

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen-**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences**  
**De la terre et de l'univers**  
**Département de biologie moléculaire et cellulaire**



**Laboratoire de recherche**

**« Antibiotiques, Antifongiques, Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique »**

**Option: Biochimie appliquée**

**Mémoire de master Biologie**

**Évaluation de l'activité antioxydante de quelques extraits de la  
racine de *Bryonia dioica* :**

**Présenté par: M<sup>lle</sup> MECHERNENE Bekhta**

**Soutenu le : 28 juin 2014**

**Devant les jury :**

**Présidente : M<sup>lle</sup> Benariba .N (Maitre de conférence B)**

**Examineur : M<sup>r</sup> Azzi .R (Maitre de conférence B)**

**Promoteur : M<sup>r</sup> Djaziri .R (Professeur)**

**Année Universitaire 2013-2014**

## Résumé

Notre travail vise à étudier le pouvoir antioxydant des extraits de racines broyées de *Bryonia dioica*, une cucurbitacée récolté de la région de Becher.

Les extraits préparés à partir des racines broyées de *Bryonia dioica* par une extraction sous reflux a révélé un rendement variable dont le plus important est celui de l'extrait Eau-acétone (17.58%). Les tests phytochimiques permet de détecter la présence des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes des saponines triterpéniques.

Les dosages des polyphénols et flavonoïdes ont révélé des teneurs de 29,14 et 14,7 pour l'extrait aqueux(AQ), 242,77 et 62,02 pour eau-méthanol (EM), 177,08 et 20,13 pour eau-acétone (EA), 393,49 et 101,87 pour acétate d'éthyle (AE1), 272,45 et 76,67 pour acétate d'éthyle (AE2), 565,52 et 49,47 pour n-butanol (n-B1), et l'extrait n-butanol (n-B2) avec 275,73 µg.Eq acide gallique /mg d'extrait et 47,57µg.Eq cathéchine /mg d'extrait respectivement.

Concernant l'activité antiradicalaire des différents extraits, les résultats obtenus montrent des IC<sub>50</sub> qui varient entre 147µg/ml pour l'extrait aqueux (AQ), 60 µg/ml pour eau-méthanol (EM), 67,9 µg/ml pour eau-acétone (EA), 46,53 µg/ml pour acétate d'éthyle (AE1), 18,49 µg/ml pour acétate d'éthyle (AE2), pour n-butanol 24,92 µg/ml (n-B1), et 117 µg/ml pour l'extrait n-butanol (n-B2).

**Mots clés :** *Bryonia dioica*, polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, activité antioxydante, DPPH.

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Matériels et méthodes</b>	
1. Extraction.....	13
1.1 Matériel végétale.....	13
1.2 Dégraissage de la matière végétale.....	14
1.3 Préparation de l'extrait aqueux.....	14
1.4 Préparation de l'extrait eau-méthanol.....	14
1.5 Préparation de l'extrait eau-acétone.....	14
1.6 Préparation de l'extrait acétate d'éthyle .....	15
1.7 Préparation de l'extrait n-butanol .....	16
2-Les tests phytochimiques.....	17
3-Dosage de polyphenols et flavonoïdes totaux.....	19
3.1 Dosage de polyphénols totaux .....	19
3.2 Dosage de flavonoïde totaux.....	20
4- Chromatographie sur couche mince.....	22
4.1 Principe de la méthode.....	22
4.2 Mode opératoire.....	22
4.2.1 Préparation des extraits.....	22
4.2.2 Choix de la phase mobile.....	23
4-3 Révélation.....	23
5- Evaluation de l'activité antioxydante par DPPH.....	23
5.1 Principe de la méthode.....	23

5.2 Mode opératoire.....	23
5.3 Expression des résultats.....	24
3.1 Pourcentage de réduction du DPPH.....	24
3.2 Détermination IC <sub>50</sub> .....	24

## **Résultats**

1-Extraction.....	26
2-Les tests phytochimiques.....	26
3- Dosage des polyphénols et flavopnoïdes totaux.....	27
4- Chromathographie sur couche mince.....	28
5- Le povoir réducteur de <i>Bryonia dioica</i> .....	30
6- Discussion.....	43
7- Conclusion.....	47
Références bibliographiques.....	48

