

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira Bejaia
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires

Mémoire de Fin de Cycle

En vue d'obtention du diplôme en Master II en Bioprocédés et Technologie
Alimentaire

Thème

*Détermination des propriétés antioxydantes
de *Putoria calabrica* de la commune de
Barbacha « Bejaia »*

Présenté par :

M^{elle} BERROUA Yamina

M^{elle} BERROUA Zahra

Membres de jury :

Président : M^{me} FELLA S.

Promoteur : M^{me} CHOUGUI N.

Examineur : M^{me} IKHENACHE F.

Année universitaire 2015/ 2016



Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice M^{me} Chougui, pour avoir accepté de nous encadrer, pour l'aide qu'elle nous a apporté.

Nos vifs remerciements s'adressent aux membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail :

M^{me} Ikhnache, pour l'honneur qu'elle nous a fait d'avoir acceptée de présider le jury d'examination.

M^{me} Fella, pour l'honneur qu'ils nous ont accordé en examinant ce modeste travail.

Nous tenons également à remercier toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicaces

*Ce modeste travail, achevé avec l'aide de Dieu le tout puissant, est dédié à tous ceux que
j'aime.*

*À la mémoire de mon précieux père. Qu'ALLAH t'offre le paradis qu'il désire et te
compte parmi ces biens aimés.*

À mon cher mari Yassine.

À ma très chère maman avec mes prières qu'elle soit toujours en bonne santé

*À mes chers frères et sœurs
À toute ma famille et ma belle-famille.*

zahra





Dédicaces

*Ce modeste travail, achevé avec l'aide de Dieu le tout puissant, est dédié à tous ceux que
j'aime.*

*À la mémoire de mon précieux père. Qu'ALLAH t'offre le paradis qu'il désire et te
compte parmi ces biens aimés.*

À mon cher mari younes et ma petite fille

À ma très chère maman avec mes prières qu'elle soit toujours en bonne santé

À mes chers frères et sœurs

À toute ma famille et ma belle-famille.

Yamina



Introduction

Historiquement, les plantes ont été une source d'inspiration pour de nouveaux composés médicamenteux, comme les médicaments dérivés des plantes ont apporté une importante contribution à la santé humaine. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2008, plus de 80% de la population mondiale repose sur la médecine traditionnelle pour leurs besoins de soins de santé primaires **(Pierangeli et al., 2009)**.

Il y a environ près de 240 000 à 300 000 espèces de plantes à fleur sur terre. Moins de 10% de ces espèces auraient été étudiées scientifiquement pour leurs propriétés pharmacologiques et antioxydantes **(Anthony et al., 2005)**.

Ces plantes produisent des métabolites secondaires tels que les composés phénoliques dont leur rôle d'antioxydant naturel est dû à leurs propriétés redox qui leur permettent d'agir soit comme des agents réducteurs (donneurs d'hydrogène), piègeurs de l'oxygène singulet (O_2^1) ou des chélateurs de métaux **(Rice-Evans, 2005)**.

Grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé, les études sur les composés phénoliques connaissent une importance croissante. En effet, ils interviennent dans la prévention et le traitement de maladies liées au stress oxydatif tels que les cancers, la cataracte, l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension artérielle, les maladies neurodégénératives, l'arthrite... **(Suhaj, 2006)**

La famille des rubiaceae, est l'une des plus grandes familles de plantes, elles associent près de 10 000 plantes. Elle est surtout représenté par des arbres et arbustes, des buissons, des lianes et des plantes herbacées et à fleurs qu'on trouve surtout dans les régions tropicales et humides, mais aussi dans les lieux froids et tempérées. Elle est d'un ordre économique majeur au niveau mondial (on y inclut le caféier) **(Tadhani et al., 2007)**.

Putoria calabrica fait partie des Rubiaceae, mais n'est pas encore étudiée du point de vue phytochimique et biologique. Or, plusieurs plantes de cette famille sont utilisées pour le traitement de diverses maladies dont l'inflammation de la gorge, la dysenterie, la fièvre, les maux de dents, les maux d'oreilles l'hypertension, les dysfonctionnements cardiovasculaires, les perturbations mentales et les désordres alimentaires **(Sikorski et Kolakowska, 2003)**. C'est une plante méditerranéenne assez commune dans le Tell algérien affectionnant les rochers calcaires **(Abi-Saleh et al., 1976)**.

C'est dans ce cadre que notre étude s'inscrit avec comme objectifs d'évaluer les effets potentiels de l'extraction des différents solvants sur le contenu en antioxydants et activités antioxydante et antiradicalaire de la partie aérienne de *Putoria calabrica*.

Introduction

Ce travail est organisé en deux parties :

La première résume les données bibliographiques, elle est organisée en deux chapitres :

- le premier chapitre traite des plantes médicinales ;
- le deuxième chapitre, par le manque et la privation en documentation sur l'espèce, la synthèse bibliographique est inclinée beaucoup plus vers sa famille (Rubiaceae).

La deuxième partie englobe l'étude expérimentale qui est organisée comme suit :

- présentation des méthodes suivies pour l'analyse des différents paramètres physico-chimiques (humidité, extractions et dosages des composés phénoliques et caroténoïdes) et la détermination de deux activités antioxydante et antiradication (réduction du fer, inhibition du radical DPPH) des extraits de *Putoria calabrica* obtenus par différents solvants d'extraction.
- présentation des différents résultats obtenus et leur discussion.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre I : Plantes médicinales	
1.1. Phytothérapie et plantes médicinales.....	3
1.2. Plantes médicinales.....	3
2.1. Métabolites primaires	4
2.2. Métabolites secondaires.....	4
2.2.1. Alcaloïdes	5
2.2.2. Huiles essentielles	5
2.2.3. Composés phénoliques.....	5
2.2.4. Pigments.....	9
3. Intérêt des plantes médicinales et leurs domaines d'application.....	10
3.1. Intérêt des plantes médicinales	11
3.2. Domaines d'application des plantes médicinales.....	11
Chapitre II : Famille des Rubiaceae et l'espèce <i>Putoria calabrica</i>	
1. La famille des Rubiaceae.....	13
1.1. Description botanique.....	13
1.2. Répartition géographique.....	14
1.3. Composition chimique.....	14
1.4. Intérêt économique	15
1.5. Utilisations traditionnelles.....	15
2. Genre <i>putoria</i> et l'espèce <i>Putoria calabrica</i>	16
2.1. Genre <i>Putoria</i>	16
2.2. Espèce <i>putoria calabrica</i>	16
2.2.1. Systématique botanique.....	16
2.2.2. Description botanique.....	17
2.2.3. Origine et synonymes.....	17
2.2.4. Habitat.....	17
2.2.5. Répartition géographique.....	17
Chapitre III : Matériel et méthodes	

1. Echantillonnage	19
2. Préparation des échantillons	19
3.2. Extraction et dosage des caroténoïdes.....	20
3.3. Extraction et dosage des composés phénoliques.....	21
1. Extraction.....	21
2. Dosage des composés phénoliques totaux	22
3. Dosage des flavonoïdes.....	23
4. Dosage des tannins condensés (proantocyanidines)	24
4. Evaluation des activités antioxydante et antiradicalaire.....	24
4.1. Pouvoir réducteur	24
4.2. Inhibition du DPPH.....	25
5. Analyse statistique.....	26
Chapitre IV : Résultats et discussion	
1. Analyses physico-chimiques.....	28
1.1. Humidité.....	28
1.2. Caroténoïdes.....	28
1.3. Composés phénoliques totaux.....	29
1.4. Flavonoïdes.....	28
1.5. Tannins condensés.....	30
2. Activités anioxydante et antiradicalaire.....	31
2.1. Inhibition du DPPH	31
2.2. Pouvoir réducteur	32
3. Corrélation entre les antioxydants et les activités antioxydante et antiradicalire des extraits de <i>P. calabria</i>	34
Conclusion	35
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

ANOVA : Analysis of variance

BHA : Butylated hydroxyanisole.

DPPH : 2, 2- diphenyl-1- picrylhydrazyl.

EC50 : Concentration inhibitrice à 50%

FeCl₃ : Chlorure de fer

Fe²⁺ : Fer ferreux

Fe³⁺ : Fer ferrique

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

K₃Fe (CN) ₆ : Ferricyanure de potassium

Mg EAC/ g : Milligrammes équivalent de catéchine par gramme du poids sec de la plante.

Mg EAG : Milligrammes equivalent Equivalents d'acide gallique du poids sec de la plante.

Mg EQ/g : Milligramme d'équivalent quercetine par gramme du poids sec de la plante.

MS : Matière sèche

NaHCO₃ : Bicarbonate de sodium

O.M.S : Organisation Mondiale de la Santé

v/v : volume/volume

pH : Potentiel d'Hydrogène

Liste des figures

Figure	Titres	Page
01	Structures de Nicotine et arécoline.	05
02	Structure de base des flavonoïdes.	07
03	Structures de l'acide ellagique (a) et l'acide gallique (b).	08
04	Structure de base des tannins condensés.	09
05	Structures de l' α -carotène et de la lutéine.	10
06	Structure des anthocyanines.	10
07	Structure botanique de la famille des Rubiaceae (<i>Cephaelis ipécacuanha</i>)	14
08	<i>P. Calabrica</i> et ses différentes parties	17
09	Répartition géographique de <i>P. calabrica</i> .	18
10	Le site d'échantillonnage de <i>P. calabrica</i> (Barbacha)	19
11	Photos de <i>P. calabrica</i> avant le séchage (a) et après le séchage (b).	19
12	Broyeur électronique (c) : Poudre de <i>P. Calabrica</i> (d)	20
13	Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux de <i>P. calabrica</i>	22
14	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	25
15	Teneurs en composés phénoliques de la partie aérienne de <i>P. Calabrica</i> .	29
16	Teneurs en flavonoïdes dans les extraits de la partie aérienne de <i>P. calabrica</i>	30
17	Teneurs en tannins condensés dans les extraits de la partie aérienne de <i>P. calabrica</i>	31

Liste des tableaux

Tableau	Titres	Page
I	Les différentes classes de composés phénoliques	06
II	Inhibition du DPPH par les extraits de <i>P.calabrica</i> , quercetine et de BHA.	32
III	Pouvoirs réducteurs des extraits de <i>Putoria calabrica</i> , quercetine et de BHA.	33
IV	Coefficients de corrélation des composés phénoliques totaux, flavonoïdes, tannins et activités antioxydante et antiradicalire de <i>P.calabrica</i> .	34

1. Généralités

1.1. Phytothérapie et plantes médicinales

La phytothérapie est le traitement curatif ou préventif des maladies et des divers troubles par l'utilisation de préparations obtenues à partir de plantes entières ou d'organes de plantes : Feuilles, fleurs, racines, fruits et grains (**Fintelmann et Weiss, 2004 ; Pribitkin, 2005**). Les plantes ainsi employées, sont communément appelées **plantes médicinales**, possèdent une quelle conque propriété thérapeutique. Ainsi, ce sont des plantes particulières, capables d'opérer des modifications physiologiques après consommation ou application (**Harding, 2005**).

1.2. Plantes médicinales

Une plante médicinale n'a pas de définition légale. C'est la jurisprudence qui décrète qu'une plante est médicinale. Pour cela elle doit être inscrite à la Pharmacopée et avoir un usage exclusivement médicinal. C'est uniquement la partie de la plante inscrite à la Pharmacopée qui appartient au monopole pharmaceutique.

Elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**Ghabrier, 2010**).

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**).

Des plantes ayant des propriétés médicamenteuses peuvent avoir également des usages alimentaires ou condimentaires ou encore servir à la préparation de boisson hygiénique (**Abayomi, 2010**).

Les plantes médicinales sont parfois récoltées à l'état sauvage mais beaucoup d'entre elles sont cultivées à grande échelle (Digitale, Pavot, Chanvre, etc.) pour répondre à la consommation. Les méthodes de sélection ou de manipulation génétiques sont également utilisées pour augmenter leur teneur en principes actifs (**Chabrier, 2010**).

Certaines familles sont particulièrement riches en principes actifs (Papavéracées, Apocynacées, Liliacées, Rubiacées, Solanacées, Lamiacées). Certaines plantes sont inoffensives telles que le Tilleul, la Camomille, la Menthe, etc. D'autres, très nombreuses,

sont toxiques et ne doivent être utilisées que sous forme pharmaceutique, telles que la Digitale, la Belladone, le Colchique, etc. (Marouf et Reynaud, 2007).

2. Substances actives des plantes médicinales

Les plantes sont capables de synthétiser des substances actives, dont la majorité sont des métabolites secondaires. Plus de 12000 métabolites secondaires ont été identifiés, ces derniers représentant moins de 10% seulement des métabolites totaux des plantes (Cowan, 1999).

Selon Boudet et David (2003), les substances végétales actives sont présentes à faibles doses dans les plantes, et peuvent assurer différents rôles, notamment comme système de défense contre les bactéries et champignons, les insectes et les herbivores, ou conférer aux plantes leurs odeurs ou leurs couleurs.

