



Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea)

Serigne Omar SARR^{1*}, Alioune Dior FALL², Rokhaya GUEYE¹, Amadou DIOP¹,
Khady DIATTA², Ndeye DIOP¹, Bara NDIAYE¹ et Yérim Mbagnick DIOP¹

¹ Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, Université Cheikh Anta DIOP,
B.P. 5005, Dakar-Fann, Sénégal.

² Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique, Université Cheikh Anta DIOP,
B.P. 5005, Dakar-Fann, Sénégal.

*Auteur correspondant, E-mail : sosarr1@yahoo.fr

RESUME

L'objectif de la présente étude était d'évaluer l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* par spectrophotométrie en utilisant les méthodes de piégeage des radicaux libres 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyle (DPPH[•]) et acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}). Une extraction éthanolique des feuilles de *Vitex doniana* a été effectuée au Soxhlet. L'extrait sec recueilli a été redissout dans de l'eau puis fractionné en utilisant successivement de l'hexane, du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle. Les propriétés antioxydantes de l'extrait éthanolique et celles de ses différentes fractions ont été évaluées aux concentrations de 2,5 ; 10 ; 100 et 200 µg/mL. Les pourcentages d'inhibition (PI) expriment l'effet antioxydant mesuré. L'extrait éthanolique et ses différentes fractions ont présenté une activité de piégeage des deux radicaux libres. Lors des tests d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH[•], les PI ont varié de (18,15±0,01)% pour la fraction hexanique (2,5 µg/mL) à (92,45±0,01)% pour la fraction d'acétate d'éthyle (100 µg/mL). Avec le radical ABTS^{•+}, les PI ont varié de (52,76±0,05)% pour la fraction hexanique (2,5 µg/mL) à (98,27±0,12)% pour la fraction d'acétate d'éthyle (100 µg/mL). Ainsi, l'extrait éthanolique des feuilles de *Vitex doniana* et ses différentes fractions possèdent un pouvoir antioxydant significatif.

Mots clés : Activité antioxydante, DPPH, ABTS, *Vitex doniana*.

INTRODUCTION

L'oxydation représente un processus indispensable dans le métabolisme des cellules aérobies de l'organisme. Elle met en jeu la molécule d'oxygène dont la production par des voies métaboliques non contrôlées engendre la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que les radicaux libres superoxyde O₂^{•-}, hydroxyl HO[•], alkoxyyl RO[•] et peroxyyl RO₂[•]. Ces radicaux sont impliqués dans le stress oxydant qui est caractérisé par

un déséquilibre entre la production des ERO (prooxydants) et l'élimination de ces espèces par le mécanisme de défense antioxydante. Le stress oxydant peut engendrer l'endommagement de molécules comme les lipides, l'ADN, les glucides et les protéines. Les radicaux libres sont également impliqués dans le développement de nombreuses pathologies telles que l'obésité, le cancer, le diabète, l'inflammation, l'athérosclérose et les maladies dégénératives (Al-Laith, 2010 ;

Codoñer-Franch et al., 2011 ; Rashid et al., 2013).

Les antioxydants constituent une famille de substances susceptibles de neutraliser les radicaux libres et prévenir ainsi la survenue des maladies associées au stress oxydant. Parmi les antioxydants naturels les plus connus, nous pouvons citer l' α -tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les composés phénoliques (Kulawik et al., 2013).

Les plantes médicinales traditionnelles ainsi qu'une alimentation équilibrée représentaient les principales sources d'antioxydants qui protégeaient nos ancêtres des lésions engendrées par les radicaux libres (Sen et Chakraborty, 2011).

De nombreuses plantes médicinales, telle *Vitex doniana* (Verbenaceae) appartenant à la flore sénégalaise, sont utilisées dans le traitement des pathologies impliquant stress oxydant (Osum et al., 2013 ; James et al., 2014).

