



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-ethanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach.

Serigne Ibra Mbacke DIENG^{1*}, Alioune Dior FALL¹, Kady DIATTA-BADJI¹,
Abdou SARR¹, Madieye SENE², Moussa SENE¹, Amadou MBAYE¹, William DIATTA¹
et Emmanuel BASSENE¹

¹ Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique,
Université Cheikh Anta DIOP, B.P. 5005, Dakar-Fann, Sénégal.

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

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

RESUME

Les radicaux libres étant impliqués dans la genèse de plusieurs maladies, l'intérêt porté à la recherche d'antioxydants naturels a considérablement augmenté ces dernières années. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité antioxydante des extraits hydro-éthanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii*. La détermination de la teneur en polyphénols a été effectuée par la méthode de Folin Denis. L'activité antiradicalaire a été évaluée par les tests de réduction du DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et de l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)). Le pouvoir réducteur vis-à-vis de l'ion ferrique a été également évalué. Il ressort de ces tests que les écorces sont environ deux fois plus riches en polyphénols que les feuilles. Les CI_{50} des extraits des écorces et des feuilles sur DPPH sont respectivement de $46,8 \pm 5,77 \mu\text{g/ml}$ et $138,9 \pm 2,03 \mu\text{g/ml}$. Concernant le test ABTS les CI_{50} des deux extraits sont $39,3 \pm 1,00 \mu\text{g/ml}$ et $109 \pm 6,25 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Le pouvoir réducteur des écorces est supérieur à celui des feuilles à toutes les concentrations testées. Donc les écorces présentent une activité antioxydante meilleure que celle des feuilles de cette plante.

© 2017 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : *Piliostigma thonningii*, activité antioxydante, phénols totaux.

Evaluation of the antioxidant activity of hydro-ethanolic leaf and bark extracts of *Piliostigma thonningii* Schumach

ABSTRACT

Free radicals are involved in the genesis of several diseases, what makes increasing research for natural antioxidants in recent years. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant activity of the hydro-ethanolic leaf and bark extracts of *Piliostigma thonningii*. The polyphenol content was determined with Folin Denis reagent. The antiradical activity was evaluated using

© 2017 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v11i2.19>

2932-IJBCS

DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) reduction tests. The reducing power was also performed using ferric reducing. (FRAP). All experiments were done in triplicate. From these tests, it appears that the bark is approximately twice as rich in polyphenols as the leaves. The IC₅₀ of the bark and leaf extracts on DPPH are respectively 46.8 ± 5.77 µg/ml and 138.9 ± 2.03 µg/ml. On ABTS test, bark and leaf extracts had exhibited scavenger activity with respective IC₅₀ values 39.3 ± 1.00 µg / ml and 109 ± 6.25 µg / ml. Reducing power of bark extract was higher than that of leaf extract at all tested concentrations. Therefore, the bark exhibits a better antioxidant activity than that of the leaves of this plant.

© 2017 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: *Piliostigma thonningii*, antioxidant activity, Total polyphenol content.

INTRODUCTION

Les radicaux libres seraient à l'origine de plusieurs pathologies parmi lesquelles nous pouvons citer les arthroses, l'asthme, le cancer, le diabète, les maladies cardiaques, l'athérosclérose (Codoñer-Franch et al., 2011 ; Sarr et al., 2015). Selon Pousset (2006), l'utilisation de produits naturels (fruits, légumes) riches en antioxydants pourrait jouer un rôle important dans la prévention de ces maladies. Par ailleurs, le coût élevé des prestations de santé et des médicaments ainsi que les facteurs socio-économiques poussent une grande partie de la population à utiliser les plantes médicinales pour se soigner (Agban et al., 2013). De nos jours, 80% de la population ont au moins une fois recours à la phytothérapie (Arbonnier, 2002). Une attitude qui peut être également liée à la culture et à la civilisation ancestrales, qui se basent entièrement ou partiellement sur la phytothérapie en raison de l'efficacité, de l'accessibilité et de la disponibilité des plantes médicinales (Akharalyi et al., 2010).