Les constituants chimiques des cellules végétales exerçant des activités biologiques sur les cellules humaines et animales sont répartis en deux groupes distincts : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

2.1. Métabolites primaires

Ce sont des composés issus du métabolisme primaire, par la voie du cycle de Krebs, qui est commune pour toutes les plantes. Ces métabolites tels que les acides α -aminés, les hydrates de carbone, les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont tous essentiels pour la croissance et la survie de la plante et représentent environ 90 % de la matière biologique rencontrée au niveau de la plante. Ainsi, ils sont exigés pour la croissance des plantes (Kintzios et Barberaki, 2004).

2.2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés appartenant à des groupes chimiques extrêmement divers, tels que les acides organiques, les composés aromatiques, les terpènes, les stéroïdes, les alcaloïdes, les carbonyles, les composés phénoliques etc (Kintzios et Barberaki, 2004).

Leur fonction dans les plantes est habituellement liée à la régulation métabolique, la croissance, le processus de lignification, la coloration de certaines parties des plantes et la protection contre l'attaque des organismes pathogènes (Bratt, 2000).

Les métabolites secondaires les plus étudiés sont : les alcaloïdes, les huiles essentielles, et les composés phénoliques.

2.2.1. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées, plus ou moins basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte. Ils sont issus au moins pour une partie du métabolisme des acides aminés et possèdent des propriétés pharmacologiques marquées (**Bruneton, 2001**).

La figure 01 présente les structures de deux alcaloïdes : la nicotine et l'arécoline.



Figure 1 : Structures de Nicotine et arécoline (**Krief, 2003**).

Les alcaloïdes présentent diverses activités biologiques, ainsi, ils ont un rôle essentiel dans la protection des végétaux contre les agressions extérieures. De plus, diverses activités associées aux alcaloïdes ont des rôles bénéfiques pour l'Homme, certaines incluent des vertus thérapeutiques (morphine). Aussi, certaines molécules présentent des activités antimicrobiennes (antibactérienne, antifongique et antivirale). D'autre part, d'autres molécules sont connues comme des drogues (cocaïne) (**Louis, 2004**).

2.2.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des produits naturels utilisés comme matières premières dans plusieurs domaines, notamment en parfumerie, cosmétiques, aromathérapie et phytothérapie (**Mouhssen, 2004**).

Une huile essentielle est un mélange hétérogène complexe qui renferme principalement des terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes) et dans certains cas des dérivés phénylpropaniques (**Bruneton, 2001**).

2.2.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent un des groupes hétérogènes les plus importants de métabolites secondaires distribués dans les plantes, ils ne possèdent aucune fonction métabolique spécifique. Cependant, il apparaît que ces composés sont essentiels à la survie de la plante (**Rauha, 2001**).

Actuellement, ils constituent l'un des groupes de métabolites secondaires végétaux les plus nombreux, avec plus de 8000 structures phénoliques actuellement connues, variant des plus simples molécules (acides phénoliques, phenylpropanoïdes, flavonoïdes) aux composés hautement polymérisés (lignines, mélanines et tannins) (Lugasi *et al.*, 2003).

Les composés phénoliques sont parmi les substances bioactives les plus puissantes et les plus promettantes en thérapeutique. Des activités antitumorales, antivirales et antibiotiques significatives sont attribuées à ces substances naturelles (Moldovan et Hodişan, 2004).

Leur rôle d'antioxydants naturels dans les plantes est dû à leurs propriétés redox qui leur permettent d'agir comme : des agents réducteurs (donneurs de protons et d'électrons), piègeurs de l'oxygène singulet (1O_2), inhibiteurs des enzymes impliquées dans le stress oxydant et chélateurs des traces de métaux (N'Guessan, 1993).

Plusieurs classes de composés phénoliques sont définies selon le squelette de base (Tableau I).

Tableau I : Les différentes classes de composés phénoliques (Daayf et Lattanzio, 2008).

Squelette carboné	Classes de composés phénoliques
C6	Phénols simples et benzoquinones
C6-C1	Acides phénoliques
C6-C2	Acétophénonnes et les acides phenylacétiques
C6-C3	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes
C6-C4	Naphthoquinones
C6-C1-C6	Xanthonnes
C6-C2-C6	Stilbènes et anthraquinones
C6-C3-C6	Flavonoïdes et isoflavonoïdes
(C6-C1) ₂	Tannins hydrolysables
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoïdes
(C6-C3) _n	Lignines
(C6-C3-C6) _n	Tannins condensés

a. Acides phénoliques

Ce sont des unités simples des composés phénoliques. Ils peuvent être présents à l'état libre, liés entre eux ou attachés aux autres molécules (glucides, protéines, etc.). Deux acides phénoliques sont distingués ; il s'agit des acides hydroxybenzoïque et cinnamique ; leurs squelettes de base sont respectivement C₆-C₁ et C₆-C₃. Ils sont synthétisés via la voie shikimate pour le premier et par la voie de phénylpropanoïde pour le second (**Haslam, 1998**).

b. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules à faible poids moléculaire, caractérisées par le noyau flavane (Figure 2). Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés ; ils sont largement distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs ; (**Heim et al., 2002**).

La famille des flavonoïdes est depuis bien des années définie par la nature de son squelette carbonée qui comprend 15 atomes de carbone répartis selon la séquence C₆-C₃-C₆ commune à tous les flavonoïdes (Figure 2) et dans laquelle deux cycles benzéniques A et B sont reliés par un élément à 3 atomes de carbone (**Duthie ,2003**).

Les flavonoïdes sont généralement de coloration jaune, mais il existe d'autres de couleurs variées ou même incolore (**Richter, 1993**). Au sens large du terme ce groupe comprend principalement trois familles : les flavan-3-ols (ou catéchines), les flavonols et les anthocyanes (**Perret, 2001**).

Parmi leur propriétés thérapeutiques connues : le piégeage des radicaux libres, prévention de l'oxydation des LDL, inhibition des enzymes hydrolytiques et oxydatives et des propriétés anti-inflammatoires. Ils jouent un rôle dans la protection contre les rayonnements ultraviolets, dans la défense des plantes contre les microorganismes pathogènes, dans la fertilité des plantes et dans les interactions plantes-microorganismes (**Girotti-Chanu, 2006**).

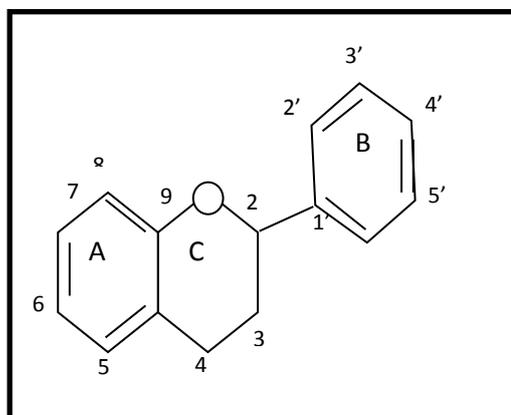


Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes (**Girotti –Chanu, 2006**).

c. Tannins

Ce sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3 000 Da qui présentent, à côté des réactions classiques, des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines ». Ainsi, les tannins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Da (**Hagerman, 2002**).

Selon leur structure biochimique, il est usuel de distinguer deux classes : les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

c.1. Tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose, c'est à dire un noyau central de glucose sur lequel se fixent, au moyen d'une liaison ester, des acides : l'acide gallique pour le groupe des gallotanins, l'acide ellagique pour le groupe des ellagitanins (Figure 3) (**Sébastien, 2006**).

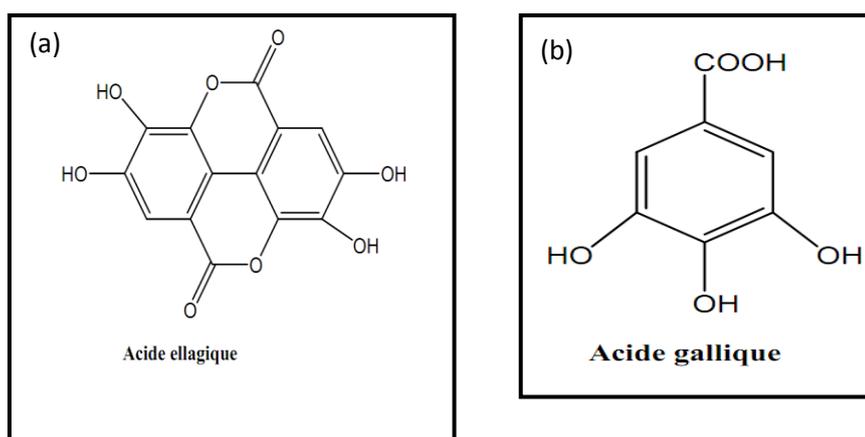


Figure 3 : Structures de l'acide ellagique (a) et l'acide gallique (b) (**Nkhili, 2009**)

c. 2. Tanins condensés (proanthocyanidines)

De structure plus complexe, ils sont présents dans les plantes vasculaires, des dicotylédones aux plantes plus primitives, fougères et gymnospermes. Ce sont des polymères de flavan-3-oles (Catéchine) et de flavan-3,4-dioles (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux.

Les chaînes de polymères comptent de 2 à 20 unités environ, et il existe de nombreuses hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère. Cette diversité structurale explique les variations d'activités biologiques (**Bouزيد, 2009**).

La figure ci desous montre la structure des tannins condensés .

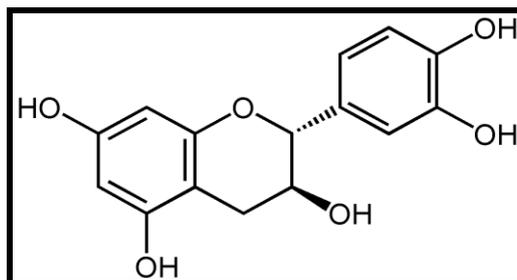


Figure 4 : Structure de base des tannins condensés (Lim et al., 2007).

De nombreux tannins présentent des propriétés antioxydantes par le piégeage des radicaux libres ou encore par l'inactivation des ions pro-oxydants (Lim et al., 2007). Grâce à leurs fonctions phénoliques, qui ont un fort caractère nucléophile, les tannins sont d'excellents piégeurs de radicaux libres. Les radicaux libres, tels le fer et le cuivre sous forme libre, sont des espèces chimiques instables et très réactives qui peuvent s'attaquer à l'ADN et perturbent le processus de réplication, induisant des mutations cancérigènes. Ainsi, des activités antimutagènes et anticancéreuses ont été attribuées à certains tannins en raison de leur propriété antioxydante (Ellis, 2001).

2.2.4. Les pigments

Parmi les pigments répandus dans les plantes, les anthocyanes et caroténoïdes. Ces derniers constituent le plus grand et probablement le groupe le plus important de pigments naturels. Ils ont un rôle crucial grâce à leurs propriétés antioxydantes (He et Giusti, 2010).

a.1. Caroténoïdes

Les Caroténoïdes sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits. Ce sont des molécules tétraterpéniques, constituées de l'enchaînement de 8 unités isopréniques, possédant un chromophore caractéristique (au moins 10 doubles liaisons conjuguées) expliquant leur couleur jaune-orangée et leur sensibilité à l'oxydation.

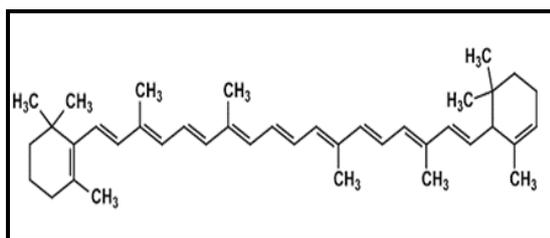
Les plus importants sont : le β -carotène, l' α -carotène, le lycopène, la β -cryptoxanthine, la lutéine et la zéaxanthine (Figure 5). Ces molécules ont suscité l'intérêt grâce à leurs propriétés provitamine A et anti-oxydantes (Rao, 2007).

Les caroténoïdes empêchent les dommages génétiques, protègent contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêchent l'expression des

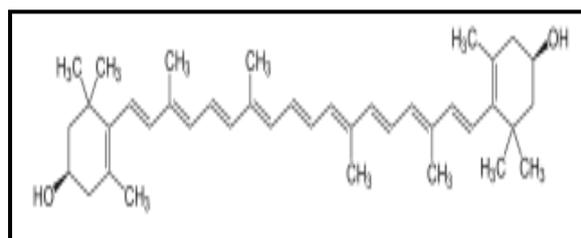
oncogènes. Les caroténoïdes sont impliqués dans la prévention de nombreux types de cancer ; cancer de prostate ; cancer du poumon (**Perez et al., 2006**).

Leur structure polyène leur permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singulet par l'absorption de son énergie excédante pour donner un oxygène moléculaire triplet et un caroténoïde activé.

Les caroténoïdes peuvent également inhiber les radicaux libres par transfert d'hydrogène Pour devenir un radical caroténoïdes stable (**Beutner et al., 2001**) .



