

Etude de l'effet anti-oxydant d'extraits d'inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* Mart (Arecaceae)

J. SAKANDE¹, M. SAWADOGO¹, E. PALE⁵, M. LOMPO⁴, J.B. NIKIEMA³,
E. KABRE¹, O.G. NACOUKMA², I.P. GUISSOU⁴

Résumé

Les inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* Mart (Arecaceae) sont traditionnellement utilisées au Burkina Faso pour traiter les pathologies à composante inflammatoire. Des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire d'extraits d'inflorescences mâles de cette plante capables d'entraîner une inhibition de 89 % de l'œdème induit selon la méthode de Winter. La présente étude a pour but de comprendre l'activité anti-inflammatoire en explorant l'effet anti-radicalaire de ces extraits. La mesure de l'activité anti-oxydante in vitro des extraits a été effectuée par le test au 1,1 diphényl picrylhydrazine. L'extrait dichlorométhanolique E₂F₂ et la fraction I₁ ont montré respectivement des intensités colorantes 50 % (IC₅₀) de 876 µg et 722 µg contre 24,3 pour l'acide ascorbique utilisé comme substance anti-oxydante de référence. Ces extraits ont une activité anti-oxydante environ 20 fois plus faible que celle de l'acide ascorbique. Cette faible activité anti-oxydante obtenue permet de dire que l'activité anti-inflammatoire observée n'est pas principalement liée à un mécanisme anti-radicalaire.

Mots-clés : *Borassus aethiopum* Mart (Arecaceae), anti-inflammatoire, activité anti-oxydante.

Anti-oxidant activity of *Borassus aethiopum* male inflorescences extracts

Abstract

Borassus aethiopum Mart (Arecaceae) is tropical plant widely spread in Africa. This plant is used in Burkina Faso traditional medicine for the treatment of inflammatory diseases.

The anti-inflammatory activities of dichloromethane 50% V/V extract (E₂F₂) from *Borassus aethiopum* male inflorescences and its fraction I₁ were investigated in mice according to the Winter's method of carrageenan induced paw oedema in previous studies.

Intraperitoneal administration of extracts exhibited 70-89% inhibitory of oedema after 5 hours versus 45% inhibitory of indometacin (p<0,05). This anti-radical study using 1,1 diphenyl picrylhydrazine protocol aimed to understand anti-inflammatory mechanism and showed that extracts had a low anti-oxidant activity.

Keywords: *Borassus aethiopum*, anti-inflammatory, anti-oxidant activity.

¹ Laboratoire de Biochimie UFR Sciences de la Santé – Université de Ouagadougou, 09 B.P. 863 Ouagadougou 09
Tél. (00 226) 5033 28 71 / 70 25 32 59 Email : jean_sakande@univ-ouaga.bf ou

² Laboratoire de Biochimie (LABIOCA) – UFR Sciences et Vie de la Terre Université de Ouagadougou

³ Laboratoire de Pharmacognosie – UFR Sciences de la Santé - Université de Ouagadougou

⁴ Institut de Recherche en Sciences de la Santé CNRST, Ouagadougou, Burkina Faso

⁵ Laboratoire de Chimie Organique - UFR Sciences Exactes Appliquées - Université de Ouagadougou Burkina Faso.

Introduction

Borassus aethiopum encore appelé rônier appartient à la famille des Palmae ou Arecaceae. Cette plante est bien connue en milieu traditionnel burkinabé comme ayant des propriétés antimycosiques. Ses inflorescences mâles sont pour cela utilisées pour le traitement des mycoses cutanées, des escarres, de la gale et bien d'autres affections (BLANC-PAMARD, 1980). C'est ainsi que nous avons entrepris l'étude des propriétés pharmacologiques des extraits de *Borassus aethiopum*. Des travaux antérieurs (SAKANDE, 2004a ; SAKANDE, 2004b) ont permis de mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire d'extraits d'inflorescences mâles capables d'entraîner une inhibition de 70 à 89 % de l'œdème induit selon la méthode de Winter. Le criblage phytochimique a permis de suspecter le groupe des stérols et/ou triterpènes comme responsable de cette activité anti-inflammatoire. La recherche du mécanisme d'action anti-inflammatoire a permis de montrer que ces extraits sont capables d'inhiber la cinétique de la protéine C réactive (CRP) qui est un marqueur précoce de l'inflammation (SAKANDE, 2004c). Cette étude s'inscrit dans la même veine, elle a pour but de comprendre l'activité anti-inflammatoire en explorant l'effet anti-radicalaire de ces extraits. En effet il est bien connu que les radicaux libres sont des médiateurs toxiques qui entretiennent et amplifient la réaction inflammatoire (DEVULDER, 2002).

