

Evaluation des activités antiradicalaires de légume-feuilles séchés « ravitoto » et « anantsinahy » servant de produits alimentaires

Edouard Ravalison Andrianarison ; Rovantsoa Jemima Andrianarison ;
Oliva Jaconnet Andrianaivoravelona ; Rijalalaina Rakotosaona ;
Lala Andrianaivo et Philippe Antoine Andrianary

Laboratoire de Chimie organique du Département Génie Chimique de l'Ecole Supérieure Polytechnique
d'Antananarivo.

*Correspondance courriel : edoravali@yahoo.fr

Résumé

Le but de ce travail est de démontrer la valeur antioxydante des légume-feuilles consommés par les habitants des Hautes Terres de Madagascar. Les cas de feuilles de *Manihot esculenta* Crantz (famille des Euphorbiaceae) nommé communément « ravitoto » et de feuilles de *Bidens pilosa* L. (Famille des Asteraceae) dit « anantsinahy » ont retenu notre attention par leurs vertus traditionnelles à soigner de nombreuses maladies.

Les légume-feuilles séchés sont broyés puis extraits à l'éthanol et traités au charbon actif. Les familles de métabolites secondaires présents dans les extraits hydroéthanoliques sont élucidées par screening phytochimique préliminaire. Les activités antiradicalaires des deux légume-feuilles sont évaluées par la méthode au 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyle (DPPH) et leurs pouvoirs antioxydants ont été comparés à celui de l'acide ascorbique, antioxydant de référence par la valeur de concentration inhibitrice IC50. La CCM de screening phytochimique permet d'avoir des indications sur les familles chimiques des substances naturelles responsables des activités antioxydantes.

Les concentrations inhibitrices IC50 de légume-feuilles de *M. esculenta* et *Bidens pilosa* trouvées sont respectivement 1,40µg/mL et 40,43µg/mL. Le « ravitoto » possède alors une forte activité antioxydante avec sa valeur de IC50 supérieure à celle de l'acide ascorbique. Nos analyses phytochimiques ont révélé que les substances chimiques responsables d'activité antioxydante dans le « ravitoto » et l'« anantsinahy » sont principalement des flavonoïdes, des tanins hydrolysables et d'autres composés phénoliques. Ces résultats démontrent l'importance de l'intervention de ces deux légume-feuilles, sources potentielles de substances antioxydantes, dans la chaîne alimentaire de la population et leur consommation contribue à limiter le dommage oxydatif dans l'organisme humain.

Mots-clés : *Manihot esculenta*, *Bidens pilosa*, screening phytochimique, activité antiradicalaire, DPPH, méthode « bioautography ».

Abstract

The purpose of this work is to demonstrate the antioxidant value of vegetable leaves consumed by the population of the Highlands of Madagascar. Cases of *Manihot esculenta* Crantz leaves (Euphorbiaceae family) named locally "ravitoto" and leaves of *Bidens pilosa* L. (Family Asteraceae) named "anantsinahy" have retained our attention by their traditional virtues to cure many diseases. The dried leafy vegetables are ground and then extracted with ethanol and are treated with activated carbon. The families of secondary metabolites are clarified by preliminary phytochemical screening of the hydroethanolic extracts. Free radical scavenging activities of the two vegetable leaves are evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) method and their antioxidant powers are compared to that of ascorbic acid, reference antioxidant by the value of inhibitory concentration IC50. Phytochemical screening by TLC method allows on information in the chemical families of natural substances responsible of antioxidant activities. Inhibitor concentration IC50 values of vegetable leaves *M. esculenta* and *Bidens pilosa* are respectively 1,40µg/mL and 40,43µg/mL. Then, "ravitoto" has a strong antioxidant activity with its IC50 value higher than that of ascorbic acid. Our phytochemical analyzes revealed that the chemicals responsible for antioxidant activity in the "ravitoto" and "anantsinahy" are mainly flavonoids, hydrolysable tannins and other phenolic compounds. These results demonstrate the importance of the intervention of these two vegetable leaves as potential sources of

antioxydants in the food chain of Malagasy people and their consumption helps to limit the oxidative damage in the human body.

Keywords : *Manihot esculenta*, *Bidens pilosa*, phytochemical screening, free radical scavenging activity, DPPH, bioautography method.

1. INTRODUCTION

A nos jours, la consommation de légumes et de fruits, connus comme sources potentielles d'antioxydant, devient de plus en plus rare et de nombreuses maladies liées au phénomène de stress oxydant sont apparues, la santé humaine est devenue précaire. Dans cette situation, la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques EOA (espèces oxygénées actives) dans notre organisme, apportée par le changement de pratique alimentaire humaine et par la pollution de plus en plus grandissant dans notre monde (Defraigne & Pincemail, 2007). L'affaiblissement de nos défenses antioxydantes survient (déficits en vitamines, oligo-éléments) et de nombreuses maladies apparaissent par suite de dégâts cellulaires, notamment les maladies cardio-vasculaires et les maladies dégénératives comme le diabète et le cancer associées au vieillissement (Favier, 2003).

Les progrès scientifiques ont pu montrer que les produits naturels comme les légumes et les fruits peuvent constituer d'énormes sources d'antioxydants et permettant de contrecarrer les désordres pathologiques liés au stress oxydatif du corps humain.

