

Screening phytochimique et activité antioxydante de fruits de « rotra » ou *Eugenia jambolana* Lam. consommés par les habitants des Hautes Terres de Madagascar

Edouard Ravalison Andrianarison* ; Oliva Jaconnet Andrianaivoravelona ;
Rijalalaina Rakotosaona ; Navalona Andrianina Ranaivoson ;
Rovantsoa Jemima Andrianarison, Lala Andrianaivo et Philippe Antoine Andrianary.

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

*Correspondance courriel : edoravali@yahoo.fr

Résumé

Le but du présent travail est particulièrement de mettre en évidence l'activité radicalaire de fruit mûr de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae), appelé localement « rotra », fruit saisonnier consommé par les habitants des Hautes Terres de Madagascar.

Ce travail consiste premièrement à faire le screening phytochimique préliminaire des extraits hydroéthanoliques afin de connaître les familles chimiques de métabolites secondaires contenus dans ce fruit. En second lieu, les activités antiradicalaires de la pulpe et des graines parties de ce fruit ont été évaluées selon la méthode au 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyle (DPPH) et leurs capacités antioxydantes ont été comparées à celle de l'acide ascorbique, antioxydant de référence par la valeur de concentration inhibitrice IC50. Les familles chimiques des substances responsables des activités antioxydantes sont finalement déterminées par la méthode « bioautography ».

Le fruit de *Eugenia jambolana* Lam. a montré de très intéressantes activités antioxydantes avec les valeurs IC50 de 1,23 µg/mL pour sa graine, valeur inférieure à 2,05 µg/mL, IC50 trouvée de l'acide ascorbique, et de 9,00 µg/mL pour sa pulpe. Ces résultats démontrent que la pulpe et la graine *E. jambolana* sont des sources potentielles de substances antioxydantes et leur consommation contribue à limiter le dommage oxydatif dans l'organisme humain. Nos analyses phytochimiques ont révélé que les substances chimiques responsables d'activité antioxydante dans la pulpe et les graines de *E. jambolana* sont principalement des flavonoïdes et d'autres composés phénoliques.

Mots-clés : *Eugenia jambolana*, screening phytochimique, activité antiradicalaire, DPPH, CCM, méthode « bioautography »

Abstract

The purpose of the present work is particularly to highlight the free radical scavenging activity of ripe fruit of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae), locally called "rotra", seasonal fruit consumed by people in Highlands of Madagascar.

This work is in first to make the preliminary phytochemical screening of the hydroethanolic extracts in order to know the chemical families of secondary metabolites contained in this fruit. In the second place, the free radical scavenging activity of pulp and seeds of this fruit were evaluated according to the method in 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyle (DPPH) and their antioxidant capacity have been compared to that of the ascorbic acid, antioxidant reference by the value of inhibitory concentration IC50. The chemical families of substances responsible for antioxidant activities are finally determined by the bioautography method.

The fruit of *Eugenia jambolana* Lam. has shown very interesting antioxidant activities with IC50 value of 1.23 µg/mL for its seed less than IC50 value of ascorbic acid (2.05 µg/mL), and 9.00 µg/mL for its pulp. These results exhibit that the pulp and the seed *E. jambolana* are potential sources of antioxidant substances and their consumption contribute to limit the oxidative damage in the human body. The phytochemical analysis has indicated that the chemicals responsible for antioxidant activity in pulp and seeds of *E. jambolana* are mainly flavonoids and other phenolic compounds.

Keywords: *Eugenia jambolana*, phytochemical screening, free radical scavenging activity, antioxidant activity, DPPH, TLC, bioautography method.

1. INTRODUCTION

Depuis quelques temps, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par le concept de stress oxydatif. Il s'agit d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de

radicaux oxygénés toxiques qui implique de nombreuses maladies humaines (Defraigne, 2007). En réalité, en condition physiologique, le dioxygène O₂, molécule indispensable à la vie, produit en permanence des espèces réactives de l'oxygène ERO (angl. ROS ou Reactive Oxygenated Species) au niveau de la mitochondrie (Barouki, 2006). Par ailleurs, les ERO proviennent de la pollution de l'environnement humain. Ces ERO, dont font partie les radicaux libres oxygénés, sont particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire (Favier, 2003) (Roussel, 2002). En effet, elles sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques comme les lipides, protéines, ADN, glucose et autres. En conséquence, les maladies dégénératives associées à ce phénomène de stress oxydatif deviennent de plus en plus nombreuses.