α . carotène



Lutéine

Figure 5 : Structures de l' α -carotène et de la lutéine (**Borel et al., 2005**).

b.2. Anthocyanines

Les anthocyanines appartiennent à la famille des flavonoïdes et sont responsables des colorations orange, rouge, rose et bleue dans la plupart des fleurs, fruits et légumes (Figure 6). La stabilité des pigments anthocyanines est influencée par des facteurs divers tels que le pH, la température, présence de l'oxygène, des enzymes et (**Vatai et al., 2008**).

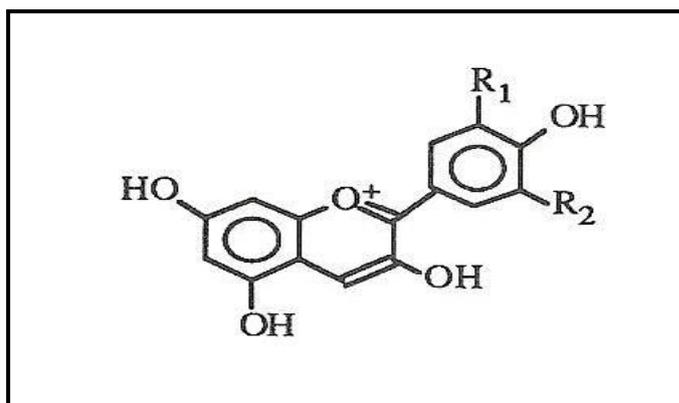


Figure 6 : Structure des anthocyanines (**Manach et al., 2004**)

3. Intérêt des plantes médicinales et leurs domaines d'application

3.1. Intérêt des plantes médicinales

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi synthèse (**Bahorun, 1997**).

Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable (**Mohammedi, 2005**).

Il est d'abord intéressant de remarquer que 30% environ des médicaments prescrits par le médecin sont d'origine naturelle, alors que cette proportion est de 50% pour les médicaments en vente libre (**Anthoula, 2003**).

Parmi les derniers médicaments obtenus à partir des plantes : le taxol isolé de l'if (*Taxusbaccata*, Taxaceae) qui a sa place dans le traitement des cancers gynécologiques. L'artémisinine, substance isolée d'une armoise chinoise (*Artemisiaannua*, Asteraceae) est utilisée dans le traitement des formes résistantes de malaria. On peut encore citer la galanthamine, obtenue de la perce-neige (*Galanthusnivalis*, Amaryllidaceae), utilisée depuis peu dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Le ginkgo (*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae) est certainement la plante réalisant le plus grand chiffre d'affaires. Il est utilisé sous forme d'extrait lors de troubles de la circulation cérébrale, comme le manque de concentration et les pertes de mémoire (**Bruno 1999 ; Lyons 2005**).

3.2. Domaines d'application des plantes médicinales

En raison de leur importance économique, sociale, médicinale, écologique et culturelles, les plantes médicinales commencent, ces dernières années, à occuper une place de choix au niveau des différents secteurs, et notamment, celui de la recherche, de l'agriculture, de l'industrie, de la médecine et de l'environnement.

a. Utilisation en médecine

Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale, surtout dans les pays en voie de développement, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires (Hamza, 2011).

b. Utilisation en alimentation

Les plantes médicinales sont utilisées en tant que composants de compléments alimentaires, colorants, composés aromatiques et épices... etc (Delaveau, 1987).

c. utilisation en cosmétique et agriculture

Les plantes médicinales sont utilisées pour soigner diverses maladies de la peau ainsi que dans la fabrication de produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène...etc.

Les huiles de quelques arbres comme l'arbre *azadirachta indica*, qui se développe au subcontinent indien et dont la hauteur atteint 12 à 18 m, ont des utilisations dans l'agriculture dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites) (Calvet, 2005 ; Bathily, 2002).

1. La famille des Rubiaceae

La famille des Rubiaceae est connue depuis le crétacé supérieur, appartient à l'ordre des Gentianales qui renferme cinq familles : Les Apocynaceae, les Gelsemiaceae, les Gentianaceae, les Loganiaceae et les Rubiaceae (**Guy, 1988**).

Elle est l'une des plus vastes familles d'angiospermes, à répartition cosmopolite, compte 13 000 espèces pour 620 genres.

Les genres les plus connus sont : Coffea, Cinchona, Ixora, Gardinia, Psytoria, Morindra, Rubia et inclut le genre Putoria (**Nicolas, 2016**).

1.1. Description botanique

Les Rubiaceae sont morphologiquement très différentes, on y retrouve des plantes herbacées annuelles comme les *Limnosipanea* et certains grands arbres de la canopée comme *Chimarrhi* (**Dupont et guignard, 2007**).

La plante est composée de :

- Feuilles : sont généralement opposées ou verticillées simples entières et stipules.
- Tige : est souvent quadrangulaire.
- Fleurs : sont en panicule, en cyme ou en capitule. L'inflorescence est généralement assez dense. Les fleurs sont bi sexuées, régulières, de type 4 ou 5. Le calice est gamosépale à dents très petites, avec parfois une dent hypertrophiée qui devient pétaloïde ; 4 ou 5 pétales qui sont les lobes d'une corolle gamopétale. 2 carpelles plus ou moins unis, soudés, formant un ovaire infère biloculaire. Loge à 1 ou plusieurs ovules anatropes en placentation axile, style entouré d'un disque nectarifère (**Backlund et al., 2000**).
- Fruit : produisent une baie mais beaucoup de rubiaceae donnent des fruits secs.
- Graines : sont ailées ou non.
- Racines : présentent des renflements avec des réseaux de cavités où se trouvent des fourmis (**Nicolas, 2016**).

La figure ci-dessous montre la structure botanique de la famille des Rubiaceae

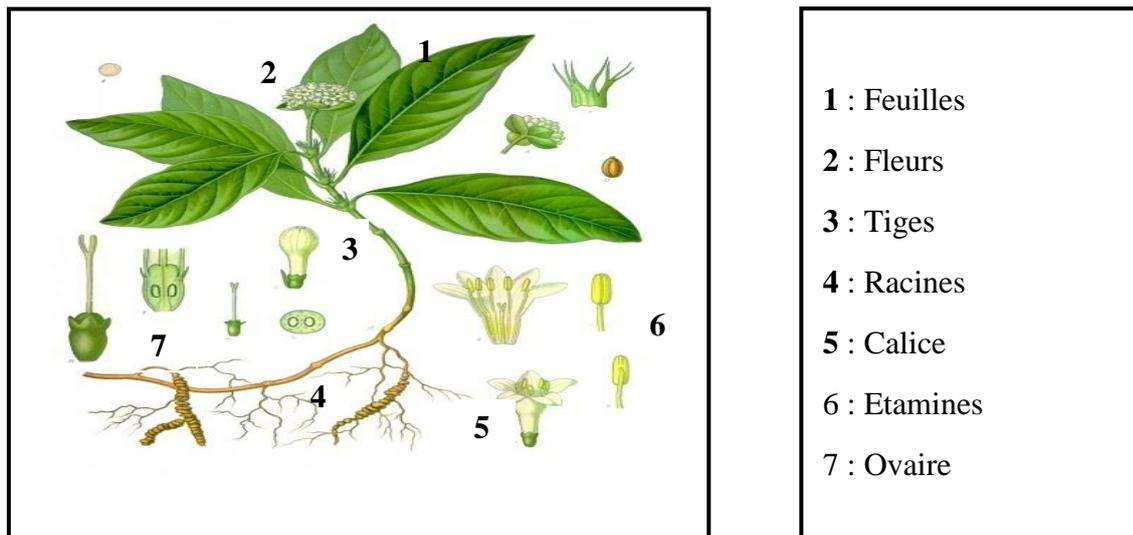


Figure 7: Structure botanique de la famille de Rubiaceae (*Cephaelis ipécacuanha*) (Kunzl, 1987).

1.2. Répartition géographique

La plupart des individus de la famille des Rubiaceae sont largement répandues sur tous les continents, allant des climats froids à tropicaux, mais la plus importante concentration est située dans les régions tropicales et subtropicales (Bennidir, 2012).

1.3. Composition chimique

Souvent, ce sont des accumulateurs d'aluminium (exemple : *Psychotia*). Des études ont rapporté la présence d'alcaloïdes tels que la quinine, la cinchonine, la caféine, des substances émétiques (ipéca) et d'aspéruloside. Ces plantes sont aussi connues pour leurs racines qui contiennent de l'alizarine, des saponines, des tannoïdes et des oxyanthoquinone (Judd et al., 2002).

Une analogie dans la composition phytochimique de différents organes de Rubiaceae est marquée ; ils sont riches en :

a. Composés phénoliques totaux: acide gallique, acide caféique, acide p-coumarique, acide hydrox benzoïque, vanilline (Goetz et Le Jeune., 2011).

Les écorces de *Mitragyna inermis* contient: 19,5 mg EAG/g de MS de Composés phénoliques (Donatien ,2009), les Péricarpes des grains de *Coffea arabica* : Polyphénols totaux : 2 ,23% (Eva et al., 2016).

b. Flavonoïdes : une concentration de 11,1 mg EQ/g de MS a été enregistrée dans les écorces de *Mitragyna inermes* (Cheng et al., 2002).

Les racines de *Nauclea latifolia* : 0,3628 mg E Q/g de MS (Kabore et al., 1995).

C. Tannins : les tannins catechiques ont été trouvés dans le Péricarpe des grains de *Coffea arabica* avec une teneur de 0,55 % (Eva et al., 2016) et de 8 % dans les écorces de *cinchona succirubra* (Ghedira et Goetz, 2012).

d. Alcaloïdes : les alcaloïdes ont été détectés dans les écorces de *Cinchona succirubra* (6,5 %) , les feuilles et racines de *Nauclea latifolia* (0,55%) (Kabore et al., 1995).

e. Térpénoides : Les plus fréquents triterpènes et stéroïdes sont les triterpénoïdes et monoterpènes (Cheng et al., 2002).

Rodrigo et al. (2014) ont révélé la présence des monoterpènes dans la partie aérienne de *Mitracarpus frigidu*.

C. Hétérosides : les plus fréquents sont l'aspéroloside, le monotropéine et l'antraquinone. Goetz et Le Jeune. (2011) ont rapporté la présence, dans l'*Asperula odorata*, des saponosides et iridroïdes à 0,05 %.

d. Huiles essentielles : des traces de α -terpinéol, linalol, limonène ont été obtenues par Ghedira et Goetz (2012) dans les écorces *cinchona succirubra*.

1.3. Intérêt économique

Les Rubiaceae sont probablement peu utilisées en rapport à leur diversité, mais sont d'un ordre économique majeur au niveau mondial. En effet, *Coffea robusta* et *Coffea arabica*, avec lesquelles le café est préparé par infusion de leurs graines, considéré l'un des marchés les plus fructueux issus du monde végétal, après les céréales (Jean et Pierre., 2010). Un autre exemple *Morinda citrifolia* est commercialisée à grande échelle comme supplément alimentaire, principalement aux États-Unis, sous forme de jus de fruit pasteurisé mais aussi de jus séché ou d'extrait sec (CCE., 2003).

1.5. Utilisations traditionnelles

La quinine, première molécule antimalarique, extraite à partir des écorces de différentes espèces de *Cinchona* et l'ipéca, un vomitif, produit par *Psychotria ipecacuanha*. Le gardénia (*Gardenia Ellis*) est une fleur emblématique depuis les côtes asiatiques jusqu'aux îles de

Polynésie orientale où il entre dans la composition du monoï pour son odeur agréable et intense (Arnaud, 2016).

En médecine traditionnelle sub-saharienne, on retrouve un certain nombre d'espèces de Rubiaceae utilisées pour traiter plus de 70 indications médicales telles que le paludisme et l'hépatite, l'eczéma, l'œdème, l'hypertension et le diabète.

Le genre *Uncaria*, est souvent employé en médecine traditionnelle pour le traitement des ulcères, fièvres, maux de têtes et des cas d'infections fongiques (Lionel, 1999).

1. Le genre putoria et l'espèce *Putoria calabrica*

2.1. Le genre Putoria

Les *Putoria* sont des sous arbrisseaux rameux, fétides, à tiges couchées, à feuilles opposées et coriaces. La corolle, de couleur pourpre, a la forme d'un entonnoir prolongé à la base par un long tube. Il existe 3 espèces méditerranéennes dont une en Europe (*P. calabrica*).

En Algérie, on retrouve ces 3 trois espèces :

- *Putoria* de Calabre (*Putoria calabrica*) qui habite surtout les stations rocheuses ; il est le plus répandu,
- *Putoria* à feuilles courtes (*Putoria brevifolia*) dont les tiges sont veloutées ; il est rencontré surtout à Santa-Cruz (près d'Oran). On peut y rattacher le *Putoria microphylla* qui est une plante en petites touffes et à feuilles d'un 1/2 centimètre de Kalaa à l'est de Mascara (Lapie, 2010).

2.2. L'espèce *putoria calabrica*

2.2.1. Systématique botanique

La systématique végétale est la partie de la botanique qui a pour objet le groupement des plantes en des classes ou systèmes, en prenant en compte les caractères morphologiques, cytologiques, biochimiques et de biologie moléculaire.

Celle de *P. calabrica* est tirée du livre «la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales » (Querzel et Santa, 1963).