C'est dans cette optique que nous avons choisi d'aborder l'étude des activités antioxydantes de légume-feuilles. L'évaluation qualitative par la méthode « bioautography » *in situ* au DPPH d'extraits de sept feuilles de plantes consommées comme produits alimentaires à Antananarivo a permis de focaliser notre étude sur les légume-feuilles *Manihot esculenta* et *Bidens pilosa*. De plus, cette étude permettra de démontrer que les légume-feuilles conservées sous forme séchées maintiennent leur qualité biologique antioxydante.

En réalité, de nombreux légume-feuilles sont saisonniers : cas des feuilles de *Manihot esculenta* et de *Bidens pilosa*. Ainsi, la forme de conservation adaptée à ces produits alimentaires est leur séchage. Ainsi, ce travail cerne en particulier les activités antioxydantes de légume-feuilles séchés.

Le « ravitoto » et le « anantsinahy » sont des légume-feuilles très appréciés notamment par les Antananariviens. En effet, une enquête menée en 2008 a montré que le « ravitoto » se trouve parmi les dix légume-feuilles préférentiels et consommés quotidiennement dans la ville d'Antananarivo (Rafalimanana, 2008).

En plus de leur valeur alimentaire, les traditions locales et internationales reconnaissent les feuilles de *Manihot esculenta* pour guérir les furoncles, les plaies infectes, le cancer, les diabètes, la cysticercose, les maladies cardiovasculaires et les arthrites rhumatoïdes (Descheemaeker, 1979) (Bahekar & Kale, 2013) tandis que *Bidens pilosa* sert à soigner les blessures, certaines maladies intestinales, les ulcères, le cancer et est anti-inflammatoire (Duke, 1985) (Gurib-Fakim & Gueho, 1997).

Après extraction hydroéthanolique, les extraits bruts secs de ces légume-feuilles sont analysés par screening phytochimique préliminaire pour élucider les familles chimiques de substances naturelles renfermées et susceptibles d'être responsable d'activité antioxydante. Une CCM de bioautography *in situ* au DPPH permet d'avoir le premier aperçu qualitatif de l'activité antiradicalaire des légume-feuilles. L'évaluation des activités radicalaires des extraits a été ensuite réalisée par mesure des absorptions de solutions d'extraits à différentes concentrations mélangées au DPPH.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Récolte : Les feuilles de *Manihot esculenta* et de *Bidens pilosa* étudiées dans ce travail ont été récoltées dans la Commune rurale d'Anjeva-Gare, Région d'Analamanga au mois de Septembre 2014.

2.2. Préparation des légume-feuilles séchés : Les feuilles vertes de *Manihot esculenta* et de *Bidens pilosa* sont d'abord séchées à température ambiante comprise entre 20°C et 25°C, à l'abri du

soleil puis à l'étuve maintenue entre 35°C à 40°C. Les feuilles séchées sont broyées et sassées sur tamis ASTM à des granulométries inférieures à 2 mm. Les broyats obtenus sont ensuite conservés dans des emballages étanches en plastique jusqu'à leur utilisation.

2.3. Extraction : Le broyat de légume-feuille séché est extrait par trois macérations successives de 24 heures sous forte agitation au moyen d'un agitateur magnétique dans un erlen-meyer avec un mélange éthanol/eau 90/10 (v/v). Après filtration sur Büchner, déchlorophyllation au charbon actif Fischer-Chemie et évaporation à 40°C sous pression réduite au rotavapor Buchi, l'extrait brut hydroéthanolique est recueilli puis conservé à l'ombre à 5°C au réfrigérateur.

2.4. Criblage phytochimique

a. *Alcaloïdes* : A 500 mg d'extrait hydroéthanolique sec sont ajoutés 10 mL de HCl 2N aqueux. Le mélange est ensuite porté au bain marie bouillant pendant 5 mn tout en agitant avec une baguette de verre. Après refroidissement, on y ajoute 0,5 g de NaCl. Le mélange est alors agité puis filtré sur papier Whatman. Le volume du filtrat est ensuite ramené à 10mL par addition de HCl 2N puis réparti dans quatre tubes à essai dont un servira de témoin et les trois autres sont testés respectivement par addition de 5 gouttes de réactif d'alcaloïde (Ranarivelo, 2004).

- *Test au réactif de Mayer* : la présence d'alcaloïde est indiquée par l'apparition de précipité blanc lors de l'addition de tétraiodomercurate de potassium (solution mélange de HgCl₂ et de KI) dans l'extrait acide.
- *Test au réactif de Wagner* : la présence d'alcaloïde se révèle à l'apparition de précipité rouge orangé lors de l'addition de réactif iodo-ioduré (solution mélange de I₂ et de KI) dans l'extrait analysé.
- *Test au réactif de Dragendorff* : la présence d'alcaloïde est révélée par l'apparition de précipité orange lors de l'addition de tétraiodobismuthate de potassium (solution mélange de sous-nitrate de bismuth et de KI) dans l'extrait testé.