C'est dans ce contexte que nous nous intéressons à l'étude de l'activité antioxydante des extraits hydro-alcooliques des feuilles et des écorces de *Piliostigma thonningii* (Caesalpinaceae). C'est une espèce retrouvée dans toutes les savanes soudano-guinéennes

de l'Afrique intertropicale (Botswana, Mali, Kenya, Namibia, Senegal, South Africa, Sudan, Nigeria, Tanzania, Uganda, Zambia). Plusieurs composés tels que le piliostigmine, le stigmastadiénol, quercétine et la quercétine ont été isolés à partir de ses feuilles et écorces (Pousset, 2004 ; Ekoumou, 2003). Les écorces de la plante sont douées d'activités anti inflammatoire, antalgique, anthelminthique et antibactérienne (Pousset, 2004).

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal a été constitué de feuilles et d'écorces de *Piliostigma thonningii* récoltées en décembre 2016 au niveau du carré botanique de Sambandé, un village situé au Centre du Sénégal. La plante a été identifiée au Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Les parties de plantes récoltées ont été lavées puis séchées à la température ambiante dans une salle aérée dudit laboratoire pendant trois semaines avant d'être réduites en poudre.

Extraction

L'extraction a été faite par décoction sous reflux de 50 g de poudre dans 500 ml d'un mélange hydro-éthanolique (20V/80V respectivement) pendant 30 mn dans le but d'extraire au maximum les composés polaires tels que les polyphénols.

Après filtration sur papier Whatman No.1, les filtrats obtenus ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à 60 °C. Les résidus de ce filtrat ont été séchés à l'étuve pendant 48 h à 45 °C pour obtenir les extraits secs.

Criblage Phytochimique

La présence des principaux groupes chimiques dans les extraits a été recherchée en utilisant les tests décrits par Bassene (2012) : flavonoïdes (test de Shibata), tanins (réaction de Stiasny suivie de celle du chlorure ferrique), caroténoïdes (réaction de Carr-Price), anthracénosides (réaction de Borntraeüger), alcaloïdes (Réactif de Dragendorff[®]), stérols (réaction de Liebermann-Buchard), hétérosides cardiotoniques (réactions de Baljet, Kedde et Raymond-Marthoud) et saponosides (indice de mousse).

Teneur en polyphénols

Les teneurs en polyphénols des extraits sont déterminées par la méthode de Folin-Denis (Elgailani et Ishak, 2014). Dans 1 ml de la solution de chaque extrait, est ajouté 1 ml du réactif de Folin-Denis, puis 3 mn après 1 ml de carbonate de sodium à 25%. Après 2 heures d'incubation, les échantillons sont centrifugés à 4000 tours/mn pendant 4 minutes. Les absorbances ont été ensuite lues au spectrophotomètre à 670 nm. Trois essais

ont été effectués pour chaque concentration de produit testé.

Une courbe d'étalonnage établie à partir d'une série de dilution d'acide tannique (0,005-0,01-0,015-0,02-0,025-0,03-0,035-0,04 mg/ml) a été traitée de la même manière que les extraits. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait sec (mg EAT/g).

Activité antioxydante

Test DPPH

La détermination de l'activité antiradicalaire par le test de DPPH a été effectuée en utilisant la méthode décrite par Molyneux (2003) légèrement modifiée. Une solution éthanolique de DPPH[•] a été préparée en dissolvant 4 mg de ce produit dans 100 ml d'éthanol. Ensuite, à 50 µl d'extrait à une concentration donnée sont ajoutés 950 µl de la solution DPPH. Les extraits ainsi que la référence (acide ascorbique) sont testés à différentes concentrations (250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 15,62 - 7,81 µg/ml); puis les absorbances ont été mesurées à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produit testé.

L'activité antioxydante liée à l'effet de piégeage du radical DPPH[•] est exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) à l'aide de la formule suivante :

$$PI = 100(A_0 - A_1)/A_0$$

A₀ : absorbance DPPH A₁ : absorbance échantillon

La CI₅₀ (concentration de l'échantillon nécessaire pour neutraliser 50% des radicaux libres) a été obtenue en utilisant le logiciel Statgraphics Plus 5.0.