L'objectif de ce travail est alors de démontrer que les produits naturels comme les fruits, les légumes ou les plantes apportent des substances antioxydantes ayant la capacité de piéger ces radicaux libres très réactifs, permettent le contrôle du niveau des ERO et minimisent le dommage oxydatif présent dans l'organisme humain par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production de ERO, et par fixation des métaux de transition toxiques à l'organisme humain (Fiorrucchi, 2006) (Benbrinis, 2012).

L'adage local disant « *Ataovy toy ny voankazo an'ala ka ny mamy atelema fa ny mangidy ario* », en traduction libre, considérer les faits comme des fruits sauvages mûrs, mangez ceux qui sont doux tandis que rejetez les amers, démontre que la société malgache consommait des fruits depuis les temps anciens et savaient différencier ce qui était bon à manger de ce qui était bon à rejeter.

Le « rotra » (Figure 1), fruit étudié dans ce travail est essentiellement comestible et consommé par les gens des Hautes Terres de Madagascar comme Antananarivo, fruit de *E. jambolana* de la famille des Myrtaceae, plante d'origine Indo-Malaisienne (Morton, 1987) et naturalisée à Madagascar. C'est un fruit saisonnier principalement rencontré dans les régions des Hauts Plateaux de Madagascar vers les mois d'Avril et Mai de l'année.



Figure 1 : Photo de fruits de *Eugenia jambolana* Lam. (Source : cadenahortofruticola.org)

Le « rotra » est un fruit très apprécié localement par ses effets stomachiques, agissant contre la dysenterie et apaisant la colique et les diarrhées aiguës (Rasamimanana, 2009) (Tanala, 2015). De plus, la pulpe et la graine de *E. jambolana* sont traditionnellement reconnues pour leur vertu antidiabétique (Ratsimamanga, 1998) (Sridhar et al, 2005).

La qualité biologique d'un fruit peut se mesurer par son pouvoir antioxydant lié aux substances bioactives naturelles. La mesure de l'activité antiradicalaire permet, par détermination graphique, d'évaluer la capacité antioxydante de parties étudiées de ce fruit signifiée par leur concentration inhibitrice IC₅₀ (en µg/mL) réduisant à 50% la concentration de la solution méthanolique de DPPH (2,2-diphénylpicryl-1-hydrazyle) servant à l'analyse. La famille chimique des métabolites secondaires responsables d'activité antiradicalaire est ensuite identifiée par la méthode « bioautography » au DPPH.

L'objectif principal de ce travail est de démontrer les intérêts portés à la consommation de fruits, produits naturels apportant des substances antioxydantes dans l'organisme humain afin de limiter les dommages causés par le stress oxydatif et d'éviter l'apparition précoce de diverses maladies notamment les maladies cardio-vasculaires, les maladies dégénératives comme le cancer, le diabète et les maladies associées au processus de vieillissement de l'organisme humain comme l'alzheimer et la maladie de Parkinson.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Cueillette : Les fruits de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) ayant servi à nos études ont été achetés au marché de Mahamasina Antananarivo au mois d'Avril 2015 et triés afin d'éliminer ceux non mûrs ou pourris.

2.2. Extraction: La pulpe et graine des fruits *E. jambolana* sont d'abord enlevées, séparées, découpées et séchées à l'ombre pendant 7 jours puis à l'étuve aérée maintenue entre 40 à 45°C durant 24 heures de manière à réduire au maximum le taux d'humidité. Elles subissent ensuite le hachage avec un broyeur à couteau puis sassées sur tamis ASTM à des granulométries inférieures à 2 mm. Les broyats obtenus sont ensuite conservés à l'abri de la lumière dans des emballages étanches en plastique jusqu'à leur utilisation. Le matériel végétal haché et sec de masse bien définie a été extrait par trois macérations successives de 48 heures au mélange hydroéthanolique éthanol/eau 90/10 (v/v) dans un erlen-meyer et sous agitation magnétique continue. Après filtration sur Büchner, l'évaporation sous pression réduite au rotavapor de marque Buchi permet de recueillir l'extrait brut éthanolique sec EE. Ce dernier subit les étapes d'extraction en cascade par partage liquide-liquide avec l'eau et trois solvants organiques à polarité croissante : hexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle. Les extraits organiques obtenus sont soumis à la dessiccation au sulfate de sodium anhydre puis l'évaporation de solvant conduit aux résidus secs successifs à l'hexane EEH, au dichlorométhane EED et à l'acétate d'éthyle EEA conservés à 5°C dans des flacons de couleur sombre, au réfrigérateur à l'abri de la lumière.