La réalisation de ces trois tests au minimum sont nécessaires pour pouvoir affirmer la présence d'alcaloïdes dans le matériel végétal testé et éviter des réactions faussement positives (Luhata et al, 2008) (Bruneton, 1999).

b. *Flavonoïdes* : 500 mg d'extrait organique sont dissouts dans 10 mL de l'éthanol 80%. Après filtration, 1 mL de cette solution hydroéthanolique est additionné de 0,5 mL de HCl concentré et de quelques grains de tournures de magnésium. Après 10 min, l'apparition d'une coloration rouge indique la présence de flavonoïdes (Ranarivelo, 2004).

- *Détection d'anthocyanes* : A 2 mL de solution éthanolique d'extrait, on ajoute 2 mL de solution d'acide chlorhydrique à 25%. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition de solution d'ammoniaque à 25% indique la présence d'anthocyanes (Gurib-Fakim & Gueho, 1997).
- *Détection des leucoanthocyanes* : A 2 ml de solution éthanolique d'extrait sont additionnés 2 ml de HCl concentré. Le mélange est placé au bain marie bouillant pendant une vingtaine de minutes. L'apparition d'une coloration rouge démontre la présence de leucoanthocyanes (Gurib-Fakim & Gueho, 1997).

c. *Tanins et polyphénols* : La réaction de caractérisation des tanins et polyphénols est basée sur la formation de complexe colorée et de complexe insoluble en présence d'ion Fe³⁺. L'extrait organique de masse 500 mg est dissout dans 25 mL d'eau déminéralisée bouillante puis filtré sur papier Whatman. La dissolution refroidie est alors disposée dans un tube à essai puis le test de révélation est réalisé par addition de cinq gouttes du chlorure ferrique (FeCl₃) à 1% dilué dans le méthanol :

- La présence de tanins galliques et ellagiques (tanins hydrolysables) est indiquée par l'apparition d'une coloration bleue noire.

- La *présence de tanins catéchiques* (tanins condensés) s'observe par l'apparition d'une coloration brune verdâtre (Rizk, 1982).
- d. *Coumarines* : Le test de détection des coumarines est basé sur leur propriété à présenter une fluorescence nette aux rayons UV. A 500 mg d'extrait EE, on ajoute 10 mL d'eau déminéralisée. Après filtration, à 5 mL de solution aqueuse d'extrait est additionnée goutte à goutte une solution aqueuse de soude à 20 %, puis on la chauffe dans un bain marie bouillant pendant quelques minutes. Le mélange est ensuite observé sous rayonnement UV 365 nm : une fluorescence nette (jaune, vert, bleu, orange) sous UV 365nm indique la présence des coumarines (méthode indicative et non une identification) (Bruneton, 1999) (Rizk, 1982).
- e. *Triterpènes et stéroïdes* : Prendre 500mg de l'extrait hydroalcoolique dépigmenté et y ajouter 20 mL de dichlorométhane puis agiter pendant 5 à 10 min. Laisser décanter puis sécher la solution avec Na₂SO₄ anhydre. Filtrer et répartir le filtrat dans 5 tubes à essais propres et secs ; le tube n°5 servira de témoin (Ranarivelo, 2004) (Bolivar, 2011).
- *Test de Liebermann Burchard* : Dans le 1^{er} tube, additionner 4 gouttes d'anhydride acétique et 4 gouttes d'acide sulfurique concentré. La présence des composés chimiques est indiquée par la coloration observée suivante :
 - pourpre : présence de triterpènes ;
 - violet ou bleu-vert : présence de stéroïdes.
 - *Test de Salkowski* : Incliner le tube à 45° puis ajouter 1mL d'acide sulfurique concentré. Après 30mn, la présence de stérols insaturés est indiquée par l'apparition d'un anneau de séparation des phases de couleur rouge.
 - *Test de Badjet Kedde* : Additionner quelques grains d'acide picrique à la solution. L'observation d'une coloration rouge dénote la présence de stéroïdes lactoniques.
 - *Test de Keller-Killiani* : Incliner le tube de 45° et additionner quelques gouttes de FeCl₃ à 10% dans le méthanol et quelques gouttes d'acide acétique glacial. La présence d'un anneau de séparation de phase de couleur rouge pourpre indique la présence de désoxy-2-sucre.
- f. *Saponines* (test de mousse) : Une masse de 2 g de matériel végétal sec ou son équivalent en extrait brut est agitée vigoureusement pendant 30s avec 20mL d'eau distillée dans un tube à essai. Le tube est placé ensuite disposé verticalement. Après 10 mn de repos, une hauteur de la mousse persistante, supérieure ou égale à 3 cm, indique la présence de saponines (Ranarivelo, 2004).
- g. *Composés cyanogénétiques* : Dans un tube à essai, humecter 2g de matériel végétal sec avec une quantité suffisante d'eau puis ajouter 1 mL de CHCl₃. Insérer ensuite une bandelette de papier filtre Whatman imprégnée de solution fraîchement préparée de picrate de sodium (5g de Na₂CO₃ + 0,5g d'acide picrique + 100ml d'eau distillée) juste au-dessus de la drogue et plier sur le bord du tube à essai. Boucher le tube avec du coton hydrophile et chauffer à 35°C au bain marie pendant 3 heures. La présence des composés cyanogénétiques est indiqué par le virage de la coloration du papier picrossodé au rouge orangé par production de HCN (Dohou et al, 2003) (Bencharki et al, 2014).
- h. *Quinones libres* : 500 mg d'extrait sont dissous dans de l'eau distillée, puis filtrés. Le filtrat est extrait deux fois au benzène. A 10 mL d'extrait benzénique sont ajoutées 5 mL de solution aqueuse d'ammoniacale NH₄OH à 20 %, puis le mélange est agité. Après décantation, une coloration rouge orangé ou rouge violacé de la phase ammoniacale indique un test positif (Bruneton, 1999) (Dohou et al, 2003 ; Bencharki et al, 2014).