C'est dans ce contexte que nous avons étudié l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* dont aucune toxicité n'est associée (Muanda, 2010). L'effet antioxydant des extraits de cette plante a été évalué par spectrophotométrie moléculaire en utilisant les méthodes de piégeage des radicaux libres acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}) et 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyle (DPPH[•]).

MATERIEL ET METHODES

Mesure de l'activité antioxydante par le test ABTS

Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium (K₂S₂O₈) pour former le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert (Figure 1). L'addition d'un composé antioxydant engendre la réduction du radical ABTS^{•+} en ABTS. L'activité antioxydante est déterminée par la décoloration de la solution et s'exprime par le pourcentage d'inhibition (PI) de l'absorbance à 734 nm, longueur d'onde à laquelle le

radical ABTS^{•+} présente une bande d'absorption caractéristique (Osman et al., 2006 ; Moon et Shibamoto, 2009).

Mesure de l'activité antioxydante par le test DPPH

Le test DPPH repose sur la théorie qu'un donneur d'hydrogène est un antioxydant. Le radical DPPH[•], de coloration violette et qui présente une bande d'absorption caractéristique à 517 nm, accepte l'hydrogène qui est cédé par l'antioxydant pour former le DPPH (Figure 2). L'effet de l'antioxydant est proportionnel à la disparition du radical DPPH[•] et à la décoloration de la solution du violet au jaune. L'activité antioxydante s'exprime par le PI de l'absorbance à 517 nm (Moon et Shibamoto, 2009).

Dans les deux tests, le PI de l'absorbance correspond à :

$$PI = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A₀ : absorbance de la solution d'ABTS^{•+} ou de DPPH[•] pure

A₁ : absorbance de la solution d'ABTS^{•+} ou de DPPH[•] après ajout de l'extrait testé à une concentration donnée et après un temps donné.

Matériel végétal

Le matériel végétal était constitué de feuilles de *Vitex doniana*. Ces feuilles ont été récoltées au mois de décembre 2011 dans la communauté rurale de Noto Gouye Diama (Arrondissement de Pambal, Département de Tivaouane, Thiès, Sénégal). Elles ont été identifiées au Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar où un herbier a été déposé. Le séchage a été effectué à la température ambiante dans une salle aérée dudit Laboratoire pendant trois semaines. Après séchage, les feuilles ont été pulvérisées

mécaniquement à l'aide d'un broyeur à couteaux.

Réactifs et solvants utilisés

Les solvants utilisés (éthanol, hexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle) ont été fournis par Technical House (Dakar, Sénégal). L'ABTS provenait de Appllichem (Darmstadt, Germany). Le DPPH^{*} et le persulfate de potassium ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). La quercétine provenait de Extrasynthèse (Genay, France). L'acide ascorbique a été fourni par Panreac (Lyon, France).

Appareil de mesure des absorbances

Les mesures des absorbances ont été effectuées en utilisant un spectrophotomètre UV/Vis Jasco V-570, 44100 Nantes, France.

Extraction éthanolique

Une quantité de 150 g de poudre des feuilles de *Vitex doniana* a été extraite au Soxhlet pendant une heure avec 2 L d'éthanol. Après filtration, l'extrait éthanolique recueilli a été évaporé sous pression réduite pour produire un résidu sec.

Fractionnement liquide/liquide de l'extrait éthanolique

L'extrait sec éthanolique, dissout dans de l'eau à 60 °C, a été extrait à deux reprises avec de l'hexane. Les phases hexaniques rassemblées ont été évaporées pour constituer la fraction hexanique. La phase aqueuse résiduelle a été extraite successivement avec du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle, à deux reprises pour chaque solvant. Les phases dichlorométhanique et d'acétate d'éthyle ainsi que la phase aqueuse résiduelle ont été évaporées séparément afin d'obtenir : une fraction dichlorométhanique, une fraction d'acétate d'éthyle et une fraction aqueuse. L'extrait éthanolique et l'ensemble des fractions se présentaient sous la forme d'une pâte de coloration vert foncé.