- ◆ **Règne** : Plantae
- ◆ **Embranchement** : Spermatophytes
- ◆ **Sous Embranchement** : Magnoliophyta
- ◆ **Classe** : Magnoliopsida
- ◆ **Ordre** : Rubiales Gentianales
- ◆ **Famille** : Rubiaceae

- ◆ Genre : *Putoria*
- ◆ Espèce : *Putoria calabrica*

2.2.2. Description botanique

C'est un arbrisseau nain de 10 à 100 cm, très ramifié, formant des tapis de 1 m de diamètre et de 10 à 30 cm de hauteur avec des petites fleurs à quatre pétales roses groupés à l'extrémité des rameaux, elle est caractérisée par une très longue floraison qui a lieu de mai à novembre. Les feuilles, à pétiole court, sont oblongues et opposées, lisses vert foncé et persistantes. Elle donne un fruit bilobé, drupacé et rouge sombre à maturité (Marie de Paris et Wilaya d'Alger, 2012).

La figure 8 illustre *P. Calabrica* avec ses différentes parties.

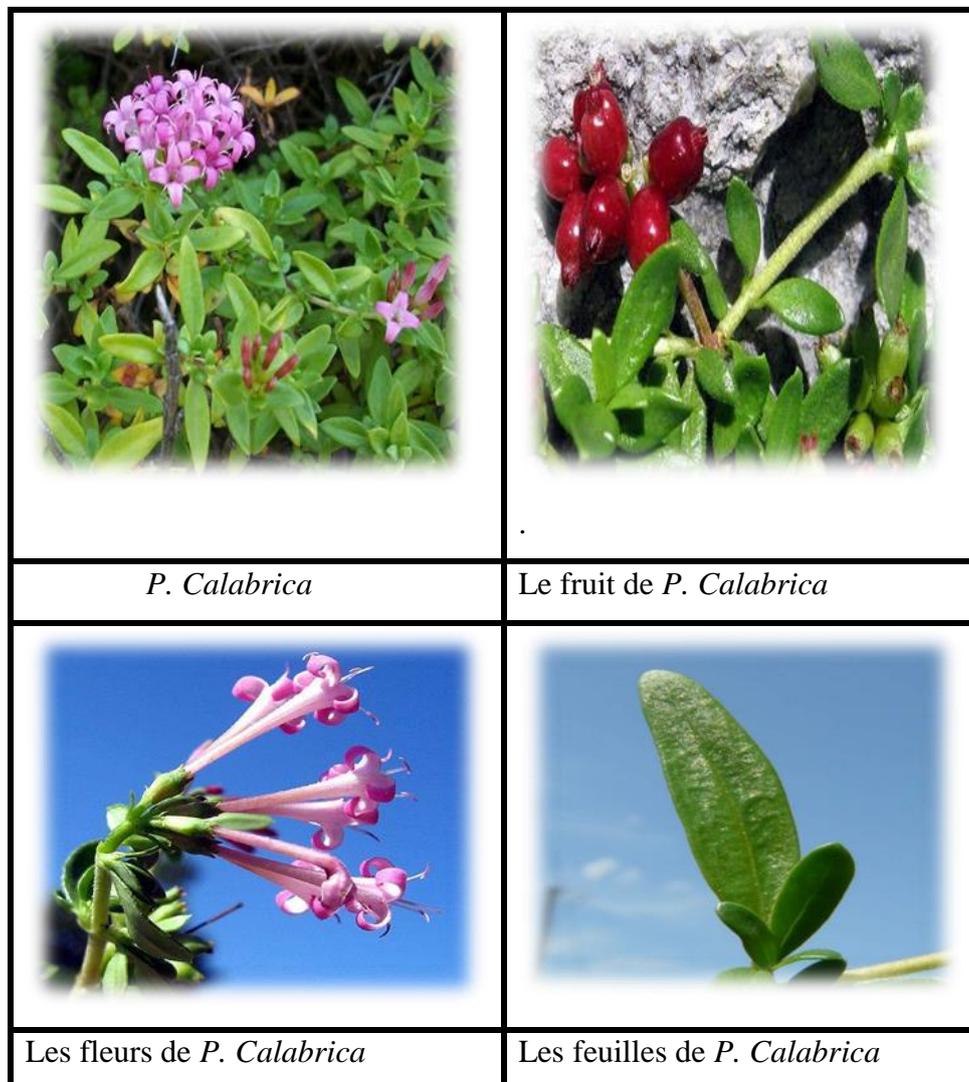


Figure 8 : photographies de *P* différentes parties de *P.calabrica* (Anonyme 1).

2.2.3. Origine et synonymes

P. Calabrica est caractérisé par une odeur désagréable obtenue par froissement des feuilles, d'où son ancien nom de *Putoria*, qui signifie *putois*, et *calabrica* fait référence à l'origine de la plante : la Calabre de l'Italie (CNDRB, 2012).

P. calabrica dispose de plusieurs synonymes : *Plocama Calabrica*, *Putoria Cymosa*, *Asperula Calabrica*.

Son nom arabe : Djefna (الجفنة) (Leflouch et al., 2010)

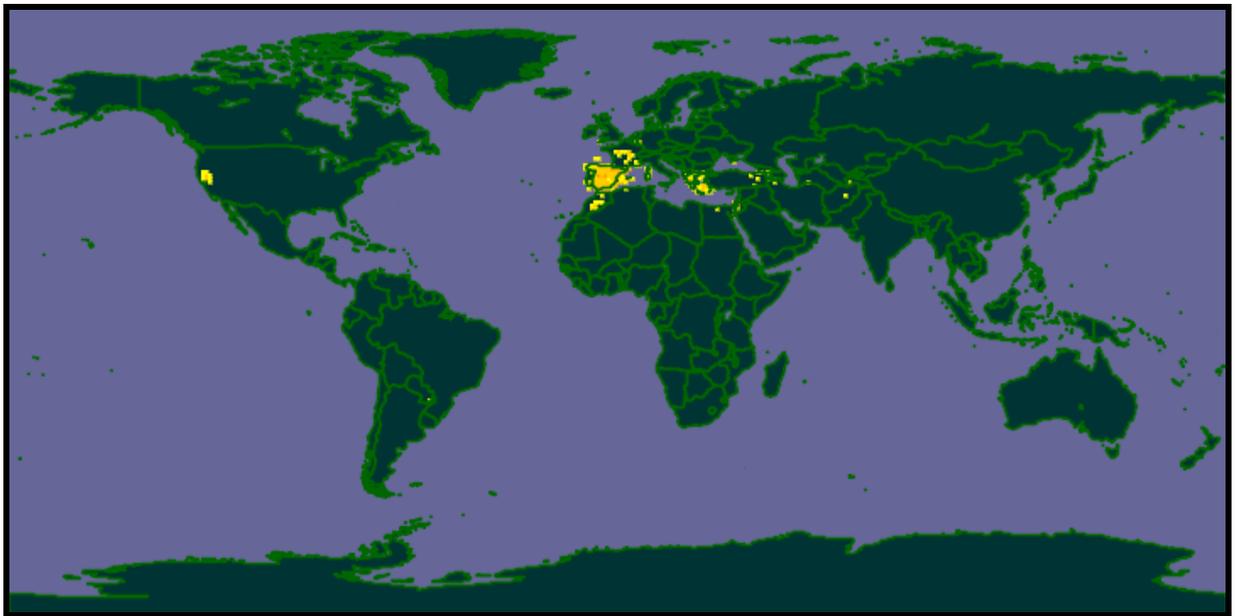
2.2.4. Habitat

P. Calabrica pousse sur les rocailles, affectionnant les roches calcaires, argileux, et les lieux pierreux et ensoleillés dont l'altitude est de 150 à 1100 m (Vela, 2006).

2.2.5. Répartition géographique

P. Calabrica est une plante du bassin méditerranéen, distribuée de façon discontinue : Sud de l'Italie (Calabre, Sicile), Sud de l'Espagne, Afrique du Nord (assez commune dans le Tell algérien), Méditerranée orientale (de la Yougoslavie à la Palatine) : elle est présente dans les îles de Crète, Rhodes, Chypre (Cynthal et Frasier, 2008).

La figure 9 montre la distribution de *P. calabrica* dans le monde.



 : Répartition géographique de *P. Calabrica*

Figure 9 : Répartition géographique de *P. calabrica* (Botanical muséum, 2015).

1. Echantillonnage

La récolte de la plante (*Putoria calabrica*) est effectuée à la fin du mois de Février 2016 sur les sentiers dans la région de Barbacha (Bejaia) (figure 10). L'espèce est identifiée par Mr Abbaci (enseignant et doctorant au Laboratoire d'Ecologie et Environnement) et confirmée par la suite par le professeur Moulai (Laboratoire de Zoologie Appliquée et d'Ecologie Animale).

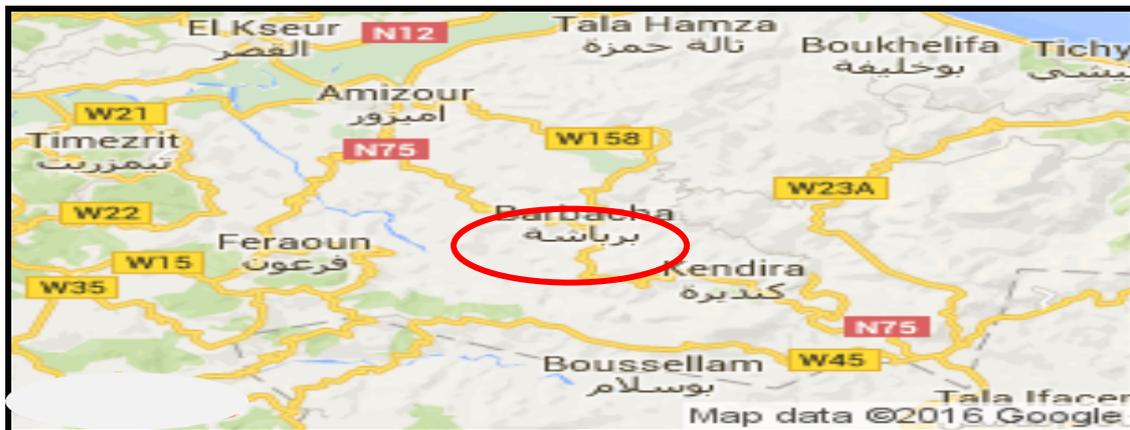


Figure 10 : Le site d'échantillonnage de *P. calabrica* (Barbacha) (Anonyme 2).

2. Préparation des échantillons

La partie aérienne de la plante récoltée (565g) est débarrassée des racines et des tiges puis séchée pendant six jours à température ambiante et à l'ombre. La figure 11 illustre la plante avant et après séchage.



Figure 11: Photos de *P. calabrica* avant le séchage (a) et après le séchage (b).

Après le séchage, la plante (205g) est soumise au broyage à l'aide d'un broyeur électronique de type PLANESAT (Chine) (figure12) jusqu'à obtention d'une poudre fine qui est conservée au congélateur pour servir aux analyses chimiques.



(c)

(d)

Figure 12 : Broyeur électronique (c) : Poudre de *P. Calabrica* (d)

3. Analyses physicochimiques

3.1. Détermination du taux d'humidité

L'humidité est mesurée par la méthode de séchage à l'étuve ; 2g d'échantillon sont séchés à l'étuve à 105°C jusqu'à obtention d'une masse constante. La différence entre le poids avant et après séchage exprime la teneur en eau de l'échantillon initial (Lako, 2007).

$$\text{TH (\%)} = [(\text{PF} - \text{PS})/\text{PF}] * 100$$

Où

TH : taux d'humidité.

PF : poids frais.

PS : poids sec.

3.2. Extraction et dosage des caroténoïdes

Les caroténoïdes contiennent dans leur structure plusieurs doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de l'absorption de la lumière par excitation des électrons des liaisons π (Rodriguez-Amaya, 2001).

La méthode de **Sass-Kiss et al. (2005)** est suivie pour doser les caroténoïdes de la partie aérienne *P. calabrica* avec quelques modifications. Pour cela, un poids déterminé de la poudre est additionné à 10ml d'un mélange de solvant (hexane, acétone, éthanol) (2 :1 :1, v/v/v). Après agitation pendant 15 min, le mélange est centrifugé à 4500 tours/min pendant 15 min. La phase supérieure (hexanique) contenant les pigments, est récupérée et le culot a subi une deuxième extraction dans les mêmes conditions. Les deux phases hexaniques sont mélangées puis l'absorbance de ce mélange est lue à 450 nm.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent β -carotène par g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la β -carotène ($\mu\text{g E } \beta\text{-C/g}$) (**Annexe III**).

3.3. Extraction et dosage des composés phénoliques

1. Extraction

L'extraction est réalisée selon la méthode de macération avec agitation. Quatre solvants sont utilisés : Méthanol 70 %, Ethanol 70 %, Acétone 70 %, et l'Acétate d'éthyle. Un poids déterminé de poudre de la plante est mélangé à 50ml de chaque solvant. Le mélange obtenu est agité pendant 24h à température ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique, puis filtré à travers le papier filtre WATTMAN.