## Liste des figures

**Figure 01** : Schéma de feuilles, fleurs et fruits de *Bryonia dioica*.

**Figure 02** : Les racines de *Bryonia dioica*.

**Figure 03** : Montage de dispositif du dégraissage des racines de *Bryonia dioica*.

**Figure 04** : Extraction sous reflux des racines de *Bryonia dioica*

**Figure 05** : Rotavapor : évaporation à sec des extraits organiques.

**Figure 06** : schéma explicatif de la préparation des extraits.

**Figure 07** : Courbe étalon de l'acide gallique

**Figure 08** : Courbe étalon de la catéchine

**Figure 09** : Les plaques de tous les systèmes sous l'UV

**Figure 10** : pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.

**Figure 11** : pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait aqueux

**Figure12** : pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait Eau/méthanol

**Figure 13** : pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait Eau/acétone

**Figure14** : pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait EM acétate d'éthyle

**Figure15**: pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait EA acétate d'éthyle

**Figure16** : pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait EM n-but

**Figure17** : pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait EA n-but .

## Liste des tableaux

**Tableau 01** : Activité antioxydante *in vitro* de certains extraits de plantes médicinales.

**Tableau 02** : Dosage des polyphénols totaux.

**Tableau 03** : Dosage des flavonoïdes totaux.

**Tableau 04** : les systèmes utilisé en CCM sur gel de silice

**Tableau 05** : Caractéristiques des extraits préparés à partir des racines de *Bryonia dioica*

**Tableau 06** : Résultats des tests phytochimiques des extraits des racines de *Bryonia dioica*

**Tableau 07** : Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *Bryonia dioica*

**Tableau 08** : Les résultats obtenus par la séparation par le CCM

**Tableau 09** : Pourcentage de réduction du DPPH par l'acide ascorbique

**Tableau10** : Pourcentage de réduction du DPPH par les extraits aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, EM acétate d'éthyle, EA acétate d'éthyle, EM n-butanol, EA n-butanol.

**Tableau11** : IC<sub>50</sub> des extraits : aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, EM acétate d'éthyle, EA acétate d'éthyle, EM n-butanol, EA n-butanol et l'acide ascorbique

## Liste des abréviations

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

B.H.T : Butylhydroxytoluène

B.H.A : Butylhydroxyanisole

GSH : glutathion réduit

SOD : Le superoxyde dismutases

ERO : espèce réactive de l'oxygène

O<sub>2</sub><sup>·-</sup> : oxygène singulet

OH<sup>·</sup> : Le radical hydroxyle

ROO<sup>·</sup> : Le radical peroxyde

ADN : Adénosine désoxy-rubo nucléotide

GPx : Glutathion peroxydase

CAT : Catalase

TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate

VIH : human immunodeficiency virus

EM : Extrait eau-méthanol

UV : ultra violet

IC 50 : Concentration inhibitrice de 50% d'une activité

Da : dalton

AQ : extrait aqueux

EM : Eau/méthanol

EA : eau /acétone

AE1 : acétate d'éthyle eau/méthanol

AE2 : acétate d'éthyle eau/acétone

N-B1 : n-but eau/méthanol

N-B2 : n-but eau/méthanol

$\text{AlCl}_3$  : Chlorure d'aluminium

CCM : chromatographie sur couche mince

Rdt : rendement

# Introduction

Les cellules peuvent être soumises à une grande variété d'agression physique (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [Walker et al, 1982].

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Celle-ci est variable selon la nature du radical. En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l'O<sub>2</sub>. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène dont les plus importants sont l'oxygène singulet (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le radical hydroxyle(OH<sup>•</sup>) et le radical peroxy (ROO<sup>•</sup>), mais également les composés non radicalaires comme ROOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et IO<sub>2</sub> [Milane, 2004]. Ces dernières sont utilisées par les cellules phagocytaires de l'organisme (les macrophages) pour combattre les agents infectieux tels que les bactéries et les virus. Toutefois, les bienfaits de ces composés hautement toxiques ne restent pas sans conséquence principalement pour les structures biologiques des cellules (protéines, lipides, ADN) [Bossokpi, 2002].

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène [Gauche et Hausswirth, 2006]. Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie [Aurousseau, 2002]; des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées [Milane, 2004 ; Van Antwerpen, 2006]; ainsi que l'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et les rayonnements [Tamer, 2003]. Un déséquilibre entre la production de radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif [Pincemail et al, 1999; Pincemail et al, 2000].

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre le système de défenses des antioxydants et la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) [Sayre et al, 2008; Bloomer et al, 2008; Power et al, 2010]. Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense des antioxydants est surmené par l'augmentation des oxydants

ou lorsque les défenses sont affaiblies suite à une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants [Kirschvink et al, 2008]. Cela entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique [Stadtman et al, 1998; Halliwell, 1999; De-Zwart, 1999].