Mesure de l'activité antioxydante par le test DPPH

La méthode utilisée a été décrite par Molyneux (2003). Une quantité de 4 mg de poudre de DPPH^{*} a été dissoute dans 100 mL d'éthanol et la solution obtenue a été conservée à l'abri de la lumière pendant 12 h.

Dans chaque tube à essai contenant 0,8 mL d'une solution éthanolique de l'extrait testé à différentes concentrations initiales (2,5 ; 10 ; 100 et 200 µg/mL), la solution de DPPH^{*} (3,2 mL) a été rajoutée. L'acide ascorbique et la quercétine, utilisés comme antioxydants de référence, ont également été testés à ces mêmes concentrations.

La lecture de l'absorbance a été faite au bout de 30 minutes au spectrophotomètre à 517 nm en utilisant l'éthanol comme blanc. Trois mesures de l'absorbance ont été effectuées pour chaque concentration testée (n=3).

Mesure de l'activité antioxydante par le test ABTS

La méthode utilisée a été celle décrite par Leong et Shui (2002). Une quantité de 38,40 mg d'ABTS a été préalablement dissoute dans 10 mL d'eau avant ajout de 6,75 mg de persulfate de potassium. Le mélange obtenu a été conservé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 h avant usage. Il a été par la suite dilué avec de l'éthanol afin d'obtenir une absorbance de l'ordre de 0,7 à 734 nm.

L'activité antioxydante a été mesurée en additionnant 2 mL d'une solution éthanolique de l'extrait testé à 2 mL de la solution d'ABTS⁺. Les extraits ont été testés aux concentrations suivantes : 2,5 ; 10 ; 100 et 200 µg/mL. L'acide ascorbique et la quercétine, utilisés comme antioxydants de référence, ont été testés aux mêmes concentrations.

La lecture de l'absorbance a été faite au bout de 2 minutes au spectrophotomètre à 734 nm en utilisant l'éthanol comme blanc. Trois mesures de l'absorbance ont été effectuées pour chaque concentration testée (n=3).

Expression des résultats et analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées par analyse de la variance (ANOVA) suivie des tests de Fisher et de Scheffe. La différence a été considérée comme significative lorsque $p < 0,05$ par rapport au témoin négatif. Ces analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel Statview (version 5.0).

RESULTATS

Activité antioxydante

Test avec le radical DPPH[•]

Les résultats des tests d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH[•], par l'extrait éthanolique des feuilles de *Vitex doniana* et ses fractions, sont présentés dans le Tableau 1. L'extrait éthanolique et ses fractions hexanique, dichlorométhanique, d'acétate d'éthyle et aqueuse ont inhibé l'absorbance du radical DPPH[•] de manière dose dépendante. Aux concentrations de 2,5 et 10 µg/mL, l'extrait éthanolique et ses fractions ont présenté une activité antioxydante modérée ; le meilleur PI de l'absorbance du radical DPPH[•] étant de (40,06±0,01)% pour la fraction aqueuse à 10 µg/mL. La fraction d'acétate d'éthyle, aux concentrations de 100 et 200 µg/mL, a inhibé de manière plus significative l'absorbance du radical DPPH[•] par rapport à l'extrait éthanolique et ses autres

fractions. Les PI associés à la fraction d'acétate d'éthyle ont été de (92,45±0,01)% et (92,03±0,02)% respectivement à 100 et 200 µg/mL. Ces deux PI représentaient les meilleurs résultats obtenus pour les échantillons de *Vitex doniana* et ils se rapprochaient des PI associés aux antioxydants de référence.

