Merck (dosage selon DAB 8 : 100,4 %). Les extraits fluides préalablement dilués au 1/5 dans l'alcool à 20° (densité = 1), le nébulisat préalablement dilué au 1/20 dans l'alcool à 20° (densité = 1) et les teintures sont dilués dans le méthanol à raison de 60 μ l/10 ml.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les chromatogrammes des extraits de *Chrysanthellum* révélés par le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG 400 [2] sont très caracté-

ristiques. En lumière visible, ils laissent apparaître tout d'abord un spot violacé de Rf proche de 0,5 correspondant à un mélange constitué de maréine (violet) et de maritiméine (orange puis rouge). Après 30 min., commencent à apparaître un spot de couleur violette à un Rf légèrement inférieur (flavono-maréine) et un spot de couleur mauve de Rf voisin de 0,6 correspondant au glucosyl-7 ériodictyol. Cette dernière couleur présente une bonne stabilité.

Les chromatogrammes montrent des teneurs en flavonoïdes croissant dans le sens suivant : teinture à 30° < teinture à 90° \simeq nébulisat 1/20 < teinture à 60°. Le spot correspondant au mélange chalcone-aurone a une couleur variable selon les extraits : celui de la teinture à 90° est violet, celui de la teinture à 60° est rouge-violet et celui de la teinture à 30° est rougeâtre ; ces différences de teintes résultent de proportions aurone/chalcone différentes. La triade de spots caractéristiques est absente des extraits fluides. Ce n'est qu'en déposant des quantités plus importantes qu'on parvient à déceler des traces d'hétérosides mais la migration est alors fortement compromise. L'absence des hétérosides pourrait résulter d'une dégradation ou d'une hydrolyse. Or, nous avons observé une parfaite similitude entre les chromatogrammes de l'extractif étheré d'extrait fluide et l'extractif étheré de la teinture à 90° hydrolysée préalablement au bain-marie bouillant en milieu chlorhydrique : il y a donc bien eu hydrolyse simple des hétérosides et transformation en génines. Cette transformation des extraits fluides pourrait résulter d'un traitement à la chaleur ou d'une hydrolyse au cours de la conservation. Nous avons vérifié ces hypothèses en évaporant au bain-marie bouillant deux échantillons de teinture à 60° puis en les chauffant à 105°, l'un 30 min., l'autre 4 h. Après rétablissement du poids initial avec de l'alcool à 60°, les extraits sont chromatographiés avec la teinture à 60° non chauffée comme référence : les chromatogrammes sont identiques et montrent la grande stabilité à la chaleur des extraits de *Chrysanthellum*. Il ne reste plus que l'hypothèse d'une hydrolyse au cours de la conservation. Celle-ci a pu être vérifiée en chromatographiant les trois teintures onze semaines après leur fabrication : si les teintures à 60° et 90° semblent intactes, la triade caractéristique du *Chrysanthellum* est absente de la teinture à 30°, tandis qu'une tache rouge apparaît au sommet du chromatogramme, tache présente également dans les extraits fluides. Ceux-ci ayant un titre alcoolique encore plus faible (de l'ordre de 20°), leur hydrolyse n'a donc rien d'étonnant.

Le Tableau I reprend les différentes caractéristiques des extraits. Comme la teneur en flavonoïdes apparaît superposable à celle en glucosyl-7 ériodictyol, nous avons dosé cette dernière substance comme indicateur de la teneur globale en flavonoïdes (la teinture à 30° n'a pu être dosée car elle est trop instable). Remarquons que le résidu sec des

TABLEAU I

Caractéristiques des extraits et activités antiradicalaires

	Teinture 30°	Teinture 60°	Teinture 90°	E. fluide 1	E. fluide 2	Nébulisat
Densité	0,987	0,943	0,847	1,05	1,05	—
Résidu sec % p/p	5	5,62	3,54	16,55	17	—
% p/v	4,93	5,3	3	17,38	17,86	—
Teneur en glucosyl-7 ériodictyol						
% p/p	—	0,081	0,057	—	—	0,045*
% p/v	—	0,076	0,048	—	—	0,045*
{ par rapport au résidu						
% p/p	—	1,43	1,6	—	—	0,9
Activité antiradica- laire %	38	53	32	23	20	36
Rapport activité anti- radicalaire/teneur en résidu sec	7,7	10	10,7	7**	5,9**	7,2*
	Rutine	Maréine	Maritiméine	Glucosyl-7 ériodictyol		
Activité antiradica- laire %	49	64	50	39		