2.5. *Activité antioxydante*

La chromatographie sur couche mince par méthode « bioautography » *in situ* au DPPH permet d'avoir une approche qualitative de l'activité antiradicalaire des différents extraits de légume-feuilles étudiés. La mesure quantitative de cette activité antiradicalaire en fonction de la concentration d'extrait de légume-feuille a conduit à la détermination de la concentration inhibitrice IC50.

2.5.1. Mesure de l'activité antiradicalaire par méthode spectrométrique au DPPH

En présence d'une substance chimique antioxydante dans l'échantillon analysé, le 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH est réduit et change de couleur du violet au jaune clair. La mesure de l'absorbance A des échantillons testés sur le spectromètre UV-Visible de marque PERKIN ELMER à la longueur d'onde 517 nm permet de mesurer l'intensité de la décoloration des solutions. La concentration inhibitrice IC50 de l'extrait étudié, concentration correspondant à la réduction de 50% de l'absorbance initiale du blanc B, est alors déterminée sur le graphe représentant la courbe d'inhibition (courbe d'activité antiradicalaire en fonction de la concentration de solution d'extrait testé). L'activité antioxydante de la solution étudiée est alors comparée à celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) (Brand-Williams et al, 1995) (Singh & Kedare, 2011). Dans nos analyses, le spectromètre est initialement calibré à 0 avec le méthanol (solution étalon E).

L'évaluation de l'activité antiradicalaire des légume-feuilles a été effectuée par la méthode au DPPH de (Pajero, 2000), légèrement modifiée, décrite par (Kgatle, 2007) puis (Bidié et al, 2011). Une gamme de concentrations allant de 0 à 80 µg/mL d'extrait de matériel végétal ou d'acide ascorbique est préparée dans le méthanol. Un volume de 2,5 mL de cette solution est mélangé à 2,5 mL de solution 100 µM de DPPH préparé également dans le méthanol. Après homogénéisation, le mélange est incubé à la température ambiante (25°C) dans le noir, à l'abri de la lumière. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance de l'échantillon testé est lue à 517 nm contre celle d'un blanc qui ne contient que la solution méthanolique de DPPH.

L'activité antiradicalaire AAR (%) de l'échantillon testé correspondant au pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR (\%)} = \frac{A_0(\text{Absorbance du blanc}) - A(\text{Absorbance de l'échantillon})}{A_0(\text{Absorbance du blanc})} \times 100$$

L'absorbance du blanc A_0 correspond à l'absorbance maximale obtenue avec la solution 100µM de DPPH (40mg/L).

La concentration inhibitrice IC50 (µg/mL), concentration d'extrait de plante ou de l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, permet d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait analysé.

Les valeurs de concentration inhibitrice IC50 des extraits de légume-feuilles « ravitoto », « anantsinahy » et de l'acide ascorbique, sont déterminées par extrapolation sur les courbes de tendance « y » les plus proches des graphes d'activité antiradicalaire en fonction des concentrations d'extrait analysé ou de l'antioxydant de référence, avec un coefficient de détermination de R^2 . La valeur d'AAR, telle que $y = 50\%$, correspond à la concentration inhibitrice IC50 de l'extrait étudié (Nouioua, 2012).

2.5.2. CCM de screening phytochimique

L'identification qualitative des substances à activité antioxydante est réalisée selon la méthode « bioautography » (Gangopadhyay et al, 2015) par chromatographie sur couche mince où l'activité antioxydante est révélée au DPPH, selon (Takao et al, 1994). Cette CCM est effectuée sur plaque chromatographique à gel de silice 60F254 sur support en feuille d'aluminium 20cm x 20cm de marque Merck. Les chromatogrammes obtenus sont alors révélés par pulvérisation de solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml. Après séchage et incubation de 30 minutes à l'air libre, les taches de migration relatives aux substances à activité antioxydante apparaissent en jaune-clair sur fond violet. L'intensité de coloration des taches indique l'activité antioxydante de l'extrait et de la substance éluée.