Une deuxième extraction est réalisée sur le retentât dans les mêmes conditions. Les deux filtrats sont mélangés et sont évaporés à pression réduite à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (HEIDOLPH, Allemagne).

Les extraits obtenus sont ensuite reconstitués dans du méthanol pur et sont conservés au congélateur pour servir aux différents tests (figure 13).

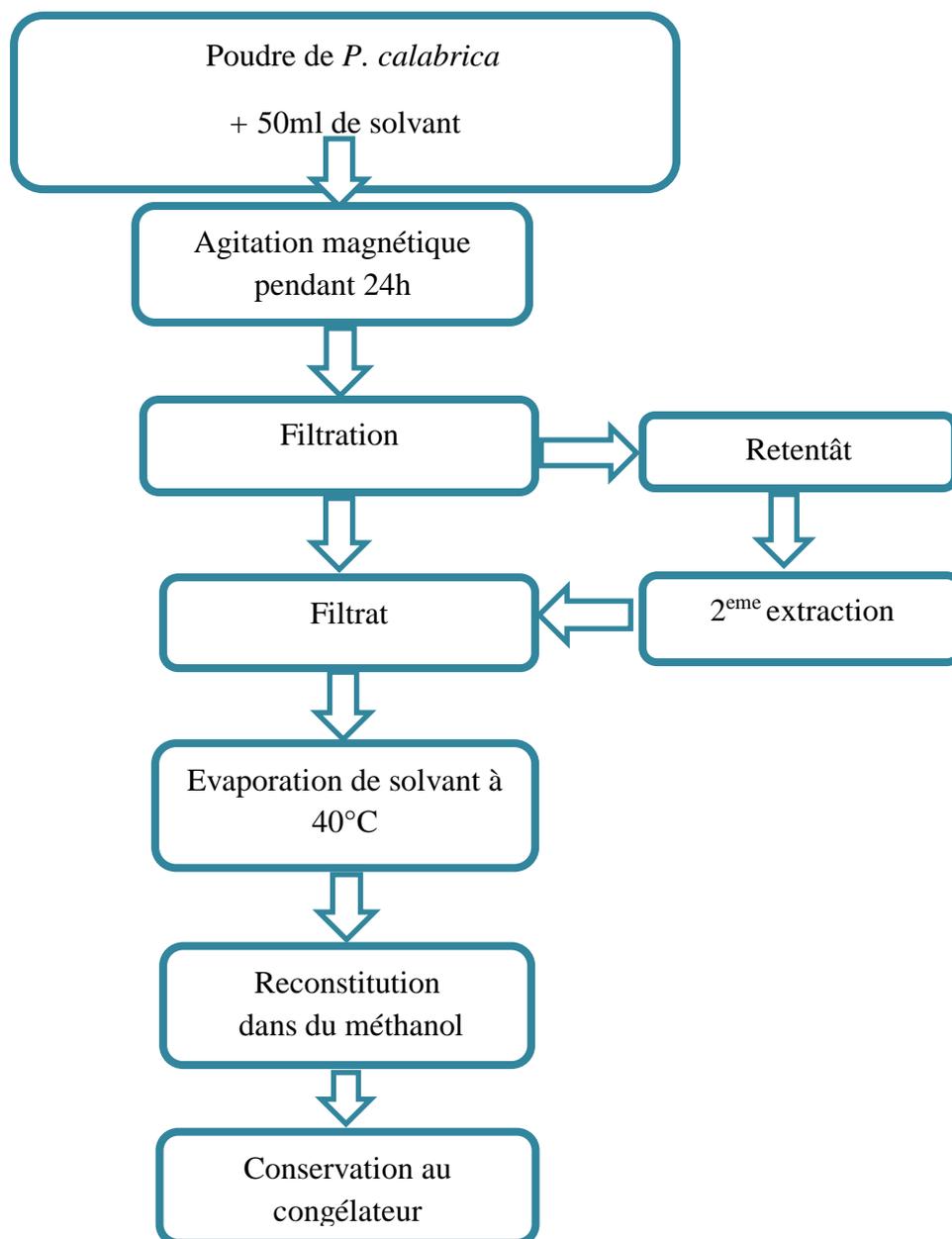


Figure 13: Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux de *P. calabrica*

2. Dosage des composés phénoliques totaux

2. 1. Principe

Le dosage des composés phénoliques totaux est réalisé suivant la méthode spectrophotométrique dont le principe repose sur le fait que les ions phénolates formés par addition de carbonates de sodium sont oxydés par le réactif Follin Ciocalteu, cette oxydation inclut la réaction du mélange des acides phosphotungstique et

phosphomolybdique qui se réduisent dans le milieu alcalin. À cette réaction, un mélange des oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) est formé, donnant ainsi à la solution une coloration bleue qui est proportionnelle au taux de composés phénoliques (Bucic-Kojik *al.*, 2007).

2.2. Mode opératoire

Le dosage des composés phénoliques est effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Velioglu *et al.* (1998); 1,5ml de réactif de Folin- Ciocalteu, dilué 10 fois, sont mélangés avec 250 μ l de chaque extrait. Après 3min d'incubation à l'obscurité, 1,5ml de carbonates de sodium (6 %) sont ajoutées. Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant une heure. L'absorbance est mesurée à 760nm contre un blanc.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (mg EAG/g de M S) (Annexe I).

3. Dosage des flavonoïdes

3.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes est basé sur la formation de complexes flavonoïdes-métaux tel que l'aluminium utilisé sous forme de chlorures d'aluminium ($AlCl_3$). La liaison des atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes forme avec les chlorures d'aluminium des complexes jaunâtres (Ribereau-Gayan, 1868).

3.2. Mode opératoire

La méthode de Djeridane *et al.*, (2006) est adoptée pour doser les flavonoïdes dans les extraits de *P. calabrica*. Pour cela, 1,5ml de chlorure d'aluminium (2 %) sont additionnés à 1,5ml de chaque extrait. Après 30min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 430nm contre un blanc.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercetine par gramme de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercetine (mg EQ/g de MS) (Annexe II).

4. Dosage des tannins condensés (proanthocyanidines)

Le dosage des tannins condensés est réalisé à l'aide de la méthode du Butanol-HCl décrite par **Vermerris et Nicholson (2006)** ; elle est basée sur la réaction de dépolymérisation des tannins condensés en milieu acide. Cette réaction conduit à la libération des anthocyanidines (molécules colorées) correspondants aux monomères clivés.

Un volume de 2,5ml de sulfate de fer acide [(Fe₂(SO₄)₃ dissous dans (3:2 butanol, HCl)] est additionné à l'extrait de poudre de *P. calabrica*. Après 50min d'incubation à 95 °C l'absorbance est mesurée à 530 nm. Les teneurs en tannins sont estimées selon la formule suivante :

$$C_T = \text{Abs } 530 * FD * PM / \epsilon . L$$

CT : concentration en tannins condensés en g/l

PM : masse molaire de cyanidine (287,24 g/mol)

ε : coefficient d'extinction molaire (3700 l/mol/cm)

L : longueur de la cuve (cm)

Les tannins condensés sont exprimés en mg équivalent cyanidine / g de MS (mg CE /g MS).

4. Evaluation des activités antioxydante et antiradicalaire

4.1. Pouvoir réducteur

4.1.1. Principe

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique Fe³⁺ du complexe ferricyanure en fer ferreux Fe²⁺. La forme réduite donne une couleur verte proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (**Odabasoglu et al., 2004**).

4.1.2. Mode opératoire

Le pouvoir réducteur est estimé par la méthode de **Gulcin et al. (2001)**. Un volume de chaque extrait, préparé à différentes concentrations [éthanol 70 % (1-0,2 mg/ml), méthanol et acétone 70 % (5-1,25 mg/ml), acétate (100-25mg/ml)], est additionnés à 1,25 ml de tampon phosphate (0,2M, PH 6,6), à 1,25ml de ferricyanure de potassium (1%) et à

1,25 ml d'acide trichloracétique (10 %). Après incubation à 50°C pendant 20min, un aliquote de 1,25ml du mélange est transféré dans un tube à essai et additionné de 1,25ml d'eau distillée et de 0,25ml de chlorure ferrique (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

Le BHA et la quercétine deux standards sont préparés respectivement à des concentrations de 0,4 à 0,1 mg/ml et de 0,16 à 0,04 mg/ml. Ces standards sont utilisés comme contrôle positif dans les mêmes conditions expérimentales.

Le pouvoir réducteur des extraits et des standards est exprimé par les valeurs des concentrations effectives à 50% (CE₅₀) qui correspondent à la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire de moitié l'absorbance à 700 nm.

Les résultats sont exprimés en mg/ml et sont déterminées graphiquement par des absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits et des standards testés.

Les EC₅₀ sont calculées à partir de l'équation logarithmique de la courbe tracée.

4.2. Pouvoir antiradicalaire

4.2.1. Principe :

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphenyle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (Sanchez, 2002).

La structure ainsi que la réaction impliquant le DPPH se résume dans la figure 14 de la façon suivante :

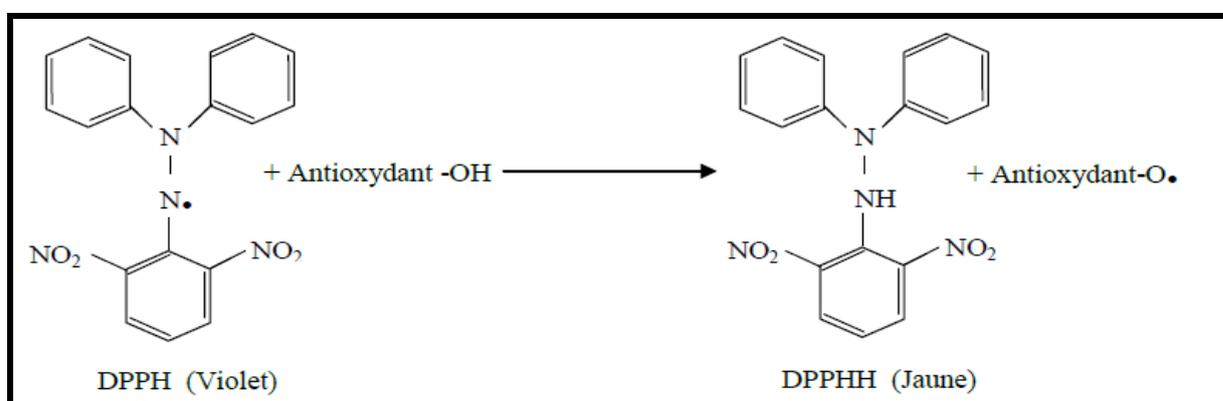


Figure 14 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

4.2.2. Mode opératoire

Un volume de 2,44 ml de solution méthanolique de DPPH est additionné à chaque extrait, préparé à différentes concentrations [éthanol 70 % (4-0,8mg/ml), méthanol et acétone 70 % (5-1,25mg/ml), acétate (200-80mg/ml)]. Le mélange est vigoureusement agité, puis laissé à l'obscurité pendant une heure et la décoloration par rapport au contrôle contenant la solution de DPPH est déterminé par la mesure de l'absorbance à 517nm (Brand et al., 1995).

Le BHA et la quercétine préparés à des concentrations de 0,2 à 0,04mg/ml et de 0,2 à 0,02mg/ml, respectivement sont utilisées comme contrôle positif dans les mêmes conditions expérimentales

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ inhibition DPPH} = (A1 - A2 / A1) \times 100$$

Où

A1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A2 : absorbance en présence d'extrait.

La concentration permettant d'inhiber de 50% le radical DPPH (EC₅₀) de chaque extrait est calculée graphiquement (pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de chaque extrait ou de standard testés).

Les EC₅₀ sont exprimées en mg/ml et sont calculées à partir de l'équation logarithmique de la courbe tracée.

5. Analyse statistique

Une analyse descriptive (moyennes et écarts types) des résultats de trois essais est réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2007.

Une étude statistique est faite par l'analyse de la variance entre les différents solvants utilisés pour doser l'ensemble des composés, en utilisant le test ANOVA-LSD du logiciel STATISTICA 10.0 à un niveau de signification de 0,05.

Les corrélations enregistrées entre les paramètres sont évaluées par le coefficient de corrélation de Pearson (r).

1. Analyses physico-chimiques

1.1. Humidité

Le test d'humidité a une grande importance pour l'extraction des composés phénoliques, car la présence d'eau est un élément gênant du rendement de l'extraction, en effet c'est une source de dégradation des composés phénoliques (Cork et Krockenberger, 1991).

Le taux d'humidité de la partie aérienne de *P. Calabrica* est de $6,15 \pm 0,21\%$. Hongt(2002) a trouvé une valeur proche pour les feuilles de *coffea arabica* (8,5%).

1.2. Caroténoïdes

La quantification des caroténoïdes dans la partie aérienne de *P. calabricaa* révéla une teneur de $724,75 \pm 7,9 \mu\text{g EBC/g}$. Cette valeur est largement plus élevée que celle obtenue par W-Yang et al. (2009) qui est de l'ordre de $12,7 \pm 0,11 \mu\text{g EBC/g}$ pour *Gardénia jasminoides* (Rubiaceae).