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications [Favier, 2003]. Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers [Cohen et al, 2000; Packer et Weber, 2001]. Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux [Favier, 2003].

Pour contourner les dommages causés par les ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants, ces derniers présentant à des faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, sont défini comme toute substance ayant la capacité de contrôler, retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible [Halliwell et Gutteridge, 2007; Tang et Halliwell, 2010 ].

Les antioxydants sont des agents qui réagissent facilement avec les substances oxydantes pour les inactiver et les éliminer, ou diminuer leur production. Ils peuvent être hydrophobes ou hydrophiles.

Les agents hydrophobes constitués par les vitamines A, E, les flavonoïdes, l'ubiquinol (Coenzyme Q10), la bilirubine, la mélatonine, qui agissent essentiellement sur la protection des milieux lipidiques.

les agents hydrophiles comme les glutathions, l'acide urique, la vitamine C, les thiols, les protéoglycans, l'acide hyaluronique qui protègent contre l'oxydation des lipides, des protéines, des sucres, et de l'ADN dans les milieux liquides comme le sang, les liquides interstitiels et le cytosol [Koolman et al, 1999; Benitez et al, 2002; Vergani et al, 2004].

Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des molécules à activité enzymatique (la glutathion peroxydase, la superoxydase dismutase, la catalase); et non

enzymatique à savoir les vitamines (A, C, E), les oligo-éléments (le sélénium) et les protéines (la ferritine) [Joël et al, 2002].

Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les superoxydes dismutases, la catalase et plusieurs formes de peroxydases à glutathion [Garrelet al, 2007; Jacobet al, 2006]. Les superoxydes dismutases (SOD) sont représentés sous trois isoformes à cofacteurs métallique (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie. Ils catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde ( $H_2O_2$ ) et en oxygène [Landis et Tower, 2005]. La catalase est une enzyme localisée essentiellement dans les peroxysomes. Elle permet de convertir deux molécules de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$  [Valko et al, 2006]. La glutathion peroxydase est une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) [Valko et al, 2006].

Concernant les antioxydants non enzymatiques, ce groupe renferme de nombreuses molécules endogènes synthétisées par les cellules (glutathion, l'acide urique, la bilirubine) dont la plus importante est le glutathion réduit (GSH), qui est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) connu par son puissant pouvoir antioxydant en protégeant non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes [Menon et al, 2007; Tang et al, 2006]. De plus, il existe des antioxydants d'origine exogène issus des apports alimentaires tels que : les caroténoïdes, vitamines et certains minéraux [Halliwell, 1991].

Les Caroténoïdes sont des pigments liposolubles de couleur jaune, orangée à rouge. Ils regroupent plus de 600 molécules différentes, elles interagissent avec les radicaux libres par trois mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical [El-Agamey et al, 2004]. Cette activité antioxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure [Mortensen et al, 2001]. Malgré la similarité de leur structure, ils exercent différentes fonctions biologiques, dont certains préviennent ou contrôlent efficacement la génération de radicaux libres. Dans cette classe, on retrouve principalement:

Le  $\beta$ -carotène (provitamine A) possède la capacité de capter l'oxygène singulet et se trouve dans les légumes verts, la salade, les carottes, les épinards, l'abricot, la papaye, le melon, le potiron et d'autres fruits jaunes.

Le lycopène, pigment rouge extrait de la tomate, piège les radicaux libres avec une efficacité supérieure d'au moins 70 % à celle du  $\beta$ -carotène. Il présente un grand intérêt du fait de ses propriétés antimutagènes.

La lutéine est concentrée dans la région maculaire de la rétine. Sa propriété antioxydante s'exerce au travers d'une fonction de filtre de lumière, de la lumière bleue et de capteur de l'oxygène singulet dans les tissus rétiniens, prévenant ainsi la dégénérescence, première cause de cécité chez la personne âgée [**Thierry, 2000**].

Concernant les vitamines, vitamine E (le tocophérol) est considéré comme le principal antioxydant attaché à la membrane, utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique. Durant la réaction antioxydante, le  $\alpha$ -tocophérol est converti en radical  $\alpha$ -tocophérol beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxy) [**Pryor, 2000; Valko et al, 2006**].