2.3. Screening phytochimique

2.3.1. 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 500mg 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 l'un servira de témoin et les trois autres sont testés respectivement par addition de 5 gouttes de réactif d'alcaloïde (Ranarivelo, 2004). La réalisation de trois tests au minimum est nécessaire pour pouvoir affirmer la présence d'alcaloïdes dans le matériel végétal testé et éviter des réactions faussement positives (Bruneton, 1999) (Luhata, 2008).

- *Test au réactif de Mayer :* la présence d'alcaloïde est indiquée par l'apparition de flocon 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.

2.3.2. Flavonoïdes : 200 mg d'extrait organique sont dissouts dans 10 mL d'éthanol à 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).

2.3.3. 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, 1997).

2.3.4. 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, 1997).

2.3.5. Tanins et autres composés phénoliques : L'extrait organique de masse 100mg est dissout dans 25mL d'eau distillée bouillante puis additionné de quatre gouttes de solution aqueuse de NaCl à 10%. La solution ainsi obtenue est filtrée sur papier Whatman. Le filtrat refroidi est alors réparti dans quatre tubes à essai, le 4^{ème} tube servant de témoin (Ranarivelo, 2004) (Rizk, 1982).

- Tube n°1: addition de cinq gouttes de gélatine à 1%. L'apparition d'un précipité éventuel indique la présence de polyphénols.
- Tube n°2: addition de cinq gouttes de gélatine salée (mélange volume à volume de gélatine à 1% et de solution NaCl à 10%). L'apparition d'une précipitation par la gélatine salée signifie la présence de tanins.
- Tube n°3: addition de cinq gouttes de FeCl₃ dilué à 1% 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 catéchiqes* (tanins condensés) s'observe par l'apparition d'une coloration brune verdâtre.
 - Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleue noire avec FeCl₃, est due à la présence d'autres types de composés phénoliques.

2.3.6. Coumarines : Le test de détection des coumarines est basé sur leur propriété à présenter une fluorescence nette aux rayons UV. A 200 mg d'extrait EE, on ajoute 10 mL d'eau distillée. Après dissolution et filtration, à 5 mL du filtrat est additionnée goutte à goutte une solution aqueuse de soude à 20 %, puis on la chauffe au 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) (Rizk, 1982) (Bruneton, 1999).

2.3.7. Triterpènes et stéroïdes : Prendre 500mg de l'extrait hydroalcoolique dépigmenté ou d'extrait organique 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 :
 - a) pourpre : présence de triterpènes ;
 - b) 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 stéroïls 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-sucres.

- 2.3.8. Quinones :** 200 mg d'extrait organique 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'ammoniaque NH_4OH à 20 %, puis le mélange est agité. Après décantation, une coloration rouge orangée ou rouge violacée de la phase ammoniacale indique un test positif (Bruneton, 1999) (Dohou, 2003) (Alilou, 2014).
- 2.3.9. Saponines (test de mousse) :** Une masse de 2 g de matériel végétal sec ou son équivalent en extrait brut est agitée vigoureusement pendant 30 secondes avec 20 mL d'eau distillée dans un tube à essai. Le tube est 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).
- 2.3.10. Composés cyanogénétiques :** Dans un tube à essai, humecter 2g de matériel végétal sec avec une quantité suffisante d'eau puis ajouter 1 mL de CHCl_3 . Insérer ensuite une bandelette de papier filtre Whatman imprégnée de solution fraîchement préparée de picrate de sodium (5g de Na_2CO_3 + 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, 2003) (Alilou, 2014).

2.4. Activité antioxydante

Une analyse par chromatographie sur couche mince préliminaire révélée au DPPH permet d'avoir une approche qualitative sur l'activité antioxydante des différents extraits de fruits étudiés. La méthode quantitative par mesure de l'activité antiradicalaire permettra de déduire la concentration inhibitrice IC_{50} de ces extraits.