Dans le but d'évaluer les teneurs en molécules actives des extraits préparés à partir de la poudre de *P. calabrica*, un dosage de composés phénoliques totaux est effectué. La principale raison pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leurs sont attribués.

1.2. Composés phénoliques totaux

Les résultats du dosage des composés phénoliques révèlent une différence notable entre les différents extraits. L'étude statistique montre que la nature du solvant a un effet significatif ($p < 0,05$) sur l'extraction des composés phénoliques de la partie aérienne de *P. calabrica*. L'extrait éthanolique est le plus riche avec une concentration de $210,06 \pm 18,08 \text{ mg EAG/g}$, suivi par plus de deux fois moins de l'extrait méthanolique ($82,66 \pm 15,51 \text{ mg EAG/g}$) et de plus de trois fois moins de l'extrait acétonique ($66,28 \pm 1,66 \text{ mg EAG/g}$); tandis que l'extrait acétalique est le plus pauvre en ces composés, la concentration obtenue est de $38,2 \pm 2,3 \text{ mg EAG/g}$ qui est plus de cinq fois moins. La Figure 15 illustre les résultats des teneurs en composés phénoliques obtenues par chaque solvant d'extraction.

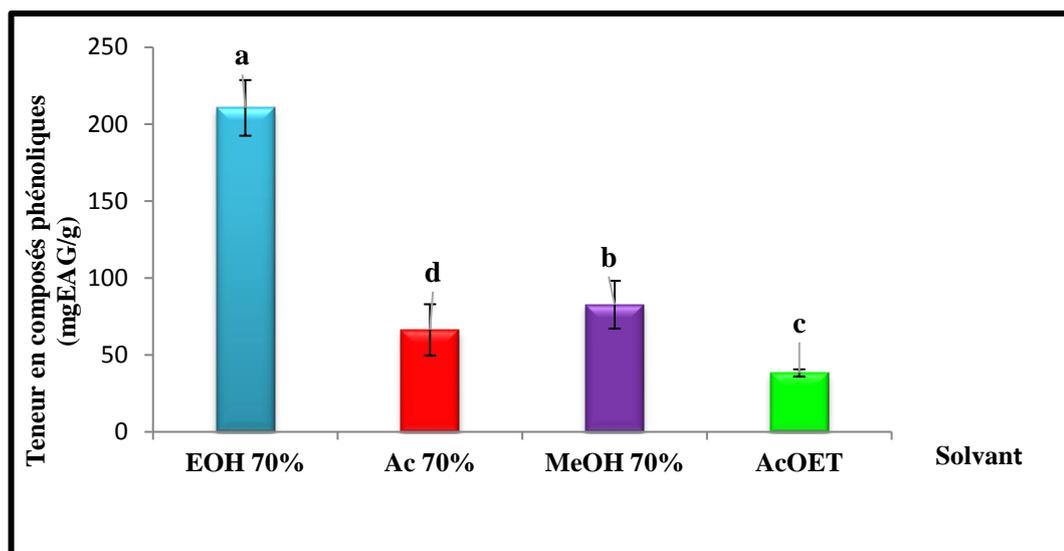


Figure 15: Teneurs en composés phénoliques de la partie aérienne de *P. Calabrica*.

- Les barres verticales représentent les écarts types.
- Pour chaque solvant, des lettres différentes indiquent des valeurs significativement

Peu d'études sont disponibles sur l'effet du solvant sur l'espèce étudiée ; la comparaison avec certaines espèces de la même famille a mis en évidence des variations de concentrations. En effet, pour exemple l'étude de **Madhu et al. (2012)** réalisée sur les feuilles d'*Anthocephalus cadamba* (Rubiaceae) a montré l'efficacité de l'acétate d'éthyle à mieux extraire les composés phénoliques ($194 \pm 4,90$ mg EAG/g) que l'éthanol ($149,87 \pm 4,40$ mg EAG/g), contrairement aux résultats obtenus dans cette présente étude. Notons aussi que les concentrations trouvées par les auteurs suscités sont respectivement plus faible et plus élevée aux extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle enregistrées dans la plante étudiée. Cependant, **Sristisri (2013)** a enregistré dans *Paederia foetida* (Rubiaceae), qui est une plante médicinale, une teneur proche de celle de l'extrait éthanolique (266 mg EAG/g). **Alainet al. (2011)** dans leur étude sur les tiges feuillées de *Mitragyna ciliata* ont obtenu, dans l'extrait de méthanol 96%, une valeur qui est deux fois plus faible ($40 \pm 1,36$ mg EAG /g).

1.4. Flavonoïdes

Les résultats révèlent des différences significatives entre les différents extraits à $p < 0.05$ (Figure 16). En effet, l'extrait éthanolique renferme la plus forte teneur ($123,78 \pm 1,56$ mg EQ/g) qui est quatre fois plus élevée que celle de l'extrait acétonique ($31,30 \pm 0,271$ mg EQ/g), environ six fois plus élevée que celle de l'extrait méthanolique ($26,39 \pm 0,65$ mg EQ/g) et plus de soixante-dix fois supérieure à celle de l'extrait acétalique ($1,70 \pm 0,02$ mg EQ /g).

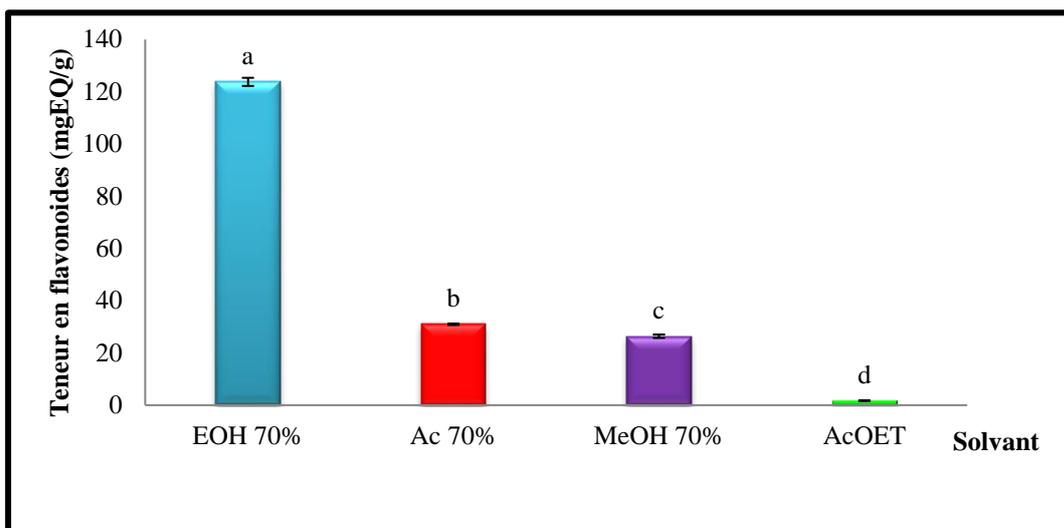


Figure 16: Teneurs en flavonoïdes dans les extraits de la partie aérienne de *P. calabrica*.

- Les barres verticales représentent les écarts types.
- Les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes : $a > b > c > d$. ($p < 0.05$).

En se basant sur les études réalisées sur des plantes de la même famille, la plante étudiée présente des concentrations en flavonoïdes plus fortes que celles rapportées par **Soobratte et al. (2008)** et qui sont de l'ordre de 18 et 7 mg EQ/g pour les extraits d'acétone 70% des feuilles de *Coffea macrocarpa* et *Chassalia grandifolia* (Rubiaceae) respectivement. Cependant **Sristisri (2013)** a enregistré une teneur plus forte qui est de 160,2 mg EQ/g dans l'extrait éthanolique (80%) de *Paederia foetida* (Rubiaceae).

1.5. Tannins condensés

L'extraction des tannins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (**Chavan et al., 2001**).

D'après la figure 17, la teneur en tannins condensés de la partie aérienne de *P. calabrica* varie selon le solvant d'extraction. L'étude statistique a montré des différences significatives entre les solvants utilisés ($p < 0,05$). La valeur la plus élevée est obtenue dans l'extrait éthanolique ($69,04 \pm 0,82$ mg EC/g), alors que la plus basse est enregistrée dans l'extrait acétonique ($24,60 \pm 2,63$ mg EC/g).

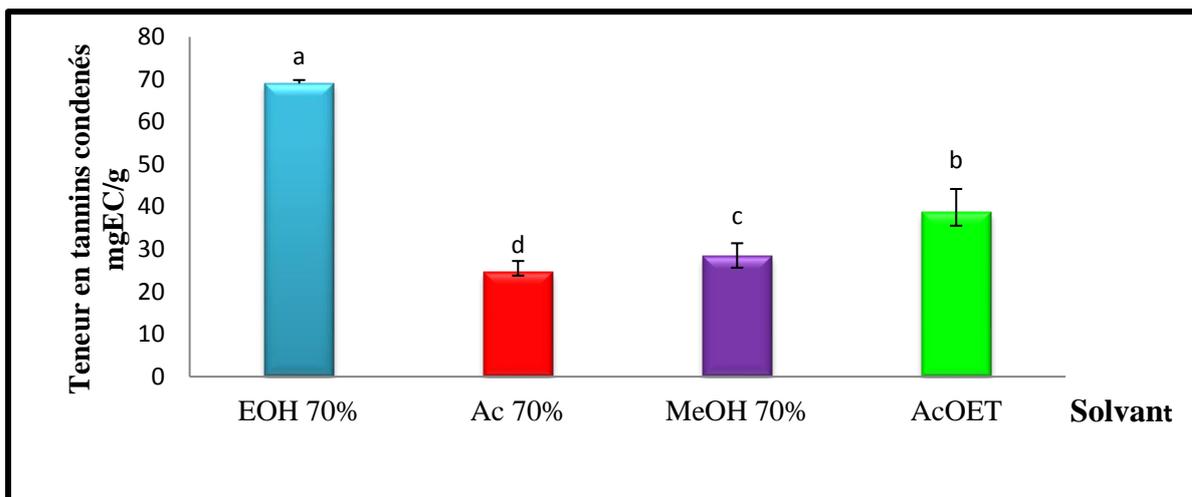


Figure 17: Teneurs en tannins condensés dans les extraits de la partie aérienne de *P. calabrica*

- Les barres verticales représentent les écarts types.
- Les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes : $a > b > c > d$. ($p < 0.05$).

D'après la littérature, dans l'étude menée par **Soobratte et al. (2008)** sur l'extrait d'acétone 70% des feuilles de *Coffea mauritiana*, la teneur en tannins notée est de l'ordre de $2,71 \pm 0,05$ mg EC/g qui est inférieure à nos résultats.

2. Activités anioxydante et antiradicalaire

2.1. Inhibition du radical DPPH

La concentration nécessaire pour inhiber 50% de radical DPPH (EC_{50}) est calculée pour chaque extrait ainsi que pour les deux standards BHA et quercétine. Plus faible est l' EC_{50} , plus actif est l'extrait. Le tableau II résume les résultats des EC_{50} obtenues ainsi que les coefficients de corrélation (r).

Tableau II : Inhibition du DPPH par les extraits de *P. calabrica*, quercétine et de BHA.

Echantillon	DPPH (EC_{50}) (mg/ml)	Coefficient corrélation (r)
Ethanol 70%	$1,55 \pm 0,01^b$	$0,99 \pm 0,00$
Méthanol 70%	$2,71 \pm 0,02^b$	$0,97 \pm 0,00$
Acétone 70%	$3,14 \pm 0,02^b$	$0,96 \pm 0,00$
Acétate d'éthyle	$152,64 \pm 2,10^a$	$0,99 \pm 0,00$
BHA	$0,046 \pm 0,00^c$	$0,99 \pm 0,00$
Quercétine	$0,034 \pm 0,02^c$	$0,99 \pm 0,00$

Les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes : a> b > c> (p<0.05).

D'après les résultats obtenus, les EC₅₀ varient de 1,55±0,01 à 152,64±2,10 mg/ml et une EC₅₀ relativement très faible indique une activité antioxydante très élevée. Partant de ce principe, la meilleure activité est obtenue avec l'extrait éthanolique (1,55±0,01 mg/ml). Par ordre d'efficacité, cet extrait est suivi de près par l'extrait méthanolique puis de celui d'acétone. L'extrait acétalique est doté d'un pouvoir antiradicalaire mais qui est beaucoup plus faible.

Selon l'étude statistique les extraits éthanolique, acétonique et méthanolique ne présentent aucune différence significative (p<0,05) ; seule différence significative (p<0,05) observée est entre ces derniers et l'extrait acétalique.

Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits de la partie aérienne de *P. calabrica* sont plus faibles par rapport à ceux trouvés avec la quercétine et le BHA dont les valeurs sont respectivement de l'ordre de 0,034±0,03 et 0,046±0,00 mg/ml. Notons que ces standards correspondent à des produits purifiés contrairement à nos extraits qui représentent un mélange de composés.