La vitamine C (l'acide ascorbique), ses propriétés antioxydantes sont attribuées à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton. Ce radical peut facilement s'oxyder en captant l'anion superoxyde et certaines espèces radicalaires (perhydroxyles et peroxyes) [**Valko et al., 2006, Van Antwerpen, 2006**].

La vitamine P intervient dans l'insuffisance veineuse par une diminution de la perméabilité et une augmentation de la résistance des capillaires. Elle agit par inhibition de la formation et de la libération de l'histamine; l'oxydation de l'adrénaline serait également empêchée. L'activité antiradicalaire de la vitamine P serait due à l'entité catéchol qui est un puissant capteur de radicaux libres. Elle est retrouvée dans le foie, la viande (volaille), le poisson, les fruits et légumes secs, les céréales [**Chevaley, 2000**].

Par ailleurs, les oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc présentent des propriétés antioxydantes avérées. En outre, le sélénium neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure) et aurait aussi une action préventive sur certains cancers [**Ahmet, 2003**].

Ces antioxydants exogènes sont aussi connus sous le nom des antioxydants naturels qui existent dans l'alimentation et les plantes médicinales. L'utilisation empirique d'antioxydants naturels est une pratique très ancienne pour la conservation des vivres. La recherche de nouveaux antioxydants naturels, connaît depuis ces dernières années un regain d'intérêt, car les antioxydants de synthèse actuellement utilisés, notamment le Butylhydroxytoluène (B.H.T) et le Butylhydroxyanisole (B.H.A) ne seraient pas dépourvus de

toxicité [Barlow, 1990]. Le butylhydroxyanisole BHT et BHA sont des antioxydants phénoliques synthétiques hautement actifs qui agissent en inhibant la chaîne de réactions d'initiation et en réduisant de la peroxydation des acides gras insaturés [Xiang et al, 2007]. Malgré la puissance de leur activité antioxydante, l'excès de ces antioxydants synthétiques peut être toxique, ils sont responsable des plusieurs mutagenicités et peut même présenter un danger sur la santé humaine [Williams, 1994]. De ce fait, la recherche de nouvelles molécules possédant des propriétés antioxydantes, se sont orientées vers les substances naturelles issues des plantes médicinales et aromatiques, qui se sont intensifiées ces dernières années [Sanchez-Moreno et al, 2009].

Les plantes médicinales sont des drogues végétales utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux, dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [Farnsworth et al, 1986]. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne [Elqaj et al, 2007]

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable d'antioxydants dont les polyphénols qui attirent plus l'attention regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquitaires que l'on retrouve dans les plantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes [Delattre et al, 2005].

Les composés phénoliques sont des substances très utilisées dans la médecine traditionnelle et moderne pour leurs activités antioxydantes [Rice-Evans et al, 1996 ; Kolesnikov et Gins, 2001]. Vu leurs propriétés redox les plus élevées, les polyphénols agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions [Cook et Samman, 1996; Valko et al, 2006]

La classe des composés phénoliques regroupe près de 8000 composés naturels; ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyl. Selon le nombre d'unités phénoliques présents, on les classe en composés phénoliques simples et polyphénols. Par abus, on les appelle indifféremment composés phénoliques ou polyphénols et comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les

flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignanes les lignines et les xanthones [Stalikas, 2007].

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques [Sandhar et al, 2011]. Leur capacité de donation d'hydrogène augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques. Cette caractéristique structurale peut être observée dans les flavonoles comme le kaempférol quercétine et myricétine où l'activité antioxydante est croissante en fonction du nombre des groupements OH dans la molécule [Le et al, 2007].

De plus, les tannins regroupent des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da qui présentent, à coté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [Haslam, 1996; Cowan, 1999]. Ces substances sont caractérisés par une saveur astringente et sont retrouvés dans toute les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [Scalbert, 1991]. Les tannins sont doués d'une grande capacité antioxydante due à leur noyau phénol [Pe ronny, 2005]. Elles ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation [Perret, 2001].

De même, les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antioxydant des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes [Mogod, 2005]. Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Isolées la première fois de *Coumarouna odorata*, aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les micro-organismes. Dans les plantes, on les rencontre dans les *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae* et *Solanaceae*. Du point de vue structural, on les classe en coumarines simples avec des substituants sur le cycle du benzène, les furanocoumarines, les pyranocoumarines, ceux substitués en position 3 et ou 4 et le dernier groupe serait celui des dimères [Smyth et al, 2009].