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

Le 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH est un radical libre qui présente une bande d'absorption caractéristique à 517 nm liée à la résonance des électrons non appariés. En présence d'une substance chimique antioxydante dans l'échantillon analysé, le 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 IC_{50} 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 ensuite comparée à celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) (Brand-Williams, 1995) (Singh, 2011). Le spectromètre est initialement calibré à 0 avec le méthanol comme solution étalon E.

La méthode au DPPH de PAJERO et al. (Codina, 2000), légèrement modifiée, décrite par (Kgatle, 2007) puis (Bidié, 2011), a été adoptée pour mesurer l'activité antiradicalaire de l'extrait testé. Une gamme de concentrations allant de 0 à 80 $\mu\text{g/mL}$ 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) 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 obtenu avec la solution 100 μM de DPPH (40mg/L).

La concentration inhibitrice IC50 ($\mu\text{g/ml}$), 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 *E. jambolana* 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).

2.4.2. Méthode « bioautography »

L'identification qualitative *in situ* des substances à activité antioxydante est réalisée selon la méthode « bioautography » (Gangopadhyay, 2015) par chromatographie sur couche mince où l'activité antioxydante est révélée au DPPH, selon (Takao, 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 élue.

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, 2011) :

- ✓ terpénoïdes 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.

L'élution a été menée avec le système éluant de développement toluène/acétate d'éthyle/méthanol (2:6:2) (v/v/v).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Rendement d'extraction

Les résultats d'extraction des parties étudiées des fruits concernés sont récapitulés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Tableau montrant le rendement des extractions méthanoliques

Partie du fruit étudiée	Volume de solvant d'extraction (ml)	Masse initiale (g)	Masse de l'extrait (g)	Rendement d'extraction (%)
<i>E. jambolana</i> (pulpe)	200	10,210	6,729	65,91
<i>E. jambolana</i> (graine)	200	10,576	2,198	20,78

La pulpe de fruit « rotra » a montré un rendement d'extraction élevé. Ce fait est probablement dû à la présence majoritaire de substances osidiques.

3.2. Criblage phytochimique

Le tableau 2 récapitule les résultats des screening phytochimiques effectuées. Les notations suivantes ont été adoptées pour les appréciations de présence de substances chimiques lors des criblages phytochimiques : Test négatif (-) ; Faible présence (+) ; Présence moyenne (++) ; Présence abondante (+++).

Tableau 2 : Récapitulation des résultats du screening phytochimique de fruits de *E. jambolana*

	Pulpe de <i>E. jambolana</i>	Graine de <i>E. jambolana</i>
Coumarines	+++	-
Flavonoïdes	+++	++
Anthocyanes	-	-
Leucoanthocyanes	+++	+++
Quinones	-	+
Tanins condensés	+	-
Tanins hydrolysables	-	+++
Polyphénols	-	+++
Stérols insaturés	++	+++
Stéroïdes lactoniques	+	+++
Triterpénoïdes	-	-
Stéroïdes	+	+
Iridoïdes	+	-
Saponines	-	-
Cardénolides	-	+++
Hétérosides désoxy- 2-sucres	+++	-
Alcaloïdes	-	+
Hétérosides cyanogènes	-	-

Note : *E. jambolana* pulpe (EJP) - *E. jambolana* : graine (EJG)

Les résultats évoqués dans ce tableau démontrent, la richesse en substances chimiques naturelles des extraits bruts hydroéthanoliques de pulpe et graine de *E. jambolana* : leucoanthocyanes, stérols insaturés et stéroïdes, triterpénoïdes, coumarines, de flavonoïdes, de tanins et cardénolides disposant d'activité biologique certaine.

La richesse en métabolites secondaires dans ces parties étudiées de fruits montre leurs intérêts pharmacologiques. Ces résultats vont permettre d'interpréter par la suite les CCM de criblage phytochimique des extraits à activité antioxydante par la méthode « bioautography ».

3.3. Activité antioxydante

Les intensités et nombres de taches observées sur la CCM de « bioautography » préliminaire d'activité antioxydante de pulpe et graine de *E. jambolana* révélée au DPPH, avec le système éluant de développement formé du mélange toluène/acétate d'éthyle/méthanol (2:6:2) (v/v/v), permettent d'émettre selon le tableau 3 que la pulpe et la graine de *E. jambolana* dispose d'une forte présence de substances naturelles à activité antioxydante.