Matériel et méthodes

Matériel

Matériel végétal

La drogue végétale est constituée des inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* récoltées dans la ville de Ouagadougou (capitale du Burkina Faso située dans la partie centrale du pays) au mois de février (intersaison) et identifiée à l'Institut national de recherche de substances naturelles (IRSS). La drogue a été séchée dans une salle ventilée à une température d'environ 37° C puis concassée et finement pulvérisée. Ce matériel végétal a servi à l'obtention des extraits.

– Produits chimiques

- DPPH (1,1 diphényl picrylhydrazine), Sigma
- acide ascorbique, Sigma
- solvants analytiques fournis par Prolabo (dichlorométhane, méthanol)
- plaques de chromatographie sur couche mince préparative de gel de silice G6F254

– Appareillage

- spectrophotomètre UV-Visible (200 à 700 nm)
- Rotavapor
- étuve
- tubes à essais
- micropipettes.

Méthodes

Obtention des extraits

Préparation de l'extrait dichlorométhanolique (E2F2)

La méthode d'extraction utilisée est la percolation avec le mélange dichlorométhane méthanol 50 % V/V. L'extrait obtenu a été évaporé sous pression réduite au Rotavapor à 50 °C puis séché à 45 °C à l'étuve jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Cet extrait sec a été conservé au frais à l'abri de la lumière jusqu'au moment des essais.

Fraction I₁

L'extrait E2F2 a été fractionné à nouveau par chromatographie sur colonne. Des fractions I, II, III obtenues et testées, la sous-fraction I est la plus active. La séparation par chromatographie sur couche mince préparative de la sous-fraction I a permis d'isoler 3 sous-fractions I₁, I₂, I₃. Le screening pharmacologique de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de Winter a permis de retenir, la plus active qui est la substance I₁.

Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique des fractions actives E₂F₂ et I₁ avait pour but de rechercher les constituants chimiques susceptibles d'être à l'origine de l'activité anti-inflammatoire. Il a été réalisé en milieu liquide par des réactions de caractérisation selon un protocole (CIULEI, 1982) validé au laboratoire de Phytochimie de l'IRSS.

Test au DPPH (1,1 diphényl picrylhydrazine)

La mesure de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits a été effectuée par le test au 1,1 diphényl picrylhydrazine (PALE, 2002 ; RATTY 1998) dont le principe est le suivant :

Principe du test DPPH

Le DPPH est un radical libre qui présente une bande d'absorption caractéristique à 517 nm liée à la forte résonance des électrons non appariés. En présence d'une substance anti-radicalaire, il y a capture des électrons non appariés de façon stœchiométrique et les produits de la réaction n'absorbent plus que vers 470 nm. Cela se traduit par une baisse de l'absorption à 517 nm liée à la décoloration de la solution de DPPH. Il est donc possible de suivre la réaction par spectrophotométrie dans le visible et de comparer l'intensité colorante 50 (IC₅₀) de la substance étudiée par rapport à celle d'un anti-oxydant connu tel que l'acide ascorbique. L'IC₅₀ peut être définie comme étant la quantité de produit nécessaire pour faire diminuer la coloration de la solution de réactif (DPPH) de moitié (50 %).

Préparation des solutions d'extraits à tester (E2F2 et I1)

Il s'agit de préparer d'abord la solution mère en faisant dissoudre 22,4 mg d'extrait dans 20 ml de méthanol. La concentration obtenue est de 1400 ppm. A partir de la solution mère l'on prépare une gamme de solutions de concentration de 0 à 200 ppm.

Tableau I. Préparation des solutions d'extraits pour le test DPPH.

Tubes	Concentration (ppm)	Solution mère (μ l)	Méthanol (μ l)
1	0	0	500
2	25	62,5	437,5
3	50	125	375
4	100	250	250
5	150	375	125
6	200	500	0

Préparation des solutions de la substance de référence : acide ascorbique

Il s'agit de préparer une solution mère en faisant dissoudre 5,6 mg d'acide ascorbique dans 20 ml de méthanol, ce qui correspond à une concentration de 354,4 ppm.