La comparaison des taches de migration d'autres plaques, migrées dans les mêmes conditions chromatographiques, révélées avec les réactifs spécifiques permet de connaître qualitativement les

familles phytochimiques d'appartenance de métabolites secondaires responsables d'activité antioxydante (Grzelak & Choma, 2011) :

- triterpènes et stéroïdes : réactif de Liebermann Burchard,
- flavonoïdes : réactif de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$,
- coumarines : vapeur d'ammoniaque NH_3 ,
- composés phénoliques : réactif de chlorure ferrique $FeCl_3$,
- alcaloïdes : réactif de Dragendorff.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Rendement d'extraction

Les figures 1 et 2 représentent les organigrammes de préparation de broyat et d'extraction hydroéthanolique de légume-feuilles de *Manihot esculenta* et *Bidens pilosa*. La formule suivante a été adoptée pour le calcul du rendement d'extraction hydroéthanolique :

$$r = \frac{m_E}{m_0} \times 100$$

r : rendement de l'extraction de légume-feuille

m_0 : masse initiale de broyat de légume-feuille à extraire

m_E : masse de l'extrait brut éthanolique obtenu

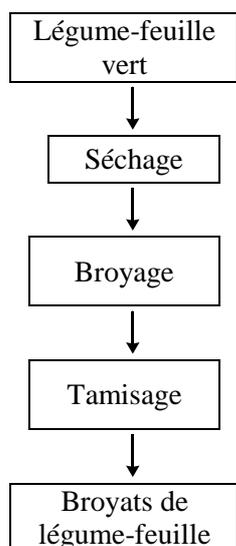


Figure 1 : Organigramme de préparation de broyat de légume-feuille

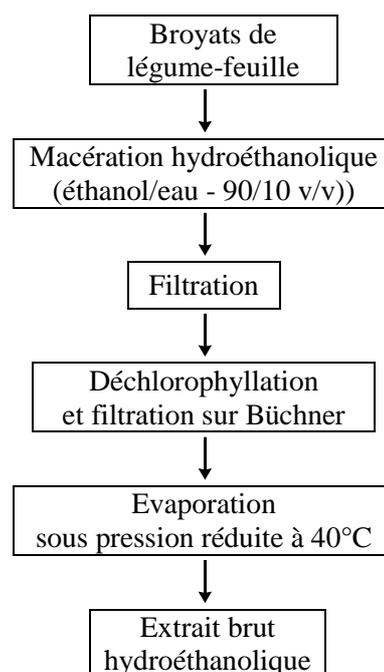


Figure 2 : Flow-sheet du processus d'extraction hydroalcoolique des légume-feuilles

Les résultats d'extraction hydroéthanolique des légume-feuilles étudiés sont récapitulés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Tableau montrant le rendement d'extraction hydroéthanolique des légume-feuilles

Légume-feuille étudié	Volume de solvant d'extraction (ml)	Masse initiale (g)	Masse de l'extrait (g)	Rendement d'extraction (%)
<i>Manihot esculenta</i>	200	10,275	4,505	43,84
<i>Bidens pilosa</i>	200	10,530	5,640	53,56

Ces rendements d'extraction hydroéthanolique des légume-feuilles étudiés respectifs de 43,84% et 53,56% démontrent que les feuilles de *Manihot esculenta* et de *Bidens pilosa* sont très riches en substances naturelles.

3.2. Criblage phytochimique

Le tableau 2 récapitule les résultats des screening phytochimiques effectués. Les notations suivantes ont été adoptées pour les appréciations de présence de substances chimiques lors des criblages phytochimiques.

Tableau 2 : Récapitulation des résultats du screening phytochimique des légume-feuilles étudiés

Substances naturelles	Légume-feuille analysé	
	<i>Manihot esculenta</i>	<i>Bidens pilosa</i>
Coumarines	+++	+++
Flavonoïdes	++	-
Anthocyanes	-	-
Leucoanthocyanes	+++	++
Tanins condensés	+++	-
Tanins hydrolysables	-	-
Composés phénoliques	++	-
Quinones	-	-
Stérols insaturés	+++	++
Stéroïdes lactoniques	++	-
Triterpènes	+	+++
Stéroïdes	+	+
Saponines	+++	-
Alcaloïdes	++	-
Composés cyanogénétiques	+++	-

Test négatif (-) ; Faible présence (+) ; Présence moyenne (++) ; Présence abondante (+++).

D'après les résultats évoqués par ce tableau, les extraits bruts éthanoliques de légume-feuilles notamment *Manihot esculenta* et de *Bidens pilosa* sont riches en famille de substances naturelles. On constate également la forte présence de triterpènes, de coumarines, des leucoanthocyanes, de stérols insaturés, des saponines et des stéroïdes lactoniques disposant d'activité biologique certaine dans la plupart d'entre eux.

Le criblage phytochimique des feuilles de *Manihot esculenta* indique la présence d'alcaloïdes possédant d'importantes activités biologiques mais aussi de substances toxiques comme les hétérosides cyanogènes.

La présence de ces métabolites secondaires dans les légume-feuilles peuvent expliquer les vertus pharmacologiques particulières de certains d'entre eux comme les vertus antifongique, anti-inflammatoire, antirhumatique, styptique de feuilles de *B. pilosa* et les activités thérapeutiques contre plusieurs maladies comme le cancer, les diabètes, les arthrites rhumatoïdes, le vieillissement des cellules, les maladies cardiovasculaires incluant l'athérosclérose de feuilles de *M. esculenta*.

Ces résultats vont permettre d'interpréter les CCM de criblage phytochimique des extraits à activité antioxydante par la méthode « bioautography ».