Autres études ont été rapportées sur l'activité antiradicalaire dont les résultats sont plus performants ; à titre de comparaison, **Alain et al. (2011)** ont obtenu une valeur de (EC₅₀) de 0,04 mg/ml sur les extraits éthanolique de *Sherbournia bignoniifolia* (Rubiaceae) et **Maloueki (2015)** a également enregistré une forte activité sur l'extrait acétonique de *Massularia acuminata* avec une EC₅₀ de l'ordre de 0.063 mg/ml vis-à-vis du DPPH. Contrairement à la présente étude **Madhu et al. (2012)** a révélé une forte activité antiradicalaire pour l'extrait acétalique (EC₅₀ = 1,12 µg/ml) alors que l'extrait éthanolique 95% a enregistré la faible activité (EC₅₀ = 21,24 µg/ml) pour les feuilles d'*Anthocephalus cadamba* (Rubiaceae).

Les propriétés antioxydantes et antiradicalaires rapportées dans les extraits de *P. calabrica* pourraient compléter aux composés phénoliques par leur capacité à capturer des radicaux libres et de complexer des métaux (**Bahorun et al., 2004**).

2.2. Le pouvoir réducteur

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits de la partie aérienne de *P. calabrica* et des standards déterminés, exprimés en EC₅₀, sont illustrés dans le tableau III.

Tableau III : Pouvoirs réducteurs des extraits de *Putoria calabrica*, quercetine et de BHA.

Echantillon	pouvoir réducteur (EC ₅₀ , mg/ml)	Coefficient de corrélation (r)
Ethanol 70%	0,73±0,00 ^c	0,96±0,00
Méthanol 70%	3,16±0,42 ^b	0,98±0,00
Acétone 70%	2,77±0,03 ^b	0,99±0,00
Acétate d'éthyle	30,50±1,51 ^a	0,99±0,00
BHA	0,31±0,04 ^c	0,98±0,00
Quercetine	0,08±0,01 ^c	0,99±0,00

Les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes : a > b > c > (p < 0.05).

L'extrait éthanolique présente significativement un fort pouvoir réducteur avec une EC₅₀ de 0,73±0,002mg/ml. Les extraits méthanolique et acétonique ne sont pas significativement différents (p < 0,05) et leurs EC₅₀ respectives sont 3,16±0,42 et 2,77±0,03 mg/ml. Tandis que le faible pouvoir réducteur est exposé par l'extrait acétalique avec une un EC₅₀de 30,506±1,509mg/ml.

L'activité des extraits à réduire le fer ferrique est faible comparé à celle de la quercetine et le de BHA dont les EC₅₀sont respectivement0,088 ±0,01 et 0,31±0,04mg/ml. Comparés à d'autres plantes de la même famille, **Suthagar et al.(2012)** ont trouvé que l'extrait acétonique 50%de feuille de *Morinda citrifolia* possède une activité de 3,043 mg/ml qui est moins importante que celle obtenue par les extraits de *p. calabrica* a l'exception de l'extrait acétalique.

Le pouvoir réducteur de l'espèce *P. calabrica* est probablement dû à la présence de composés chimiques qui peuvent servir comme donneur d'électron (**Siddhuraju et Becker, 2007**). **Yuguo et al. (2003)** ont isolé une nouvelle triglycoside de flavonol à partir des parties aériennes de *P. calabrica*, montrant une forte activité de piégeage des radicaux, a été synthétisé par une combinaison de transfert de phase, catalysée C-3 glycosylation et homogène Ag OTf promu C-7 glycosylation dans CH₂Cl₂.

Alors que d'autres études antérieures (**Tundis et al.,2002**) sur les parties aériennes de *P. calabrica* ont trouvé d'autres composés tels, phytol, β-sisterol, plusieurs anthraquinones, des pigments de naphtalene Quercétine 3-O- [α-L-rhamnopyranosyl- (1 → 2) -α-L-arabinopyranoside] -7-O-β-D-glucopyranoside (calabricoside A).

3. Corrélation entre les antioxydants et les activités antioxydante et antiradicalaire des extraits de *P. calabrica*

En vue de rationaliser les propriétés antioxydantes et antiradicalaire de *P. calabrica* en fonction de leurs constituants bioactifs, une matrice de corrélation est réalisée.

La matrice de corrélation (tableau VI) montre la présence de corrélations entre divers paramètres. Des interactions positives et négatives sont observées entre les différents paramètres.

L'analyse de corrélation est réalisée à trois différents niveaux de signification : $p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$

Tableau IV: Coefficients de corrélation des composés phénoliques totaux, flavonoïdes, tannins et activités antioxydante et antiradicalaire de *P.calabrica*.

	Composés phénoliques totaux	Flavonoïdes	Tannins	Pouvoir réducteur (EC50)
Flavonoïdes	0,98***			
Tannins	0,85***	0,85***		
Pouvoir Réducteur (EC50)	-0,59*	-0,61*	-0,12	
DPPH (EC50)	-0,53*	-0,56*	-0,06	1,00

(*) Corrélation significative ($p < 0,05$) (***) Corrélation hautement significative ($p < 0,001$)

Les corrélations les plus marquées sont obtenues entre les composés phénoliques, les flavonoïdes et tannins. Les composés phénoliques montrent des corrélations très hautement significatives avec les flavonoïdes ($r = 0,98$), tannins ($r = 0,85$). Les flavonoïdes constituent un groupe très important parmi les composés phénoliques, la présence des groupements hydroxyles libres dans leur structure, leur confère la capacité à piéger les radicaux libres (Pokorny et al., 2001).

Les EC₅₀ des deux activités antioxydante et antiradicalaire (Pouvoir réducteur et inhibition du DPPH) de *P. calabrica* sont inversement proportionnel au EC₅₀ des composés phénoliques, flavonoïdes et tannins. Pouvoir réducteur (EC50) avec les composés phénoliques ($r = -0,59$), flavonoïdes ($r = -0,61$) et tannins ($r = -0,12$). L'inhibition du DPPH avec les composés phénoliques donnent des corrélations ($r = -0,53$), flavonoïdes ($r = -0,56$) et

tannins ($r=-0.06$), ces résultats montrent que les extraits contenant de fortes teneurs ont une forte activité : plus la teneur est importante moins le EC50 et donc plus forte activité.

Le coefficient de corrélation entre le pouvoir réducteur et inhibition du DPPH est de $r=1$: cela s'explique par le fait que l'ordre des performances des extraits que ce soit pour le pouvoir réducteur ou l'inhibition du DPPH est le même.

Conclusion

Dans le présent travail, l'aspect phytochimique et l'activité antioxydante de *Putoria Calabrica* sont étudiés.

L'extraction et le dosage des caroténoïdes et des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins condensés) de la partie aérienne de la plante en fonction de quatre solvants (éthanol 70%, méthanol 70%, acétone 70% et éthyle acétate), a permis d'obtenir des teneurs conséquentes. L'éthanol présente la meilleure extraction de ces composés suivi de méthanol cependant l'extraction par l'acétate d'éthyle a donné des résultats très faibles.

L'activité antioxydante des différents extraits de *Putoria Calabrica* est évaluée par deux méthodes : la méthode de réduction de radical libre DPPH et la méthode de réduction de fer ferrique (pouvoir réducteur). Les résultats ont montré que ces derniers sont efficacement inhibée par les extraits testés. En effet, la capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans les extraits les plus polaires, il s'agit en occurrence de l'éthanol suivi du méthanol par contre l'extrait acétylique a révélé des activités faibles.

Ce pouvoir antioxydant est dû à la présence des composés actifs pour chaque extrait tel que les flavonol (calabricoside A et B), irodoides et lignanes.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydantes et antimicrobienne des extraits de cette plante

Références bibliographiques

A

- Allain P.** (1996). Les médicaments. Editions ESTEM, Paris, 414 p.
- Anthoula A.** (2003). The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal, Drug Information Journal, 34, 15-23.
- Anonyme 1.** File:Putoria calabrica.jpg commons.wikimedia.org.
- Anonyme 2.** <https://www.google.com/intl/fr/earth>.
- Arnaud M.** (2016). Systématique de la tribu des Ixoreae A. Gray Rubiaceae: phylogénie, biogéographie et taxinomie) Journal home, 26, 216-348.
- Attou A.** (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain T'émouchent. Thèse de doctorat, université de Batna : 26-86.
- Augustin D.** (2007). Influence de blanchiment sur les caroténoïdes : *Dioscorea schimperiana* université de Douala-maitrise : 32-98.

B

- Backlund M., Oxelman, B., et Bremer B.** (2000). Phylogenetic relationships within gentianales based on ndhF and rbcL sequences, with particular reference to the Loganiaceae. Journal Bot, 87, 1029-1043.
- Bahorun R.** (1997). Native phytotherap among rural population of District Bhadrak, Orissa, in Ethnobiology in human welfare. Deep publications, New Delhi: 163-153P.
- Bathily D.** (2002). Etude de deux plantes à activité antioxydante au Mali : *Lannea velutina* A. Rich. (Anacardiaceae), *Psorospermum guineense* Hochr (Hypericaceae). Thèse de pharmacie, FMPOS, Bamako, n° 5, 73 p.
- Benedir A.** (2012). Recherche de composés à activité antiplasmodiale à partir de la biodiversité malgache. Thèse de doctorat université PARIS-SUD : 65.
- Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Blanco I., Hoffmann T., Martin H., Mayer B., Noack P., Ruck C., Schmidt M., Schu"lke I., Sell S., Ernst H., Haremza S., Seybold G., Sies H., Stahl W. et Walsh R.** (2001). Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of carotene in antioxidant functions. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85, 12-42.
- Borel P., Drai J., Faure H., Fayol V., Galabert C., Laromiguière M. et Moël G.** (2005). Données récentes sur l'absorption et le catabolisme des caroténoïdes. Annales de Biologie Cliniques. 63 (2) : 165-77. 81: 559-568.

C

Calvet R. (2005). Les pesticides dans le sol, Ed Masson. France Agricole ,123P.

Chavan F., Shahidi M., et Naczk. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *J. Food Chem.* Vol. 75. (2001). P 509-512.

Ceconi ., Boraso A ., Cargnoni A .et Ferrari R. (2003). Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 420, 217-221.

Cheng, S.Y., Wen, Z.H., Wang, S.K., Chiou, S.F., Hsu, C.H., Dai, C.F., and Duh, C.Y., (2009). Anti-inflammatory cembranolides from the soft coral *Lobophytum durum* *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1 0.1016, 04-053.

CCE. (2003) .Commission des communautés européennes. Décision de la Commission du 5 juin 2003 relative à l'autorisation de mise sur le marché de "jus de noni" (jus du fruit de *Morinda citrifolia* L.) en tant que nouvel ingrédient alimentaire, en application du règlement (CE) n° 258/97 .du Parlement européen et du Conseil (2003/426/CE). Journal officiel n° L 144.

CNDRB. (2012).Centre national de développement des ressources biologique .Base de données inventaire biologique.

Cynthal Q., et Fraisier. (2008). Evolution and systematics of the angiosperms order, gentianales with an in depth focus on loganiaceae an species rich and toxic genus stychnos. Edition manov P535.

D

Daayf F. et Lattanzio B. (2008). Recent Advances in Polyphenol Research 1, Ed: Wiley Black well, p1- 24.

Delaveau G. (1987). Les plantes dans la thérapeutique moderne, 2ème édition révisée, Ed. Maloine éditeur, P31.

Djeridane A.,Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D.,Stocker P., etVidal P.(2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry.* 97: 654–660.

Donatien M. (2009). Enquête ethnobotanique des six plantes maliennes : extraction identification d'alcaloïdes : caractérisation quantification des polyphénols : étude de leur activité antioxydantes .Thèse de doctorat de l'université de METZ, P84.

Dupont J., et guignard H. (2007) .Botanique systématique moléculaire .Université de Metz .14^{ème} édition Masson .P323.

Duthie k. (2003). Antioxidants. Nutrition and coexisting 48: 25-26.

E

Ellis. (2001). Inhibition of tumour evasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. Int. J. Exp. Path. 82, 309-316.

Eva B., Nikolett S., Tam A., Rita C. (2016). Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three Coffea species. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.72, 109-306.

G

Ghabrier Y. (2010) .Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France) : 165.by different solvents. J. Food Chem. p. 509-512.

Girotti-C. (2006). Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea Debilis*. Université de Lyon.P87.

Goetz T., et Le Jeune B. (2011) Phytothérapie. *Asperula odorata* L., (partie aérienne de Asperule) Food Chemistry 2 9 :185–188.

Gulcin I., Oktay M., Aslan A.J et Ethna A.J. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen. Food Chemistry. 97: 325.

Guy. (1988) .Organisation et classification de la plante vasculaire. Tome II .Université René Descartes de Paris .Edition SEDES. P511.

H

Hagerman A., et Butler L. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology*. 15 (6): 1795-1810

Hamza. (2011).Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Maerua angolensis* DC. (Capparidaceae). Thèse de pharmacie, FMPOS, Bamako.P61

Heim K., Tagliaferro A., et Bobilya D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*.13: 572-584.

Haslam E. (1998). Practical polyphenols: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, Cambridge, UK.p65.

He J., et Giusti M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. Annual Review of Food Science and Technology, 1, 163-187.