A partir de la solution mère de 354,4 ppm, a été préparée une gamme de solution de 0 à 15,4 ppm.

Tableau II. Préparation des solutions d'acide ascorbique pour le test DPPH.

Tubes	Concentration (ppm)	Solution mère (μ l)	Méthanol (μ l)
1	0	0	500
2	1,92	2,65	497,35
3	3,85	5,29	494,71
4	7,7	10,57	489,43
5	15,4	21,14	478,26

Préparation de la solution de DPPH

La préparation a consisté à dissoudre 9,85 mg de DPPH dans 25 ml de méthanol. Cette solution a été conservée à l'abri de la lumière.

Mesure spectrophotométrique

Dans chaque tube contenant 500 μ l de substances à tester, ont été introduites 3 ml de solution de DPPH. La densité optique (absorbance) a été lue au bout de 10 minutes exactement au spectrophotomètre à 517 nm contre le méthanol utilisé comme blanc.

Les densités optiques (DO) lues ont permis d'établir une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration et de déterminer la concentration correspondant à une diminution d'absorbance de 50 % (IC50). L'expérience a été conduite deux fois et chaque fois les tubes de dosages ont été dupliqués.

Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel MS Excel 2000.

Résultats

Etude de la composition chimique des extraits

Tableau III. Résultats du criblage phytochimique des extraits.

Substances	E2F2	I1	Réactions
Stérols et Triterpènes	+++	+++	Lieberman-Buchard
Flavonosides	-	-	SHIBATA
Saponosides	++	+++	Hémolyse
Alcaloïdes	-	-	Dragendorf et Mayer
Anthracénosides	-	-	Bornträger

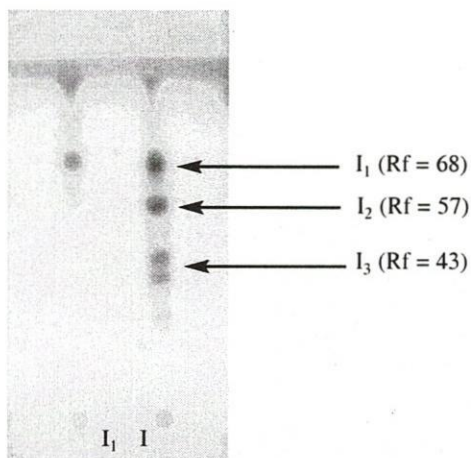


Figure 1. Chromatogramme de la fraction I après révélation avec le réactif de Liebermann-Buchard.

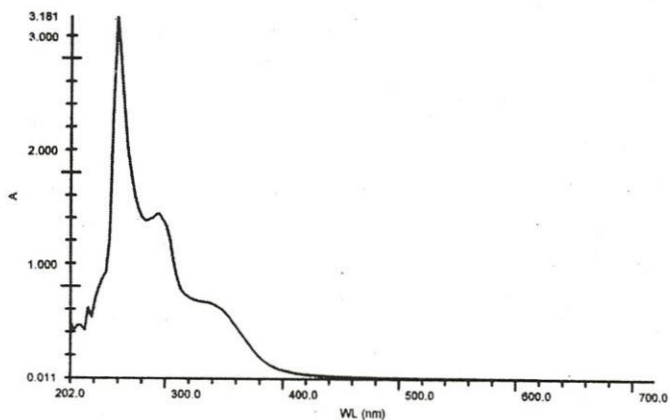


Figure 2. Spectre dans l'UV-visible de la substance I1.

Etude de l'effet anti-radicalaire

Les résultats sont représentés par les figures 3, 4, et 5.

C(ppm)	DO(nm)
0	1,068
25	1,068
50	1,057
100	1,055
150	0,995
200	0,982

DO(nm)