Test avec le radical ABTS^{•+}

Les résultats des tests d'inhibition de l'absorbance du radical ABTS^{•+}, par l'extrait éthanolique des feuilles de *Vitex doniana* et ses fractions, sont présentés dans le Tableau 2. L'ensemble des échantillons testés ont inhibé l'absorbance du radical ABTS^{•+}. Cette inhibition était dose dépendante pour les fractions hexanique, dichlorométhanique, d'acétate d'éthyle et aqueuse. L'effet dose dépendant a été observé jusqu'à 100 µg/mL pour l'extrait éthanolique. A la concentration de 200 µg/mL, l'extrait éthanolique a présenté un PI nettement inférieur à celui de chacune de ses fractions. La fraction d'acétate d'éthyle à 100 µg/mL a inhibé le radical ABTS^{•+} de manière plus significative que la quercétine. A la concentration de 200 µg/mL, cette fraction d'acétate d'éthyle possédait une activité antioxydante supérieure à celle de l'extrait éthanolique et de ses autres fractions et qui était sensiblement égale à l'activité associée à l'acide ascorbique.

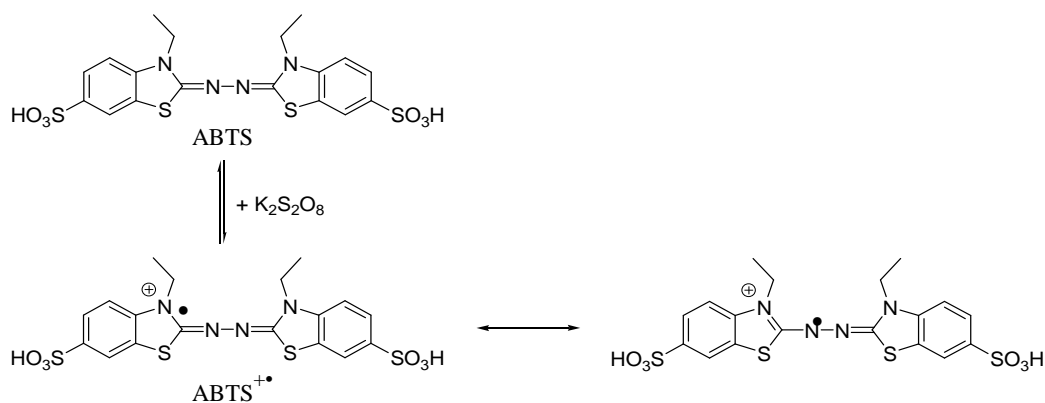


Figure 1 : Formation du radical cation ABTS^{•+} à partir de l'ABTS.

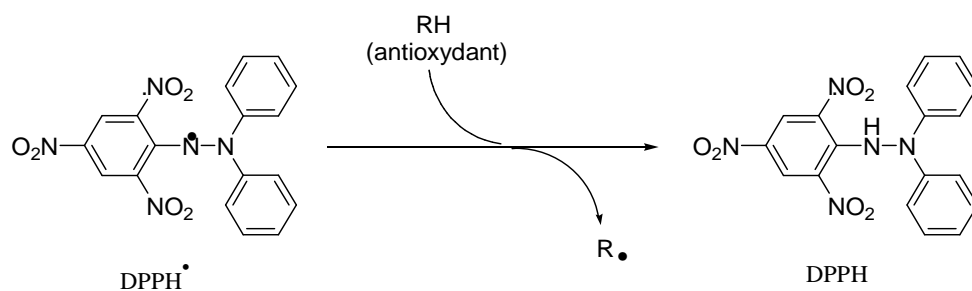


Figure 2 : Réaction entre le DPPH[•] et le composé antioxydant pour former le DPPH.

Tableau 1 : Pourcentage d'inhibition (moyenne ± ESM) de l'absorbance du radical DPPH[•] par les différents échantillons de *Vitex doniana* et les composés antioxydants de référence.

Echantillons	2,5 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
Extrait éthanolique	20,93±0,04	35,23±0,03	81,39±0,06	84,14±0,03
Fraction hexanique	18,15±0,01	30,53±0,01	73,86±0,01	78,45±0,01
Fraction dichlorométhanique	22,45±0,08	28,74±0,01	45,07±0,02	54,61±0,05
Fraction d'acétate d'éthyle	20,45±0,02	37,59±0,05	92,45±0,01	92,03±0,02
Fraction aqueuse	21,34±0,01	40,06±0,01	82,67±0,01	88,15±0,01
Quercétine	91,51±0,02	97,80±0,01	97,86±0,01	99,37±0,01
Acide ascorbique	68,69±0,04	95,01±0,13	98,04±0,05	98,24±0,05

n= 3 pour chaque échantillon testé
p<0,05 versus témoin négatif

Tableau 2 : Pourcentages d'inhibition (moyenne ± ESM) de l'absorbance du radical ABTS^{•+} par les différents échantillons de *Vitex doniana* et les composés antioxydants de référence.