J

Jean et Pierre. (2010). café, le thé, chocolat, bienfait pour le cerveau et pour le corps. Edition Odil Jacob. P234.

K

Kabore Z., Guisso L., et Sovrabie s. (1995). Etude pharmaco-chimique de Nauclea Latifolia: Relation "Principes chimiques et Activité antimicrobienne". Thèse de doctorat De l'institut de Recherche sur les Substances Naturelles (I.R.S.N.) OUAGADOUGOU. P89.

Kungl. Tekniska högskolan. (1987). Production of Emetine from Cephaelis Ipecacuanha in Nicaragua.

L

Lapie G. (2010) Flore forestière illustrée : Comprenant toutes les espèces ligneuses de l'Algérie et les espèces ligneuses les plus répandues en Tunisie, au Maroc France University of British Columbia Library. P234.

Leflouch E., Lotfy B., et Erol V. (2010). Catalogue synonymique de la flore tunisienne. p306.

Lim Y., Lim, T., et Tee J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. Food Chemistry 103, 1003-1008.

Lionel D. (1999). Pharmacopée caribéenne Edition I: Emil Desermeaux. p 21.

Louis P. (2004). The rps16 intron and the phylogeny of the (Rubiaceae), Plant Systematics. P344.

M

Madhu C., Upendra S., Neeraj K., Bikram S. et Satwinderjeet K. (2012). Antioxidant activity and identification of bioactive compounds from leaves of Anthocephalus cadamba by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry Department of Botanical and Environmental Sciences, Guru Nanak Dev University, Amritsar-143005. India Natural Plant Products Division, CSIR-Institute of Himalayan Bioresource Technology (Council of scientific and Industrial research), Palampur, journal of pharmacy research 7: (2013) 139-14.

Marie de Paris et Wilaya d'Alger, (2012) .Guide illustré de la flore Algérienne.

Description native des plantes algérienne .N° ISBN : 978-2-7466-4242-3.P

Marouf A. et Reynaud J. (2007). La Botanique A-Z. Ed. Dunod, Paris: 233p.

Mohammedi M. (2005). Antioxidants from the bark of *Burkea africana*, an African medicinal plant. *Phytotherapy research*.16: 148-150.

Moldovan M., et Hodişan T. (2004). Spectrophotometric determination of total polyphenols in *Tagetes patula*. *Seria F Chemia*. 71: 83-88.

Mouhssen M. (2004). Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite. Thèse, Pharmacie, FMPOS, Bamako, n° 14, 145 p.

N

Nicolas H. (2016). Les rubiales, Encyclopédie Universalis.

Nkhili E. (2009). Polyphenols de l'alimentation : Extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Université d'Avignon et des pays de vaucluse école doctorale 306 – sspa, Montpellier et université cadi ayyad - faculté des sciences Marrakech. P. 1-318

N'Guessan A., Deliko C., et Bekro Y. (2011). Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la thérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Génie Industriel*. 11: 55-61.

O

Odabasoglu F., Aslan A., Cakir A., Suleyman H., Karagaz Y., Malicim. et Bayir Y., (2004). Comparaison of antioxydant activity and phenolic contents of three lichen species. *Phototherapy Research*. 18: 38-941.

P

Perez-Bonilla M., Salido S., Teris A. Van B., Pablo J., Linares-Palomino, Altarejos J., Noguera M., Sanchez A., (2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Ole europaea*) wood. *Journal of Chromatography*.1112 : 311-318.

Perret C. (2001). Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*. Thèse de doctorat : Neuchâtel : Université de Neuchâtel-Institut de chimie. PP184.

Q

Quezel P.,et Santa G. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Centre National de la Recherche Scientifique C.N.R.S.

R

Rao A. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. 55: 207–216.

Ribereau G. (1968). Notions générales sur les composés phénoliques. In « Les composés phénoliques des végétaux ». Ed Dunod : 1-27.

Richter G. (1993). Composés phénoliques. In : Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. Ed. Française .PP.317-319.

S

Sanago R. (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako (Mali): 53.

Sass-Kiss A., Kiss j., Milotay P., Kerek M.M., Toth-Markus M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruit and légumes. *Food reseach international*, 20:1023-1029.

Sebastien F. (2006). Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Journal*. 2 4:318–324.

Sristisri U. (2013). Screening of phytochemicals, nutritional status, antioxidant and antimicrobial activity of *Paederia foetida* Linn. From different localities of Assam, India Dept. of Life Sciences, Dibrugarh University, Dibrugarh 786004, Assam, India Dept. of Life Sciences, Dibrugarh University, Dibrugarh 786004, Assam, India. *journal of pharmacy research*. 7 :139–14.

Suthagar P., Roziahanim M., Amin M., Zeyad D. (2012). Antioxidant and antiangiogenic activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. journal

Vela M. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. 97: 654–660.

Velioglu S., Mazza G., Gao L. et Oomah D., (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruit, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 46: 4113-4117.

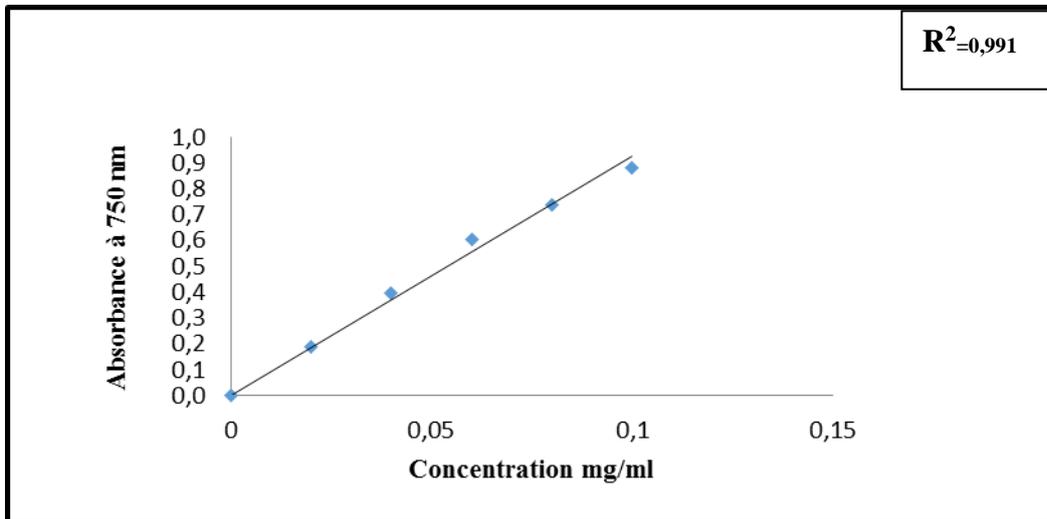
Vermerris W., et Nicholson R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. USA.Springer. New York, ISBN-10-14020-5164-6.

W

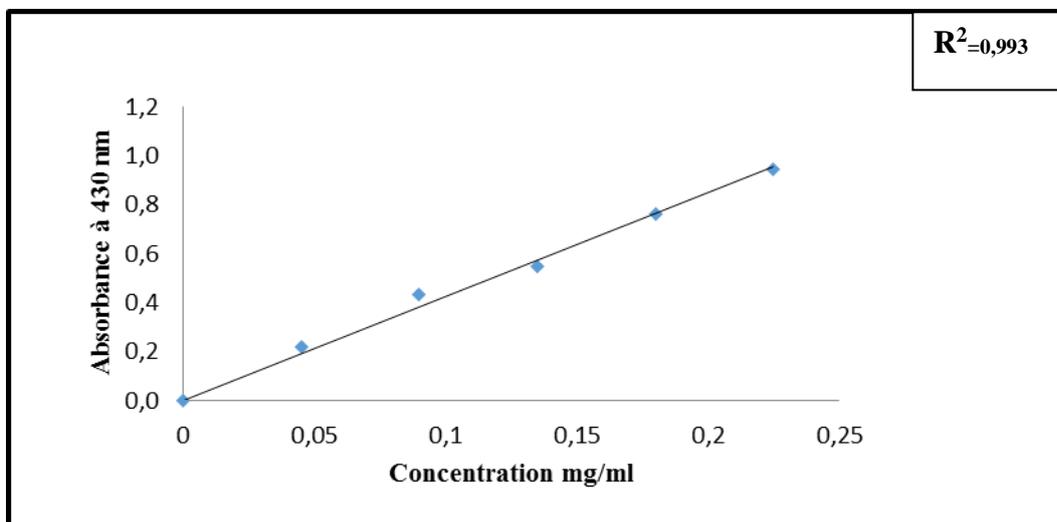
W-Yang H., Yi-Zhong C., Harold C. et Mei S. (2009) .Survey of antioxidant capacity and nutritional quality of selected edible and medicinal fruit plants in Hong Kong *Journal of Food Composition and Analysis journal* .

Annexes

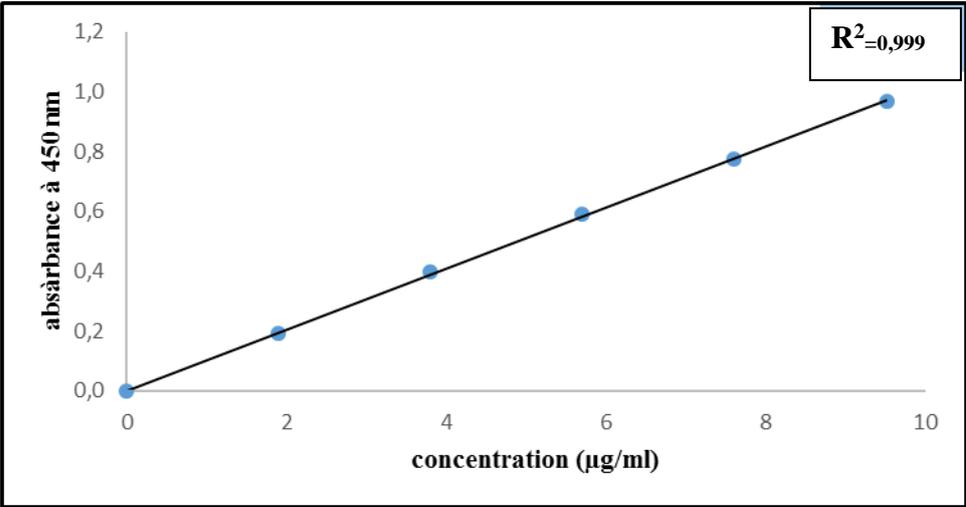
Annexe I : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la quantification des polyphénols



Annexe II : Courbe d'étalonnage de la quercitine pour la quantification des flavonoïdes



Annexe III : Courbe d'étalonnage de la β carotène pour la quantification des caroténoïdes



Résumé

Putoria calabrica est un arbuste à localisation méditerranéenne de la famille des Rubiaceae. Le but de ce travail est d'estimer la teneur en composés phytochimique et d'évaluer *in vitro* l'activité antioxydante de quatre extraits de la partie aérienne de la plante obtenus par différents solvants : éthanol 70%, méthanol 70%, acétone 70% et éthyle acétate.

Les essais phytochimiques ont montré la présence d'une forte teneur en caroténoïdes (724,75 µg EBC/g) et un effet solvant ; comparé aux autres solvants, le solvant éthanol 70% est plus performant extracteur d'antioxydants. En effet, les teneurs les plus élevées en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et tannins sont obtenues dans l'extrait éthanolique et qui sont respectivement de l'ordre de 210,06 mg EAG/g, 123,78 mg EQ/g, 69,04 mg EC/g.

L'évaluation des activités antioxydante et antiradicalaire on révélé également une différence significative entre les extraits. Les plus fortes activités sont aussi obtenues avec l'extrait éthanolique dont les valeurs respectives sont $EC_{50}=1,55$ mg/ml et $EC_{50}=0,73$; ces valeurs sont assez proches de celles des standards BHA et quercétine. Cela confirme que *Putoria calabrica* pourra être une source d'antioxydants naturels.

Mots clés : *Putoria calabrica*, Rubiaceae, phytochimie, activité antioxydante.

Abstract

Putoria calabrica is a shrub with Mediterranean location of the family Rubiaceae. The aim of this study is to estimate the content of phytochemical compounds and evaluate *in vitro* antioxidant activity of four extracts of the aerial part of the plant obtained by different solvent: 70% ethanol, 70% methanol, 70% acetone and ethyl acetate.

Phytochemicals tests showed the presence of a high carotenoid content (EBC 724.75 mcg / g) and a solvent effect; compared to other solvents, the ethanol solvent is 70% more efficient extraction of antioxidants. Indeed, the higher levels of total phenolic compounds, flavonoids and tannins are obtained in the ethanoic extract and which are respectively of the order of 210.06 mg EAG / g, 123.78 mg EQ / g, 69, 04 mg CE / g.

Evaluation of antioxidant and antiradical activities is also found a significant difference between the previews. The highest activities were also obtained with the ethanol extract of which the respective values are $EC_{50} = 1.55$ mg / ml and $EC_{50} = 0.73$); these values are quite close to those of BHA and quercetin standards. This confirms that *putoria calabrica* may be a source of natural antioxidants.

Key words : *Putoria calabrica*, Rubiaceae, phytochemistry, antioxydant activity .