Actuellement, les antioxydants naturels présents dans les plantes médicinales feront l'objet de plusieurs recherches scientifiques suite à leur capacité de prévenir le stress oxydatif

qui est à l'origine de plusieurs maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et certains types de cancer. Parmi les plantes médicinales connues par leur activité antioxydante, nous citons quelques exemples. Le tableau ci-dessous résume l'activité antioxydante mesurée *in vitro* de certains extraits de plantes médicinales.

**Tableau 01:** Activité antioxydante *in vitro* de certains extraits de plantes médicinales.

Espèces	Partie utilisée	Extrait préparé	Effet antioxydant (réduction du DPPH)	Références
<i>Momordica dioica</i> ( <i>Cucurbitaceae</i> )	fruit	extrait méthanolique	Réduction de 81.73%	Bharathiet al, 2013
<i>Punica granatum</i> ( <i>Punicaceae</i> )	Ecorce	extrait aqueux	IC <sub>50</sub> = 0.094mg/ml	Ricci et al, 2006
<i>Portulaca oleracea</i> ( <i>Portulacaceae</i> )	Plante complète	extrait méthanolique	IC <sub>50</sub> = 12.67µg/ml	Sanja et al, 2009
<i>Alpinia rafflesiana</i> ( <i>Zingiberaceae</i> )	Fruit	6-Tetrahydrochalcone	IC <sub>50</sub> = 55µM	Habsah et al, 2004
<i>Disthemonanthus benthamianus</i> ( <i>Leguminosae</i> )	Feuille	extrait méthanolique	IC <sub>50</sub> = 4,50µg/ml	Bidie et al, 2011
<i>Moringa oleifera</i> ( <i>Moringaceae</i> )	Racine	extrait eau/méthanol (80%)	Réduction de 62.9%	Sultana et al, 2009
<i>Conocarpus erectus</i> ( <i>Combretaceae</i> )	Fruit	extrait n-butanol	IC <sub>50</sub> = 4µg/ml	El-Sayed et al, 2012

L'Algérie, connue par sa biodiversité et sa flore très diversifiée, est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules à propriétés antioxydantes. Plusieurs travaux se sont intéressés en vue de valoriser les vertus antioxydantes de la flore Algérienne, citant à titre d'exemple les travaux de **Djeridane et al, 2010** sur *Cleome arabica*, **El-Haci et al, 2013** sur *Anabasis aretioides* Coss et **Benariba et al, 2013** sur *Citrullus colocynthis*. Compte tenu de la variété et de la richesse de notre pays en plantes médicinales, il nous a semblé intéressant d'étudier une plante médicinale appelée *Bryonia dioïca*, déjà utilisée en médecines traditionnelle en Algérie pour le traitement des cancers [**Benarba et al, 2012**].

*Bryonia dioïca* «Berrestom» .Jacq, membre de la famille des cucurbitacées, on la nomme aussi Feuardent, Vigne du diable, Coulevrée, Rave de serpent et Vigne blanche. Le nom *Bryonia* vient d'un ancien nom grec, *bryo* veut dire pousser avec vigueur et *bryon* signifie la mousse. C'est une plante herbacée, vivace, à tiges très longues, grêles, grimpantes, pouvant atteindre 5 m de longueur. La racine est charnue, cylindrique, sur laquelle naissent des bourgeons se développant au printemps. Les feuilles sont en cœur à la base, pétiolées, simples, alternes, à 3 à 5 lobes aigus, sinués, dentés. Les fleurs sont de couleur jaune verdâtre ou blanc jaunâtre, veinées, groupées au sommet de rameaux florifères allongés. Le fruit est une petite baie de 7 à 8 mm d'épaisseur, globuleuse, lisse de couleur rouge à maturité contenant deux à six graines aplaties [**Garnier et al, 1961**].

C'est une plante originaire des régions de l'Europe centrale et méridionale, Asie occidentale et l'Afrique septentrionale. Elle est très commune en France en Corse. Elle se rencontre dans les haies, les buissons et dans des parcelles non ou mal désherbées [**Caubet et al, 2012**].