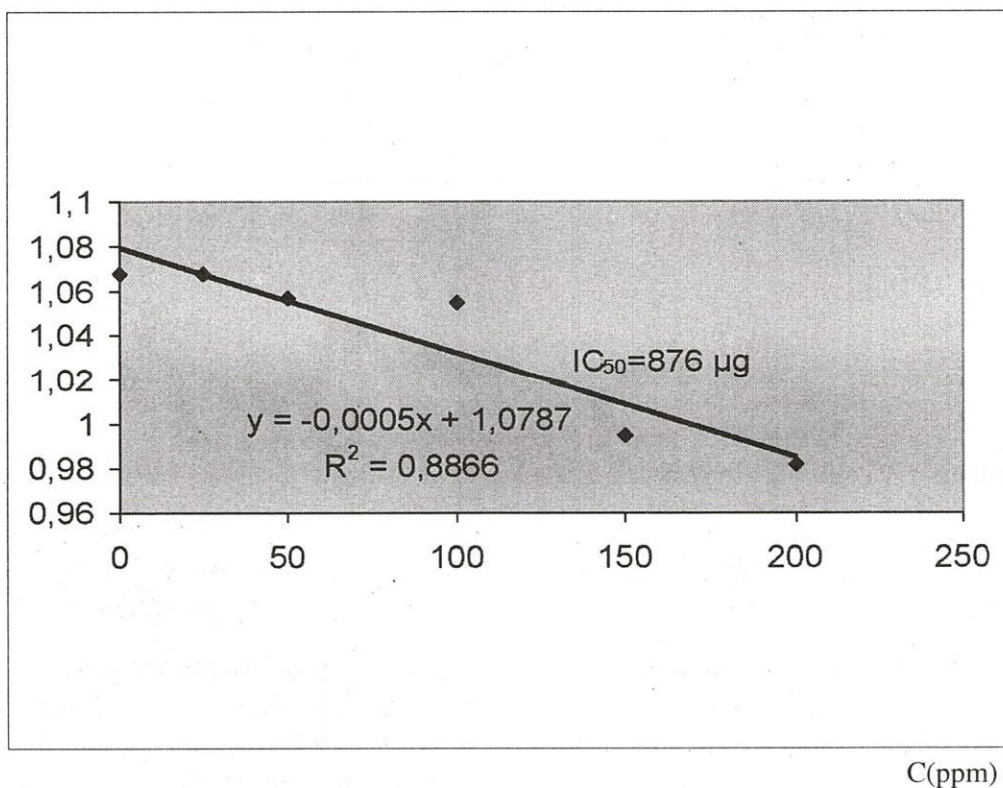


Figure 3. Activité antioxydante de l'extrait E₂F₂.

Sur la figure 3 représentant l'activité anti-oxydante de l'extrait E₂F₂, nous avons la droite de régression d'équation $y = -0,0005x + 1,0787$ et la valeur du coefficient de corrélation R^2 qui est égale à 0.8866. L'intensité colorante 50(IC₅₀) calculée est de 876 µg.