Tableau 3 : Résultats des CCM préliminaires d'activité antioxydante *in situ* au DPPH de *E. jambolana*

Partie du fruit	Nombre de spots jaunes	Activité antioxydante
Pulpe	3 et trainée	++
Graine	Trainée intense	+++

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

3.3.1. Mesure de l'activité antiradicalaire

Les résultats de mesure d'absorbance après incubation de 30 minutes des mélanges de solution méthanolique d'extrait de matériel végétal 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 de pulpe et graine de *E. jambolana* sont indiqués dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 4 : Mesure de l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique en fonction de la concentration

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 pulpe de *E. jambolana* en fonction de la concentration

Solution	E	B	EJP1	EJP2	EJP3	EJP4	EJP5	EJP6	EJP7	EJP8
Concentration(µg/ml)	0	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80
Absorbance A		0,631	0,392	0,372	0,352	0,331	0,311	0,295	0,273	0,250
AAR(%)	0,00	0,00	37,83	41,05	44,28	47,50	50,73	53,29	56,67	60,32

Tableau 6 : Mesure de l'activité antiradicalaire de graine de *E. jambolana* en fonction de la concentration

Solution	E	B	EJG1	EJG2	EJG3	EJG4	EJG5	EJG6	EJG7	EJG8
Concentration (µg/ml)	0	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80
Absorbance A		0,633	0,438	0,322	0,136	0,089	0,059	0,048	0,028	0,027
AAR(%)	0,00	0,00	30,78	49,06	78,55	85,96	90,62	92,48	95,55	95,74

Les graphes correspondant aux courbes d'activité antiradicalaires des extraits et de l'acide ascorbique sont tracés dans la figure 2. Les courbes de tendances ont uniquement été tracées pour quatre points expérimentaux situés autour de la valeur AAR de 50%.

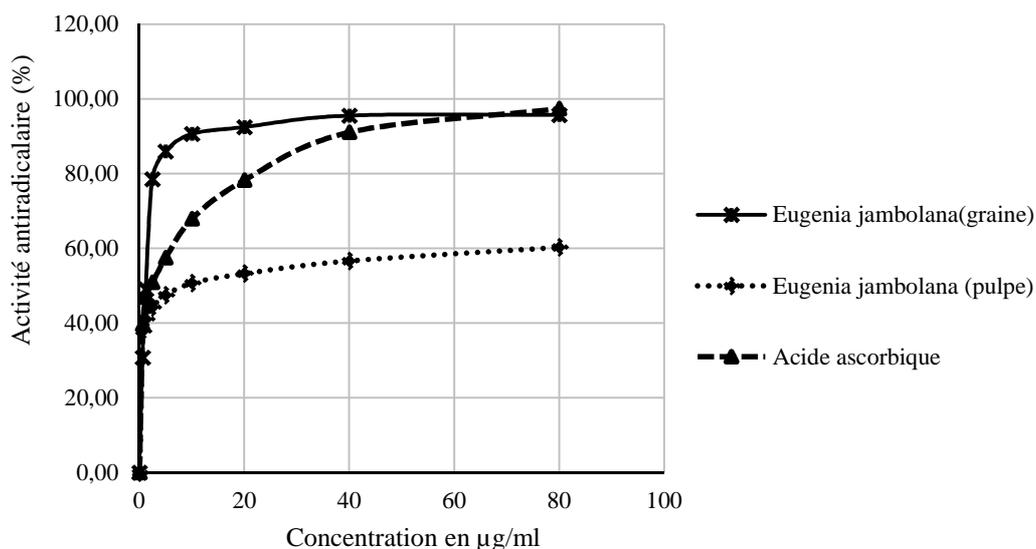


Figure 2 : courbes des activités antiradicalaires de pulpe et graine de *E. jambolana*

Le tableau 7 donne les valeurs de concentration inhibitrice IC50 des extraits de *E. jambolana* 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 fruits de *E. jambolana*

	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
Pulpe de <i>E. jambolana</i>	$y = 4,366 \cdot \ln(x) + 40,411$	9,00	0,997
Graine de <i>E. jambolana</i>	$y = -7,148x^2 + 48,84x + 0,828$	1,23	0,997

Comparée à l'acide ascorbique dont l'IC50 est de 2,05µg/ml (antioxydant de référence) dans les mêmes conditions expérimentales, la concentration inhibitrice IC50 de la graine de *E. jambolana* de 1,23µg/ml est pratiquement deux fois moindre que celle de l'acide ascorbique. Ce résultat confirme que les graines d'*E. jambolana*, disposant d'un pouvoir antioxydant deux fois plus élevé que l'acide ascorbique, sont très riches en substances antioxydantes. La pulpe de fruit de *E. jambolana* affiche aussi un pouvoir antioxydant important mais à un degré moindre par rapport aux graines.