* dilution 1/20 alcool 20°

** dilution 1/5 alcool 20°.

extraits fluides paraît un peu faible (leur poids devrait correspondre exactement au poids de matière première employée) et que le résidu de la teinture à 90° est le plus riche en flavonoïdes. Le nébulisat est d'une qualité satisfaisante mais ne donne pas de solution limpide ni avec l'eau ni avec l'alcool à 20° alors que les résidus de teintures sont parfaitement solubles dans les solutions alcooliques qui ont servi à leur préparation.

L'observation des pouvoirs antiradicalaires des flavonoïdes montre que tous ont une bonne activité, la maréine étant la plus efficace ; l'activité plus faible du glucosyl-7 ériodictyol est due à l'absence de double liaison dans le cycle C [1]. Les activités antiradicalaires des extraits peuvent être classées en trois groupes : un groupe d'activité importante est constitué par la teinture à 60° qui est aussi la plus riche en flavonoïdes, un groupe d'activité moyenne constitué des teintures à 30°, à 90° et du nébulisat et un groupe d'activité plus faible constitué par les deux extraits fluides (nous avons déjà signalé leurs faibles résidus secs). Si on observe les résultats exprimés en fonction de solutions renfermant 1 % de résidu sec, nous voyons que les activités antiradicalaires sont proportionnelles à la teneur en flavonoïdes des résidus. Les extraits fluides qui

sont très pauvres en hétérosides présentent néanmoins une activité non négligeable que l'on peut imputer à la présence de génines flavonoïdiques [1]. Les deux extraits fluides testés ne répondent pas aux qualités attendues pour de telles préparations car, d'une part, ils ne semblent pas réalisés dans les concentrations voulues si l'on tient compte du résidu sec et de l'activité antiradicalaire et, d'autre part, leur image chromatographique ne correspond plus à celle de la drogue mise en œuvre.

CONCLUSIONS

Nous avons montré que les flavonoïdes de *Chrysanthellum indicum* possédaient une bonne activité antiradicalaire et qu'il y avait une corrélation entre leur teneur et l'activité antiradicalaire de la drogue. Nous avons également mis en évidence la grande instabilité des extraits réalisés avec de l'alcool de titre faible. Les industriels doivent prendre garde à ce phénomène s'ils veulent commercialiser des extraits convenables et standardisés, l'avenir du *Chrysanthellum* pourrait en dépendre.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M. le Professeur B. L. TURNER du Department of Botany, The University of Texas at Austin (U.S.A.) qui a identifié l'échantillon de *Chrysanthellum* que nous avons étudié.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRASSEUR (Th.), ANGENOT (L.), PINCEMAIL (J.) et DEBY (C.). — Compte rendu des Journées Internationales d'Etude du Groupe Polyphénols, Montpellier (France), 9-11 juillet 1986, vol. 13, 557.
- [2] BRASSEUR (Th.) et ANGENOT (L.). — *J. Chromatogr.*, 1986, **351**, 351.
- [3] DEBY (C.) et MAGOTTEAUX (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1970, **164** (12), 2675.
- [4] HAVSTEEN (B.). — *Biochem. Pharmacol.*, 1983, **32** (7), 1141.
- [5] HONORE-THOREZ (D.). — *J. Pharm. Belg.*, 1985, **40**, 5, 323.
- [6] LIÈVRE (H.), GUILLOT (B.) et REYMOND (E.). — *Journal du « Jeune Praticien »*, 1984, n° 7, 1.
- [7] MARKHAM (K. R.). — *Techniques of Flavonoid Identification*, 1982, Academic Press (London), 1.
- [8] RUSZNYAK (S.) et SZENT-GYORGYI (A.). — *Nature*, 1936, **138**, 27.
- [9] SWIES (J.) et coll. — *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1984, **36**, 455.
- [10] VARMA (S.), MIKUNI (I.) et KINOSHITA (J.). — *Science*, 1975, **188**, 1215.
- [11] WAGNER (H.). — *Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 1985, 25, Oxford University Press, 409.