Test **ABTS**

L'activité antiradicalaire a été également évaluée par le test de décoloration du radical cation ABTS^{•+} selon la technique utilisée par Khan et al. (2012). L'ABTS a été dissous dans l'eau distillée à une concentration de 7 mM. La solution du radical cation ABTS^{•+} a été obtenue en incubant pendant 12 à 16 h à l'obscurité et à la température ambiante un mélange à volumes égaux de la solution mère d'ABTS avec une solution de persulfate de potassium à 2,45 mM. La solution ABTS^{•+} a été diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de 0,700 ± 0,02 à 734 nm avant l'utilisation.

Ensuite, 1,5 ml de la solution d'ABTS^{•+} a été mélangé avec 50 µl d'extrait ou de la référence (acide ascorbique) à différentes concentrations (250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 15,62 - 7,81 µg/ml). Les absorbances sont mesurées à 734 nm après une incubation de 10 minutes à l'obscurité et à la température ambiante. Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produit testé et les résultats exprimés en Pourcentage d'Inhibition (PI) et en CI₅₀ comme précédemment décrits pour le test DPPH.

Test **FRAP** (*Ferric Reducing antioxidant Power*)

Le pouvoir réducteur des extraits est déterminé par la méthode de FRAP (Bassène, 2012). Ainsi, 0,4 ml d'échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 1 ml de tampon phosphate (0,2 M; pH=6,6) et 1 ml d'hexacyanoferrate de potassium [K₃Fe(CN)₆] à 1%. Après une incubation du mélange à 50 °C pendant 30 minutes, 1 ml d'acide trichloracétique 10 % y était ajouté, puis les tubes sont centrifugés à 3000 tours/mn pendant 10 minutes. Ensuite, 1 ml du

surageant de chaque tube est mélangé avec 0,2 ml d'une solution de FeCl₃ à 0,1% et laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 30 minutes avant de mesurer les absorbances à 700 nm. L'activité antioxydante liée au pouvoir réducteur des extraits est exprimée en Pouvoir Réducteur (PR) à l'aide de la formule suivante :

$$PR = 100(A_a - A_b) / A_a$$

A_a: absorbance de l'extrait A_b:
absorbance du blanc

Analyses statistiques

Les tests de significativité sont effectués par le test de Fisher en utilisant le logiciel StatView. Une valeur de p < 0,05 a été considérée comme étant statistiquement significative.

RESULTATS

Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique a révélé la présence de flavonoïdes, de tanins et de saponosides aussi bien au niveau des feuilles que des écorces. Les alcaloïdes, les anthracénosides, les caroténoïdes, les stérols, les coumarines, et les hétérosides cardiotoniques n'ont pas été retrouvés dans les deux parties de la plante étudiées.

Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols des écorces (6,16 ± 0,12 mg EAT/g d'extrait sec) obtenue à partir de la courbe d'étalonnage d'acide tannique ($y = 31,262x - 0,0584$ avec un R² = 0,9934) a été environ deux fois supérieure à celle des feuilles (3,12 ± 0,08 mg EAT/g) comme l'atteste la Figure 1.

Activité antioxydante

Test DPPH

A toutes les concentrations testées, les extraits hydro-éthanoliques des feuilles et des écorces ont inhibé significativement le radical DPPH[•] de manière dose dépendante ($p < 0,05$ versus témoin négatif). L'extrait des écorces a montré une activité supérieure à celui des feuilles. En effet, l'extrait des écorces atteint presque son maximum d'activité à 125 µg/ ml avec un pourcentage d'inhibition (PI) de $91,11 \pm 0,59\%$. Quant à l'extrait des feuilles, son PI le plus important ($75,04 \pm 0,91\%$) est observé à la concentration de 250 µg/ ml. L'acide ascorbique utilisé comme référence a inhibé de $97,71 \pm 0,32\%$ le radical DPPH[•] à 62,5 µg/ml puis son activité a évolué en plateau jusqu'à 250 µg/ ml (Figure 2).