Echantillons	2,5 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
Extrait éthanolique	55,42±0,06	60,07±0,05	74,88±0,01	66,42±0,01
Fraction hexanique	52,76±0,05	58,50±0,13	81,07±0,07	89,76±0,08
Fraction dichlorométhanique	54,19±0,05	59,08±0,02	93,07±0,38	95,62±0,64
Fraction d'acétate d'éthyle	59,17±0,11	68,83±0,02	98,27±0,12	98,23±0,09
Fraction aqueuse	54,35±0,03	61,68±0,02	75,80±0,23	97,39±0,36
Quercétine	98,14±0,05	98,01±0,05	97,22±0,03	99,54±0,01
Acide ascorbique	92,60±0,05	94,94±0,04	99,47±0,40	98,81±0,05

n= 3 pour chaque échantillon testé
p<0,05 versus témoin négatif

DISCUSSION

Le fractionnement de l'extrait éthanolique de la poudre de feuilles de *Vitex doniana* a produit majoritairement une fraction aqueuse par rapport aux fractions hexanique, d'acétate d'éthyle et

dichlorométhanique. Par ailleurs, Agbafor et Nwachukwu (2011) ont décrit l'eau et l'éthanol comme les solvants les plus adéquats pour l'extraction des constituants des feuilles de *Vitex doniana*.

L'extrait éthanolique de la poudre des feuilles de *Vitex doniana* et ses fractions ont globalement présenté une inhibition dose dépendante de l'absorbance des radicaux DPPH[•] et ABTS^{•+}. Des travaux antérieurs avaient également associé une activité similaire aux extraits aqueux, dichlorométhanique, éthanolique, hydroalcoolique et méthanolique des feuilles de *Vitex doniana*, sur l'absorbance du radical DPPH[•] (Agbafor et Nwachukwu, 2011 ; Lagnika et al., 2012).

Dans notre étude, la fraction aqueuse était plus active que l'extrait éthanolique sur l'inhibition des deux radicaux libres dès 10µg/mL. Par ailleurs, dans les travaux menés par Agbafor et Nwachukwu (2011), l'extrait aqueux des feuilles de *Vitex doniana* inhibait de manière plus significative l'absorbance du radical DPPH[•] par rapport à l'extrait éthanolique.

Les PI obtenus avec le radical DPPH[•] étaient généralement plus faibles que ceux mesurés avec le radical ABTS^{•+}. Ceci pourrait s'expliquer par la présence, dans les différents échantillons de *Vitex doniana*, de substances qui présentent des bandes d'absorption à la même longueur d'onde que le radical DPPH[•] ; engendrant ainsi une augmentation de la densité optique et une diminution du PI.

L'objectif du fractionnement bioguidé consistait à identifier une fraction dont l'activité antioxydante est supérieure à celle de l'extrait éthanolique total. Les feuilles de *Vitex doniana* contiennent des flavonoïdes, des tanins, des terpénoïdes, des composés phénoliques, des alcaloïdes et les vitamines A, C et E (Suleïman et Yusuf, 2008 ; Muanda, 2010 ; James et al., 2014). Les hétérosides flavoniques, les tanins ainsi que la vitamine C devraient être extraits par les solvants polaires utilisés lors du fractionnement (éthanol, eau et acétate d'éthyle). Les dérivés terpéniques et les vitamines A et E devraient être localisés au niveau des fractions hexanique et dichlorométhanique apolaires. Les résultats de la présente étude indiquent que les activités antioxydantes les plus significatives sont