3.3. Activité antioxydante

Les intensités et les traînées de taches observées sur la CCM de « bioautography » préliminaire d'activité antioxydante des extraits hydroéthanoliques révélée *in situ* au DPPH, par migration réalisée

avec le système éluant de développement acétate d'éthyle/méthanol/eau 100 : 13,5 : 10 - (v/v/v). Les résultats de cette CCM récapitulés dans le tableau 3 indiquent que le légume-feuille *Manihot esculenta* possède une très bonne activité antioxydante par l'intensité d'un spot unique, par la présence d'une traînée et d'autres composés n'ayant pas migré. *Bidens pilosa* dispose aussi d'une activité antioxydante mais à un degré moindre comparé à *Manihot esculenta*.

Tableau 3 : Résultats des CCM préliminaires d'activité antioxydante par révélation au DPPH

Légume-feuille analysé	Nombre de spots jaunes	Évaluation qualitative de l'activité antioxydante
<i>Manihot esculenta</i>	1 (intense) et traînée	+++
<i>Bidens pilosa</i>	2 et traînée (faible intensité)	++

Activité moyenne (++) ; Forte activité (+++)

3.3.1. Mesure de l'activité antiradicalaire

Les résultats de mesure d'absorbance (figure 1) après incubation dans le noir pendant 30 minutes des mélanges de solution méthanolique d'extrait de légume-feuille ou d'antioxydant de référence avec la solution 100 µM de DPPH sont représentés dans des tableaux.

Le tableau 4 donne les résultats d'évaluation de l'AAR de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) tandis que les résultats de mesure de l'AAR des extraits hydroéthanoliques de légume-feuilles *Manihot esculenta* et *Bidens pilosa* sont donnés dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 4 : Mesure de l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique

solution	E	B	AA1	AA2	AA3	AA4	AA5	AA6	AA7	AA8
concentration(µg/ml)	0	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80
Absorbance A	0,000	0,625	0,377	0,331	0,307	0,266	0,201	0,136	0,056	0,016
AAR(%)	0,00	0,00	39,66	47,01	50,89	57,50	67,89	78,28	91,08	97,38

Tableau 5 : Mesure de l'activité antiradicalaire de légume-feuille *Manihot esculenta* (ravitoto)

solution	E	B	ME1	ME2	ME3	ME4	ME5	ME6	ME7	ME8
concentration(µg/ml)	0	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80
Absorbance A		0,624	0,345	0,313	0,280	0,241	0,208	0,176	0,152	0,124
AAR(%)	0,00	0,00	44,68	49,90	55,12	61,38	66,60	71,82	75,70	80,17

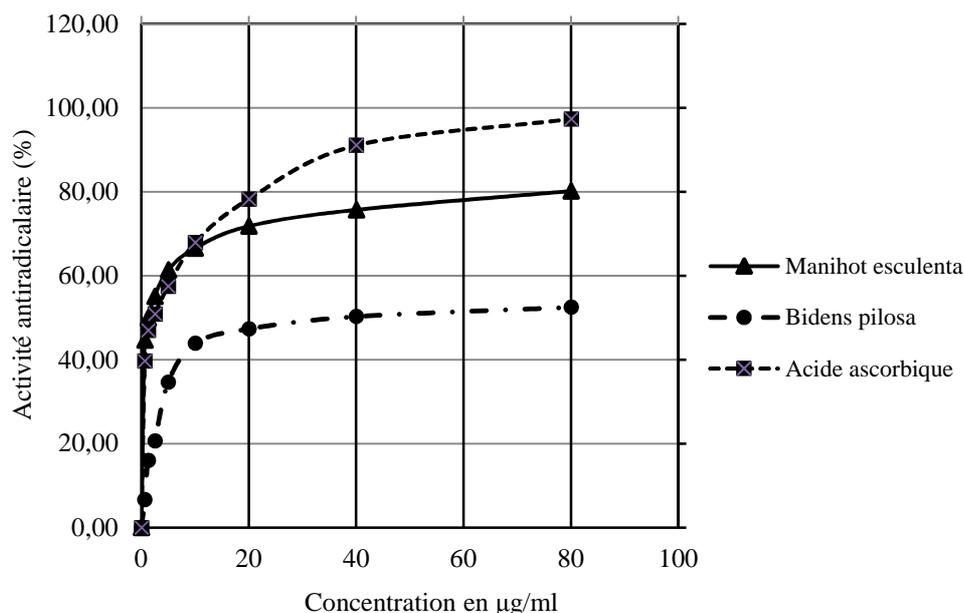


Figure 1 : Courbes d'activité antiradicalaire de légume-feuilles *Manihot esculenta* et de *Bidens pilosa*

Tableau 6 : Mesure de l'activité antiradicalaire de pelure de *Bidens pilosa* (anantsinahy)

solution	E	B	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7	BP8
concentration (µg/ml)	0	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80
Absorbance A		0,634	0,591	0,532	0,503	0,414	0,355	0,334	0,315	0,301
AAR(%)	0,00	0,00	6,71	16,02	20,68	34,65	43,97	47,37	50,30	52,52

Les graphes correspondant aux courbes d'activité antiradicalaire des extraits de légume-feuilles et de l'acide ascorbique sont tracés dans la figure 3 ci-dessus. Les courbes de tendances ont uniquement été tracées pour quatre points expérimentaux situés autour de la valeur AAR de 50%.