Pour mieux comparer les activités des différents extraits de plante testés, les CI_{50} ont été déterminées. Ainsi, l'extrait des écorces a une CI_{50} inférieure à celle des feuilles avec des valeurs respectives de $46,8 \pm 5,77$ µg/ ml et $138,9 \pm 2,03$ µg/ ml. L'acide ascorbique a présenté une CI_{50} égale à $8,5 \pm 0,25$ µg/ ml comme en atteste la Figure 4.

Test ABTS

La Figure 3 montre que le radical cation ABTS^{•+} a été inhibé de façon significative à toutes les concentrations testées, et de manière dose dépendante par les extraits de feuilles et d'écorces. Comme pour le test DPPH, l'extrait des écorces a montré une meilleure activité que celui des feuilles. A la plus faible concentration testée (7,81 µg/ ml), l'extrait des écorces a inhibé de $28,99 \pm$

$2,9\%$ le radical cation ABTS^{•+} contre $9,12 \pm 1,24 \%$ pour celui des feuilles. Tandis qu'à 250 µg/ ml les extraits des écorces et des feuilles ont présenté respectivement des PI de $99,04 \pm 0,08\%$ et $81,09 \pm 0,57 \%$. A cette même concentration le PI de l'acide ascorbique a été évalué à $99,62 \pm 0,34\%$.

Concernant les CI_{50} , celles des extraits des écorces, des feuilles et de l'acide ascorbique correspondent respectivement à $39,3 \pm 1,00$ - $109 \pm 6,25$ µg/ ml et $19,7 \pm 0,62$ µg/ ml (voir Figure 4).

Test FRAP

L'évaluation du pouvoir réducteur des extraits a montré également une meilleure activité de l'extrait des écorces par rapport à celui des feuilles comme le montre la Figure 5. En effet, l'extrait hydro-éthanolique des écorces, aux concentrations de 7,8-15,62-31,25-62,5-125-250 µg/ ml a donné des pouvoirs réducteurs respectifs de $44,91 \pm 0,98\%$ - $66,77 \pm 0,94$ - $78,87 \pm 0,44\%$ - $83,42 \pm 0,10$ - $86,7 \pm 1,12\%$ et $88,37 \pm 2,10\%$. Aux mêmes concentrations, des pouvoirs réducteurs respectifs de $7,2 \pm 0,92\%$ - $27,64 \pm 2,03\%$ - $37,18 \pm 0,54\%$ - $62,77 \pm 1,63\%$ - $72,72 \pm 0,52\%$ - $84,58 \pm 0,23\%$ ont été observés pour l'extrait hydro-éthanolique des feuilles.

Un fort pouvoir réducteur a été noté avec la référence avec des valeurs de l'ordre de $26,89 \pm 0,74\%$ - $94,14 \pm 0,29\%$ - $96,26 \pm 0,19\%$ - $96,62 \pm 0,03\%$ - $96,81 \pm 0,08\%$ - $97,09 \pm 0,32\%$ respectivement pour les mêmes concentrations que les extraits.

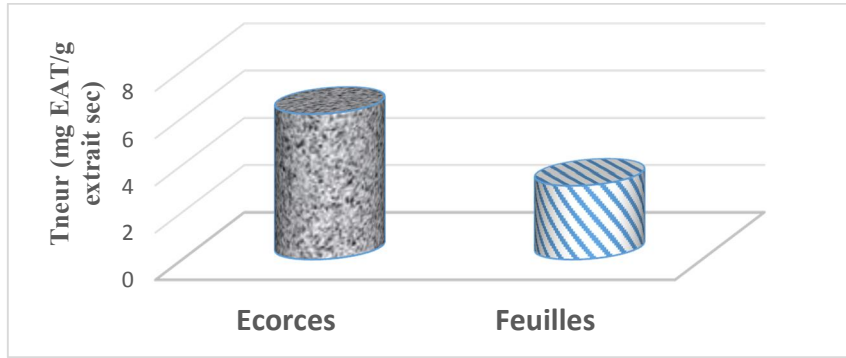


Figure 1 : Teneurs en polyphénols des écorces et feuilles.