C(ppm)	DO(nm)
0	1,085
25	1,085
50	1,06
100	1,06
150	1,013
200	0,96

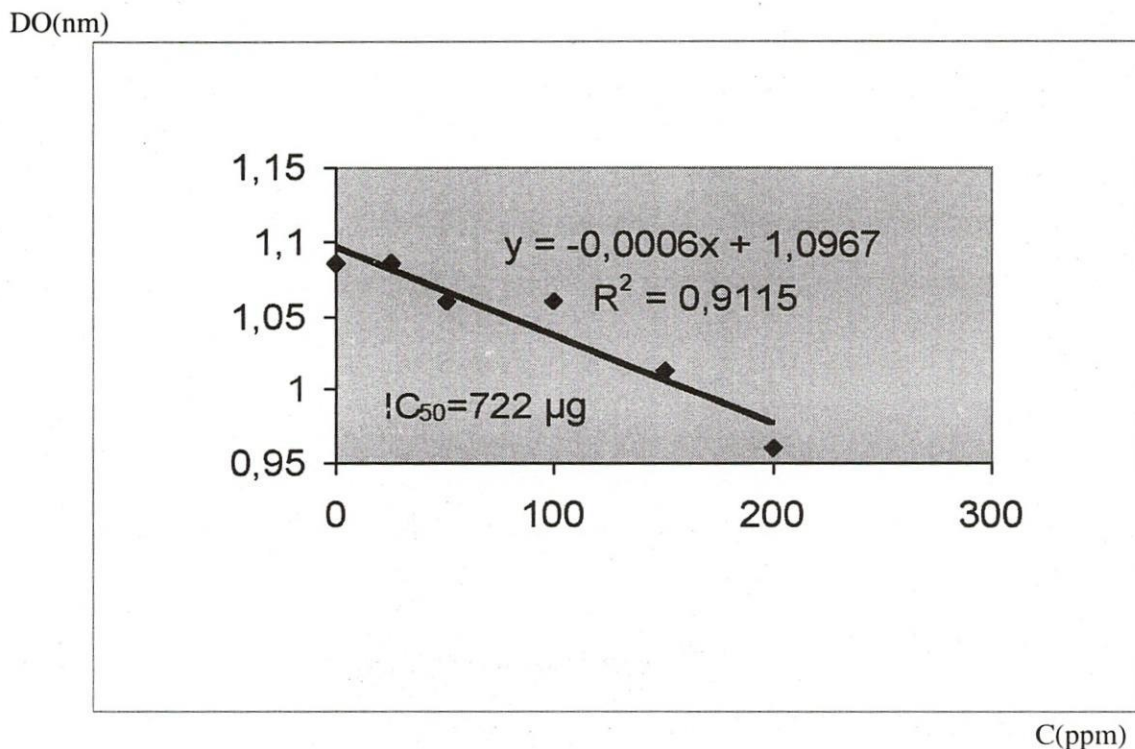


Figure 4. Activité antioxydante de la substance I₁.

Sur la figure 4 représentant l'activité anti-oxydante de I₁, nous avons la droite de régression d'équation $y = -0,0006x + 1,0967$ et la valeur du coefficient de corrélation R^2 qui est égale à 0,9115. L'intensité colorante 50(IC₅₀) calculée est de 722 µg.

C(ppm)	DO(nm)
0	1,068
1,54	0,988
3,85	0,957
7,7	0,911
11,55	0,851
12,32	0,847
15,4	0,782

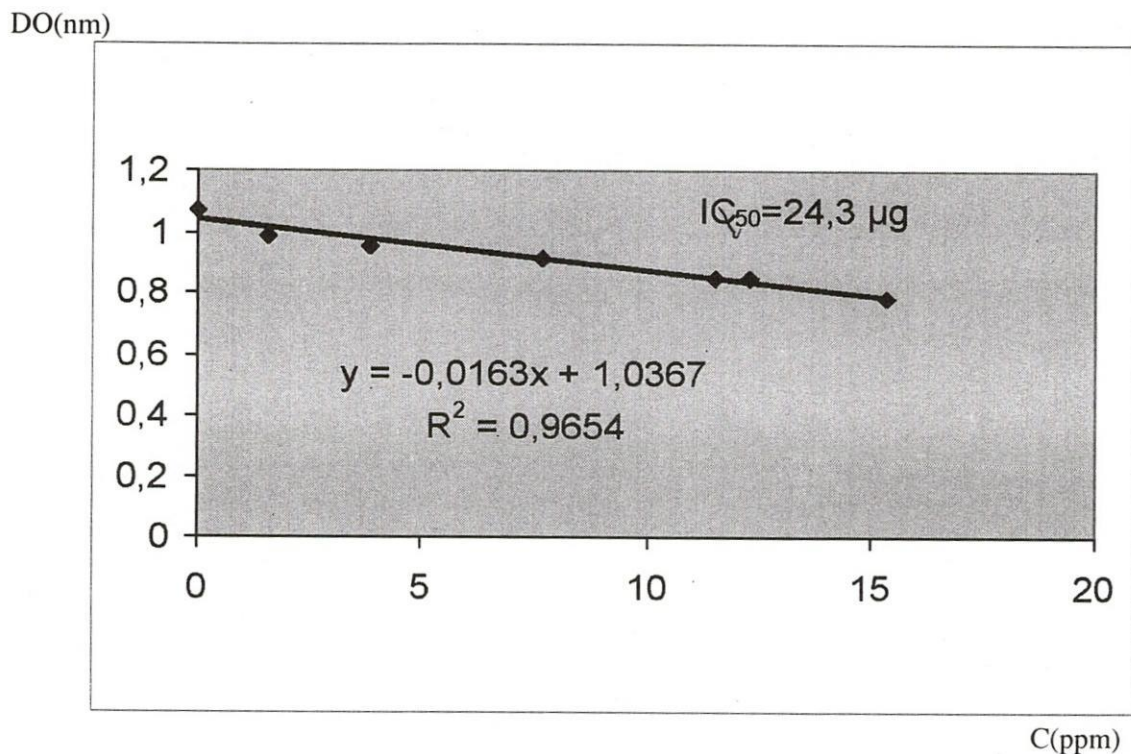


Figure 5. Activité antioxydante de l'acide ascorbique.