Le tableau 7 donne les valeurs de concentration inhibitrice IC50 des extraits et de l'acide ascorbique, trouvées après extrapolation sur les courbes de tendance « y » des graphes d'activité antiradicalaire en fonction des concentrations d'extrait analysé. En effet, pour la valeur y = 50% d'AAR, on déduit la valeur « x » relative à la concentration IC50 de l'extrait correspondant.

Tableau 7 : Valeurs estimées des concentrations inhibitrices IC50 de légume-feuilles

	Equation de la courbe de tendance adoptée	Concentration IC50 (µg/ml)	Coefficient de détermination R ²
Acide ascorbique	$y = 8,281 \cdot \ln(x) + 44,047$	2,05	0,987
<i>Manihot esculenta</i>	$y = -0,732x^2 + 7,828x + 40,50$	1,40	0,994
<i>Bidens pilosa</i>	$y = 4,122 \cdot \ln(x) + 34,75$	40,43	0,991

D'après ces résultats, le légume-feuille *Manihot esculenta* possède une très significative concentration inhibitrice IC50 de 1,40µg/mL, meilleure que celle de l'acide ascorbique, antioxydant de référence dont l'IC50 est de 2,05µg/mL dans les mêmes conditions expérimentales. Ces résultats confortent les résultats d'analyse par « bioautography » au DPPH résumé au tableau 3, montrant alors que le légume-feuille *Manihot esculenta* renferme d'importantes substances naturelles à activité antioxydante. Le légume-feuille *Bidens pilosa* avec sa concentration IC50 de 40,43µg/mL, manifeste également une activité antiradicalaire mais à un degré plus faible comparée à celle de l'acide ascorbique.

En particulier, ces résultats confirment les utilisations traditionnelles pour guérir certains types de cancer, le diabète, les plaies infectées et les maladies cardiovasculaires de *Manihot esculenta* puis de *Bidens pilosa*.

3.3.2. CCM de screening phytochimique

Le screening phytochimique des substances à activité antioxydante a été réalisé par CCM de « bioautography » *in situ* au DPPH. Les taches de migration de chromatoplaques révélées au DPPH sont comparées avec les taches migration de chromatoplaques pulvérisées de différents réactifs spécifiques d'identification indiqués au sous-paragraphe 2.5.2 après élution au système de solvant toluène/acétate d'éthyle/méthanol - 2:6:2 (v/v/v).

Les résultats de ce screening phytochimique de « bioautography » confrontés aux résultats de screening phytochimique préliminaire du sous-paragraphe 3.2 résumés par le tableau 3 permettent d'avancer que les substances naturelles responsables d'activité antioxydante de légume-feuille de *Manihot esculenta* sont des flavonoïdes, des tanins hydrolysables et d'autres composés phénoliques. Ces substances sont dotées de propriété antioxydante en bloquant la formation de radicaux libres EAO ou par chélation des métaux lourds toxiques à l'organisme humain (Fiorrucchi, 2006) (Benbrinis, 2012). Les composés phénoliques à fort pouvoir antioxydant, comme les flavonoïdes, les polyphénols, les tanins condensés ou hydrolysables, retardent l'apparition de maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète et les maladies dégénératives associées au vieillissement (Imam, 2011) (Streit, 2014).

Ainsi, selon nos résultats, les fortes activités antioxydantes des deux plantes, notamment le légume-feuille *Manihot esculenta* ou « ravitoto » expliquent leurs usages thérapeutiques traditionnels pour guérir de nombreuses maladies chroniques et justifie les études d'activité antioxydante menées à leur propos. Cependant, ce sont des légume-feuilles saisonniers alors des méthodes de conservation s'imposent de manière à en disposer en permanence pendant toute l'année. Nos résultats ont pu démontrer que les légume-feuilles séchés entre 35°C et 40°C maintiennent leurs propriétés biologiques antioxydantes. La forme de légume-feuilles séchés, emballés dans des emballages étanches maintenus à l'abri de la lumière, s'impose pour leur conservation : condition permettant de les protéger contre l'oxydation atmosphérique et contre la lumière provoquant des réactions photochimiques nocives. Sous forme de produit médicinal, il est possible d'utiliser la forme d'extrait hydroéthanolique.

4. CONCLUSION

Madagascar dispose d'une forte production en manioc puisque sa culture se fait dans toutes les localités paysannes de Madagascar. Cependant, à part la valorisation nourricière de ses feuilles et de ses racines, ses vertus médicinales antioxydantes restent encore mal exploitées d'où les raisons qui ont motivées leurs études phytochimiques et activités antioxydantes. Les feuilles *Manihot esculenta* et de *Bidens pilosa* renferment des substances antioxydantes. Toutefois, de manière à confirmer les résultats obtenus dans ce travail et à déterminer leurs vrais vertus pharmacologiques, d'autres études sur les activités biologiques de ces deux légume-feuilles doivent être menées. Par ailleurs, l'identification des substances réellement responsables des activités antioxydantes des deux légume-feuilles nécessite des fractionnements de leurs extraits et d'en isoler les composés actifs.