3.3.2. CCM de screening phytochimique

L'identification qualitative *in situ* des substances à activité antioxydante révélées par CCM de « bioautography » au DPPH est obtenue par confrontation aux chromatogrammes révélés à différents réactifs spécifiques. Ces analyses chromatographiques permettent de déduire que les substances naturelles responsables d'activité antioxydante des extraits de graines et de pulpe de *E. jambolana* sont nécessairement des flavonoïdes, des coumarines et d'autres composés phénoliques. En effet, ces substances ont été confirmées selon de travaux de recherches antérieurs disposer d'activité antioxydante (Benbrook, 2005) (Popovici, 2009) (Imam, 2011)

4. CONCLUSION

Les travaux réalisés dans cet ouvrage permettent de conclure que la pulpe et en particulier les graines de fruit « rotra » possède de grand pouvoir antioxydant par leur richesse en métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les coumarines et d'autres composés phénoliques. Ainsi, la consommation traditionnelle de « rotra » comme antidiabétique est justifiée par sa vertu antioxydante

malgré qu'ils soient de goût légèrement acidulé et astringent. La consommation régulière de fruits, principalement le « rotra », disponibles et abondants localement, contribue par leur fort pouvoir antioxydant à limiter la formation de radicaux libres ou espèces oxygénées actives et maintenir parfait l'état de santé de l'organisme, en particulier contre le diabète, le cancer et de nombreuses maladies cardiovasculaires.

BIBLIOGRAPHIE

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

Barouki R., 2006. Stress oxydant et vieillissement, *Médecine/Sciences* ; 22 : 266-72.

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.

Benbrook, C., 2005. Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques, The Organic center for Education and promotion.

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.

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

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

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

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, Dewanjee M., 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, Projet FED – COI.

Hadj-Djilani, S. 2013. Les 10 vertus insoupçonnées de la banane, <http://www.plurielles.fr/beaute/soins/les-10-vertus-insoupconnees-de-la-banane-7859642-402>.

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); 2011: 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.

Morton J.F., 1987. Jambolan. Fruits of warm climates. pp. 375-378.

Nelson, S. C., Ploetz R. C., Kepler A. K., 2006. *Musa* species (banana and plantain), Species Profiles for Pacific Island Agroforestry (www.traditionaltree.org), Traditional Tree Initiative, August 2006, ver. 2.2.

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.

Popovici, C., Saykova I., Tylkowski B. 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.

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

Rasamimanana S., 2009. Evaluation de l'activité répulsive de l'huile essentielle de pulpe de *rotra*, *Syzygium cumini* L. (Myrtaceae), contre l'insecte dévoreur de graines *Myocalandra signatella*. pp. 5-7. Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'études approfondies en Biologie et Ecologie végétales, Option Physiologie végétale.

Ratsimamanga S. U., 1998. *Eugenia Jambolana* : Madagascar, Malagasy Institute of Applied Research (IMRA), Antananarivo, Madagascar.

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

Roussel A.-M., Ferry M., 2002. Stress oxydant et vieillissement, *Nutrition Clinique et Métabolisme*, Volume 16, Issue 4, December, Pages 285–291.

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.

Sridhar S.B., Sheetal U.D., Pai M.R.S.M., Shastri M.S., 2005. Preclinical evaluation of the antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* seed powder in streptozotocin-diabetic rats, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 463-468.

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

Tanala, 2015. *Rotra*, Dictionnaire malgache et encyclopédie de Madagascar, <http://motmalgache.org>.

Vasquez, J., C. Delgado, G. Couturier, D. M. Ferrero. 2002. Les insectes nuisibles au goyavier (*Psidium guajava* L. : Myrtaceae) en Amazonie péruvienne, *Fruits* 57, 323-334, DOI: 10.1051/fruits : 2002029.

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



Photo de l'évaporateur rotatif BÜCHI avec pompe à vide VACUUBRAND MD 4C CE01



Photo du Spectromètre UV/VIS Lambda 10 PERKIN ELMER



Photo de l'étuve de séchage EU115 S PROLABO