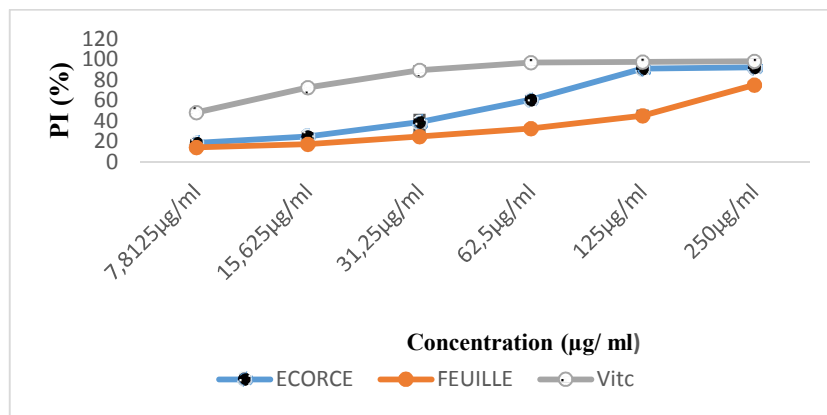


Figure 2 : Pourcentage d'inhibition radical DPPH par les extraits des feuilles et écorces ainsi que de l'acide ascorbique.

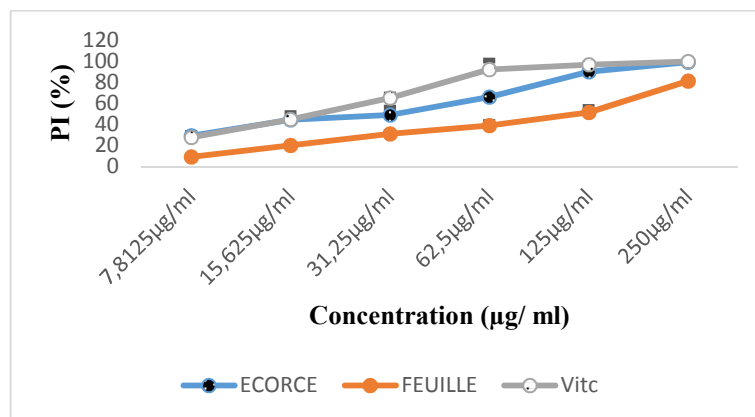


Figure 3: Pourcentage d'inhibition du cation ABTS⁺ par les extraits des feuilles et écorces ainsi que de l'acide ascorbique.

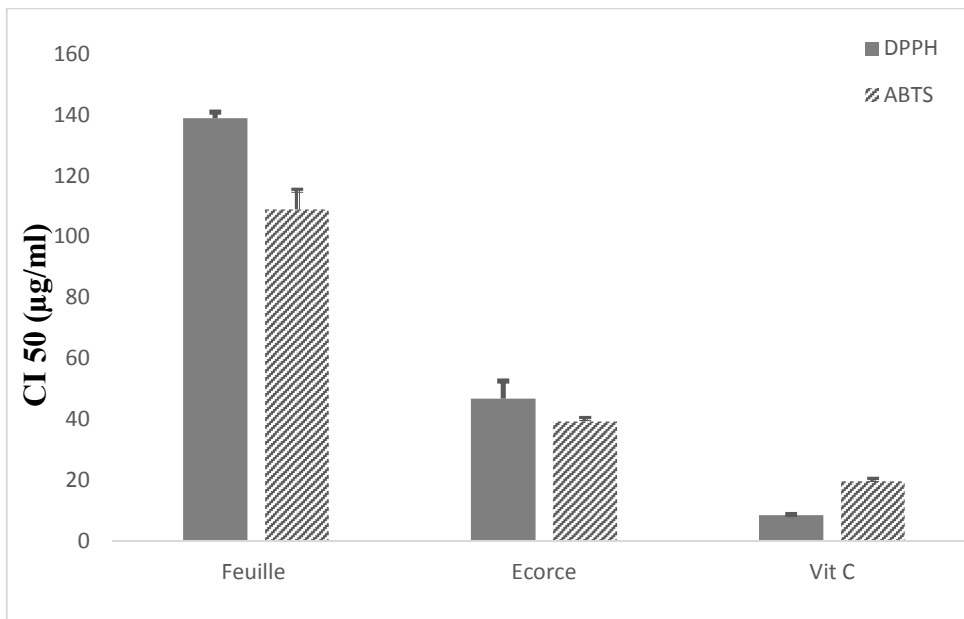


Figure 4 : Les CI₅₀ des extraits et la référence en fonction des méthodes.