La cuisine traditionnelle actuelle étant dominée par la consommation de légume-feuilles, alors les résultats acquis dans ce travail expliquent en partie pourquoi les anciens d'antan possédaient une espérance de vie plus élevée par rapport aux gens d'aujourd'hui trop accrochés aux produits alimentaires industriels. Les résultats acquis dans ce travail nous incitent en effet à revenir vers la consommation de produits naturels afin de sauvegarder notre état de santé.

BIBLIOGRAPHIE

Bahekar, S., Kale R., 2013. Phytopharmacological aspects of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) - a review. *Mintage Journal of Pharmaceutical & Medicinal Sciences*. Février, Vol. 2, 1, pp. 4-5.

Benbrinis, S. 2012. Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biochimie, Option: Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas-Setif.

Bencharki, B., Alilou H., Hassani L. M. I., Barka N., 2014. Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*, Afrique SCIENCE 10(3) 316 - 328.

Bidié, A. P., N'Guessan B. B., Yapo A. F., N'Guessan J. D., Djaman A. J., 2011. Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne, Sciences & Nature Vol. 8 N°1 : 1 - 11.

Bolivar, P., Cruz-Parades C., Hernandez L. R., Juarez Z. N., Sanchez-Arreola E., Av-Gay Y., Bach H., 2011. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*, Journal of Ethnopharmacology, 137, 141– 147, published by Elsevier Ireland Ltd.

Brand-Williams, W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 28.25-30.

Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120p.

Defraigne, J. O., Pincemail J., 2007. Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités, Rev Med Liege ; 62 : 4.

Descheemaeker, A. 1979. Ravimaitso, 5ème édition.

Dohou, N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N., 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelya lythroides*, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 142, 61-78.

Duke, J. A., Ayensu E. S., 1985. Medicinal plants of China Reference Publications.

Favier, A., 2003. Mécanismes biochimiques, Le stress oxydant, revue L'actualité chimique - Novembre-Décembre, p.107-115.

Fiorrucchi, S., 2006. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse, Université de Nice-sophia Antipolis.

Gangopadhyay, M., Dewanjee S., Bhattacharya N., Khanra R., Dua T. K., 2015. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry, Journal of Pharmaceutical Analysis ;5(2):75–84.

Grzelak, E. M., Choma I. M., 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography, J. Chromatogr. A, doi:10.1016/j.chroma.2010.12.069.

Gurib-Fakim, A., Gueho J., 1997. Inventaire et étude des plantes médicinales et des plantes aromatiques des Etats de l'océan Indien, Rapport ethnobotanique et phytochimique sur le projet PLARM.

Imam, M. Z., Akter S., Mazumder Md. E. H., Rana Md. S., 2011. Antioxidant activities of different parts of *Musa sapientum* L. ssp. *sylvestris* fruit, Journal of Applied Pharmaceutical Science 01 (10) ; 68-72.

Kgatle, D. T., 2007. Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Combretum apiculatum* (Sond.) subsp *apiculatum*, Departement of Paraclinical Sciences (Phytochemical Program), University of Pretoria, Octobre.

Luhata, P., Kanangila A. B., Kitawa E. K., Mulungulungu D., Lumbu J. B., Kalonda E., 2008. Étude chimique de l'espèce *Jacobinia carnea*, Université de Lubumbashi.

Nouioua, W., 2012. Thème Biodiversité et Ressources phytogénétiques d'un écosystème forestier « *Paeonia mascula* (L.) Mill. ». Mémoire présenté à la Faculté des Sciences de la nature et la vie

Département de Biologie végétale et d'Écologie Pour l'obtention du diplôme de MAGISTER Option : Biodiversité et gestion des écosystèmes.

Pajero, I., Codina C., Pekatris C., Kefalas P., 2000. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay, *Pharmacol Toxicol Method*, 44 : 507-512.

Rafalimanana, H. R., 2008. Le cresson à Antananarivo - Qualités sanitaire des échantillons prélevés dans les sites de production, Mémoire de DEA en Biochimie, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée. [éd.] Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences.

Ranarivelo, Y., 2004. Les Grandes familles Chimiques de Produits Naturels, Cours en ligne, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Rizk, A. M., 1982. Constituants of plants growing in Qatar, *Fitoterapia*, 52 (2), p 35-42.

Singh, R. P., Kedare S. B., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *J Food Sci Technol* (July–August) 48(4):412–422.

Streit, M., 2014. Verrues – tableaux cliniques et traitement, Partie 2, *Forum Med Suisse*;14(36):659–669.

Takao, T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K., 1994. A simple screening method for antioxidant and isolation of several antioxidants produced by marin bacteria from fish and shellfish, *Biosc Biotechnol Biochem*, 58 : 1780-1783.

Annexe: Photographies de matériels pour la mesure de l'activité antioxydante

	
<p>Photo de l'évaporateur rotatif BÜCHI avec pompe à vide VACUUBRAND MD 4C CE01</p>	<p>Photo du Spectromètre UV/VIS Lambda 10 PERKIN ELMER</p>



Photo de l'étuve de séchage EU115 S PROLABO