Sur la figure 5 représentant l'activité anti-oxydante de l'acide ascorbique, nous avons la droite de régression d'équation $y = -0,0163x + 1,0367$ et la valeur du coefficient de corrélation R^2 qui est égale à 0,9654. L'intensité colorante 50 (IC_{50}) calculée est de $24,3 \mu\text{g}$.

Discussion

Cette étude de l'activité anti-oxydante des extraits de *Borassus aethiopum* Mart. (Arecaceae) a eu pour objectif de comprendre le mécanisme d'action anti-inflammatoire desdits extraits. Pour ce faire, nous avons d'abord vérifié que la méthode qui utilise le DPPH (1,1 Diphenylpicrylhydrazine) pour mesurer l'activité anti-oxydante des extraits de plante est parfaitement reproductible. En effet nous avons obtenu une intensité colorante 50 % (IC₅₀) de 24,3 µg avec l'acide ascorbique utilisé comme référence. Cette valeur est très proche de l'IC₅₀ de 22 µg rapportée par PALE avec l'acide ascorbique (PALE, 2002). De plus l'expérience a été conduite deux fois et chaque fois les tubes de dosages ont été dupliqués, ce qui permet de valider les résultats de l'étude. Les extraits E₂F₂ et II ont montré respectivement des IC₅₀ de 876 µg et 722 µg. Ces extraits ont une activité anti-oxydante environ 20 fois plus faible que celle de l'acide ascorbique. Cette faible activité anti-oxydante obtenue permet de dire que l'activité anti-inflammatoire observée n'est pas principalement liée à un mécanisme anti-radicalaire. Toutefois, cette activité anti-radicalaire, même faible, favorise une synergie d'action anti-inflammatoire. Il est à noter que l'utilisation de totum de plante en thérapeutique présente un avantage par la synergie d'action de la multitude de molécules que renferme ce mélange. Par contre le fractionnement des extraits de plante spécialise le mécanisme d'action tout en exacerbant parfois la toxicité.

La faible activité anti-oxydante de E₂F₂ et I₁ n'est cependant pas étonnante car ces extraits ne sont pas riches en polyphénols (flavonoïdes, anthocyanosides et tanins) habituellement reconnus pour être antioxydants et anti-radicalaires (PALE, 2002 ; RATTY 1998).

Références bibliographiques

- BLANC-PAMARD C.,1980.** De l'utilisation des trois espèces de palmiers dans le sud du « V Baoulé » (Côte d'Ivoire). Cahier ORSTOM série sciences humaines vol 17, n° 3-4, 247-255.
- SAKANDE J, NACOUKMA OG, NIKIEMA JB, LOMPO M, BASSENE E, GUISSOU IP.,2004.** Etude de l'activité anti-inflammatoire d'extraits de *Borassus aethiopum* Mart (Arecaceae) Revue Méd. Pharm. Afr 18,45-51
- SAKANDE J, NACOUKMA OG, NIKIEMA JB, LOMPO M, BASSENE E, GUISSOU IP.,2004.** Etude de l'effet antipyrétique d'extraits des inflorescences mâles du rônier *Borassus aethiopum* Mart (Arecaceae) Médecine d'Afrique Noire , 51(5), 280-282
- SAKANDE J.,2004.** Etude bioguidée des propriétés pharmacologiques des extraits et fractions des inflorescences mâles de *Borassus aethiopum* Mart : approche du mécanisme biochimique d'action. Thèse Doctorat ès Sciences Biologiques Appliquées, Université de Ouagadougou, p.208
- DEVULDER B, HATRON PY, HACHULLA E.,2002.** Abrégé de Médecine interne Ed Masson ; p.200
- CIULEI I., 1982.** Methodology for analysis of vegetable drug. Pratical manuals on industrial utilisation of medicinal and aromatic plants. Edited by the ministry of chemical Industry, Bucharest 70p
- PALE E., 2002.** Etude des anthocyanes de plantes du Burkina Faso : structures et activités antioxydantes. Thèse Doctorat ès Sciences Physiques, Université de Ouagadougou. p.145
- RATTY KA, SUNAMOTO J, DAS PN.,1998.** Interaction of flavonoïdes with 1,1 diphenyl 2 picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase I Biochemical Pharmacology 37, 989.