associées aux fractions d'acétate d'éthyle et aqueuse, notamment à des concentrations supérieures à 100 µg/mL. Ceci peut être liée à la présence, dans ces fractions, de composés phénoliques polaires (Suleïman et Yusuf, 2008 ; Muanda, 2010 ; Lagnika et al., 2012). Shon et al. (2003) avaient montré que le méthanol puis l'eau chaude étaient les solvants les plus adéquats pour l'extraction des composés phénoliques qui procurent à *Phellinus baumii* son activité antioxydante. Ils avaient également décrit que la teneur en composés phénoliques de l'extrait d'acétate d'éthyle d'oignons était à l'origine de son pouvoir antioxydant. Les terpénoïdes et les vitamines, auxquels un effet antiradicalaire est associé, ont pu conférer aux fractions apolaires l'activité remarquable dans la présente étude (Soetan, 2008).

Conclusion

Il ressort de ce travail que l'extrait éthanolique des feuilles de *Vitex doniana* ainsi que ses différentes fractions possèdent un pouvoir antioxydant significatif.

Des études complémentaires seront effectuées afin d'isoler et d'identifier les principales molécules impliquées dans l'activité antioxydante. Par ailleurs, la fabrication d'un phytomédicament peu onéreux, au profit des populations démunies, pourrait être envisagée à partir des feuilles de *Vitex doniana*.

REFERENCES

- Agbafor KN, Nwachukwu N. 2011. Phytochemical analysis and antioxidant property of leaf extracts of *Vitex doniana* and *Mucuna pruriens*. *Biochem. Res. Int.*, **2011**: 1-4.
- Al-Laith AAA. 2010. Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *J. Food Compos. Anal.*, **23**(1): 15-22.
- Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V, Arilla-Codoñer A, Alonso-Iglesias E. 2011.

- Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Translational Res.*, **158**(6): 369-384.
- James DB, Sheneni VD, Kadejo OA, Yatai, KB. 2014. Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities in different solvent extracts of *Vitex doniana* leaves, stem bark and root bark. *Am. J. Biomed & Life Sciences*, **2**(1): 22-27.
- Kulawik P, Özogul F, Glew R, Özogul Y. 2013. Significance of antioxidants for seafood safety and human health. *J. Agric. Food Chem.*, **61**(3):475-491.
- Lagnika L, Amoussa M, Adjovi Y, Sanni A. 2012. Antifungal, antibacterial and antioxidant properties of *Adansonia digitata* and *Vitex doniana* from Benin pharmacopeia. *J. Pharmacognosy Phytother.*, **4**(4): 44-52.
- Leong LP, Shui G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.*, **76**(1): 69-75.
- Molyneux P. 2003. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Techno.*, **26**(2):211-219.
- Moon J-K, Shibamoto T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.*, **57**(5): 1655-1666.
- Muanda FN. 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. PhD thesis, Université Paul Verlaine-Metz, Metz, p.33.
- Osman AM, Wong KKY, Fernyhough A. 2006. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346**(1): 321-329.
- Osum FI, Okonkwo TM, Okafor GI. 2013. Effect of processing methods on the chemical composition of *Vitex doniana* leaf and leaf products. *Food Sci. Nutr.*, **1**(3): 241-245.
- Rashid K, Sinha K, Sil PC. 2013. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem. Toxicol.*, **62**: 584-600.
- Sen S, Chakraborty R. 2011. The role of antioxidants in human health. In *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy*, Andreescu S, Hepel M (eds). ACS symposium series: Washington, DC; 1-37.
- Shon MY, Kim TH, Sung NJ. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* extracts. *Food Chem.*, **82**(4): 593-597.
- Soetan KO. 2008. Pharmacological and other beneficial effects of anti-nutritional factors in plants- A review. *Afr. J. Biotechnol.*, **7**(25): 4713-4721.
- Suleiman MM, Yusuf S. 2008. Antidiarrheal Activity of the Fruits of *Vitex doniana* in Laboratory Animals. *Pharm. Biol.*, **46**(6):387-392.