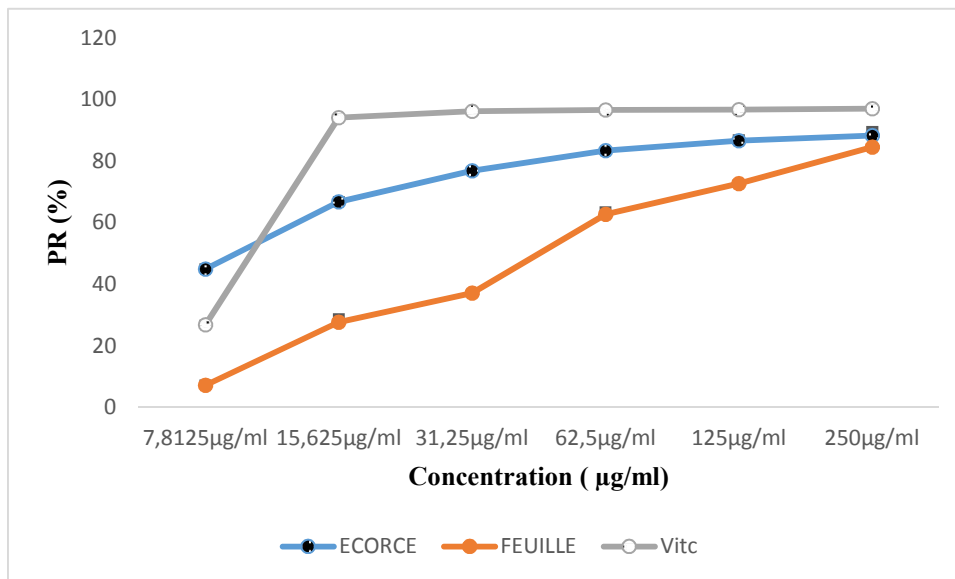


Figure 5 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles et d'écorces ainsi que celui de l'acide ascorbique.

DISCUSSION

L'utilisation d'un solvant hydro-alcoolique a permis d'extraire, à partir des feuilles et des écorces de *P. thonningii*, des composés polaires tels que les polyphénols qui font partie des principaux composants des plantes à activité antioxydante (Akanni et al., 2014 ; Fall et al., 2015; Sarr et al., 2015). Cette notion de polarité semble être confirmée par le criblage phytochimique qui révèle la présence de flavonoïdes, tanins et saponosides aussi bien au niveau des feuilles que des écorces. Ces résultats corroborent ceux décrits par Yemoa et al. (2008) sur les feuilles de *Piliostigma thonningii*.

Concernant l'activité antioxydante, les résultats obtenus ont montré que l'extrait hydro-éthanolique des écorces de *P. thonningii* est plus actif que celui des feuilles sur l'ensemble des 3 tests effectués avec des CI_{50} plus bas. Par ailleurs, aux mêmes concentrations testées, les PI obtenus par le test du DPPH sont inférieurs à ceux de la méthode à l'ABTS. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de substances qui présentent des bandes d'absorption à la même longueur d'onde que le radical DPPH entraînant ainsi une augmentation de l'absorbance (Sarr et al., 2015). Le test FRAP montre un meilleur pouvoir réducteur de l'ion ferrique des écorces par rapport aux feuilles.

Ainsi par ces 3 tests, on constate que l'activité antioxydante des écorces est plus forte que celle des feuilles. Ce qui pourrait s'expliquer par la teneur en polyphénols des écorces qui est environ deux fois supérieure par rapport aux feuilles comme précédemment décrit par Dudonne et al. (2009).

Conclusion

Ce travail montre que l'extrait hydro-éthanolique des écorces présente une forte activité antioxydante par rapport aux feuilles. Une étude ultérieure dans le but d'isoler et

identifier des molécules à activité antioxydante pourrait permettre de mieux connaître la nature des principes actifs.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

La récolte et l'identification des parties de plantes utilisées ont été effectuées par MS, SIMD, KD-B et WD ; SIMD, ADF, MS et AS ont participé à l'extraction et au dosage des polyphénols. Les tests d'activité antioxydante ont été réalisés par SIMD, ADF, AS et MS. Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement par SIMD et AM. Enfin, la supervision des travaux et la rédaction de l'article ont été faites par EB et SIMD.

CONFLIT D'INTERETS

Nous déclarons qu'il n'y a pas de conflit d'intérêts relatif à ce travail.

REFERENCES

- Agban A, Gbogbo KA, Hoekou YP, Atchou K, Tchacondo T, Batawila K, Souza C, Gbeassor M. 2013. Évaluation de l'activité antifongique des extraits de *Cassia alata* L. et de *Piliostigma thonningii* (Schumach.) Milne Redh. (Fabaceae) sur *Candida albicans*. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **7**(3): 1041-104, DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v7i3.12>
- Akanni OO, Owumi SE, Adaramoye OA. 2014. *In vitro* studies to assess the antioxidative, radical scavenging and arginase inhibitory potentials of extracts from *Artocarpus altilis*, *Ficus exasperata* and *Kigelia africana*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, **4**(1): S492-S499. DOI: 10.12980/APJTB.4.2014C581
- Akharalyi FC, Boboye B. 2010. Antibacterial and phytochemical evaluation of three medicinal plants. *Journal of Natural Products*, **3**: 27-34.

- Arbonnier M. 2002. *Arbres, Arbustes et Lianes des Zones Sèches d'Afrique de l'Ouest*. CIRAD-MNHN, Paris ; 576p.
- Bassène E. 2012. *Initiation à la Recherche sur les Substances Naturelles : Extraction-Analyse-Essais Biologiques*. Presse Universitaire de Dakar : Dakar ; 17 ,94-96, 140 p.
- Codoñer-Franch P, Valls-Belles 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. DOI:10.1016/j.trsl.2011.08.004
- Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon J-M. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using *DPPH*, *ABTS*, *FRAP*, *SOD*, and *ORAC* assays. *J. Agric. Food Chem.*, **57**(5), 1768-1774. DOI: 10.1021/jf803011r
- Ekoumou C. 2003. Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse Pharmacie, Bamako, 147p.
- Elgailani IEH, Ishak CY. 2014. Determination of Tannins of Three Common *Acacia* Species of Sudan. *Advances in Chemistry*, **192708**: 1-5. DOI: 10.1155/2014/192708
- Fall AD, Sy AN, Fokou JBH, Fomi JON, Dieng M, Dieng SIM, Bassene E. 2015. Phytochemical screening, polyphenol content and antioxidant studies of ethanol leaf extract of *Combretum aculeatum* Vent. *European Journal of Medicinal Plants*, **10**(3): 1-7. DOI: 10.9734/EJMP/2015/20294
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, **26**(2): 211-219.
- Morales G, Paredes A, Olivares A, Bravo J. 2014. Acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extract from *Lampyamedicinalis* in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **14**: 259: 1-12. DOI:10.1186/1472-6882-14-259.
- Pousset JL. 2006. Politiques nationales : place des médicaments traditionnels en Afrique. *Méd. Trop.*, **66**: 606-609.
- Sarr SO, Fall AD, Gueye R, Diop A, Diatta K, Diop N, NDiaye B, Diop YM. 2015. Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (*Verbenaceae*). *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **9**(3): 1263-1269. DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i3.11>
- Yemoa AL, Gbenou JD, Johnson RC, Djego JG, Zinsou C, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J, Bigot A, Portaels F. 2008. Identification et étude phytochimique de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin. *Ethnopharmacologia*, **42**: 48 - 55.