En médecine traditionnelle, l'utilisation populaire ancienne de *Bryonia dioïca* concerne les racines de cette dernière. En effet la racine est un abortif et purgatif, cette propriété purgative puissante résiderait principalement dans ses constituants résineux et alcaloïdiques [**Garnier et al, 1961**]. Le décocté des racines est utilisé contre la dysenterie [**Kahouadji, 1995**]. La teinture préparée à base des racines trouve son application contre la laryngite, trachéite, bronchite, pneumonie, pleurite, rhumatismes musculaires, polyarthrite aiguë ou chronique. De plus, l'application de la pulpe de la racine sur la peau est calmante, révulsive et remplace les sinapismes [**Schauenberg, 1977**]. Concernant les autres parties de la plante, les petites baies rouges sont employées comme purgatif et vermifuge

**[Bellakhdar, 1997]**. Le suc de la plante fraîche est utilisé, en usage externe, pour déterger les ulcères ainsi que dans le traitement de la gale **[Bammi et Douira, 2002]**.

La bryone figure dans la liste B des plantes médicinales inscrites à la pharmacopée européenne, c'est à dire que c'est une espèce dont l'évaluation du rapport bénéfice risque est négative **[Bruneton, 1999]**. Donc, c'est une plante très toxique comme certaines cucurbitacées. Le contact des racines fraîches avec la peau provoque des rougeurs, irritations et la formation de vésicules. L'ingestion de quelques fruits (moins de 10 chez l'enfant) induit des vomissements, des douleurs abdominales accompagnées de diarrhée. L'extrait de poudre de racines, injecté à large dose dans le sac dorsal de la grenouille conduit à la mort. De même, cet extrait produit de l'hypotension chez le chat et le chien, et améliore l'activité du cœur lorsqu'il est administré en petite dose. La bryonidine hétéroside triterpénique extraite des racines de *Bryonia dioïca*, introduite dans l'estomac, causerait une inflammation de celui-ci et de l'intestin. Introduite dans les veines elle provoque seulement une légère inflammation. Elle est sans effet sur le péristaltisme de l'intestin, sur l'activité du cœur, et sur les nerfs périphériques **[Garnier et al, 1961]**.

Les propriétés thérapeutiques de *Bryonia dioïca* sont liées à sa richesse en composés chimiques possédant des propriétés pharmacologiques potentielles. La racine renferme plusieurs hétérosides triterpéniques, les bryonosides A à G, le cabenoside D, le bryoamaride, bryodulcoside, bryoside, cucurbitacine, et la bryonidine **[Bruneton, 1999; Akihisa et al, 1994; Ukiya et al, 2002]**. Elle contient aussi une résine appelée la bryrésine et une saponine nommée la bryonine. Ainsi, la racine possède de l'acide malique, beaucoup de nitrates de potassium, une petite quantité d'huile essentielle de couleur jaune pâle, de l'amidon, des acides stéarique, palmitique, oléique, myristique, linoléique, un phytostérol et des alcools (bryono], alcool cérylique) **[Garnier et al, 1961]**.

La tige, la feuille ainsi que la racine englobent un alcaloïde amorphe, amer appelée la bryonicine, et les baies toxiques renferment un colorant caroténoïde : la lycopine **[Schauenberg, 1977]**. De plus, dans le fruit de la bryone, une protéine toxique a été découverte : la bryodifine, d'environ 66000 KDa **[Munoz et al, 1992]**.

*Bryonia dioïca* est très riche en substances actives (hétérosides triterpéniques, alcaloïdes, saponines et cucurbitacines) possédant des propriétés pharmacologiques thérapeutiques potentielles.

Les travaux d'**Ukiya et al, en 2002**, réalisés sur un extrait des racines de *Bryonia dioïca*, testés sur des souris possédant une inflammation auriculaire qui a été induite par le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), ont montré que cet extrait renferme une

activité anti-inflammatoire constaté par des  $ID_{50}$  de 0.2 à 0.6 mg par oreille. Cela peut attribuer aux bryonosides que possède la racine de la bryone.

Ainsi, l'extrait aqueux des racines de la bryone induit une apoptose dans les lignées de lymphome de cellules de Burkitt BL41. Les flavonoïdes, les stérols et les triterpènes détectés pourraient être responsables de la cytotoxique et activités apoptogènes de l'extrait aqueux de *Bryonia dioica*. Ces résultats suggèrent que *Bryonia dioica* pourrait être considéré comme une source prometteuse pour le développement de nouveaux traitements contre le lymphome de Burkitt [Benarba et al, 2012].

De plus, l'activité antivirale de cette plante est élucidée par Wachinger et al, en 1993 qui ont montré que la bryodine inhibe sélectivement la croissance des lymphocytes T infectés par le VIH à la concentration de 2-20  $\mu\text{g/ml}$  et diminue de la production de VIH dans les cellules survivantes.

De même, Une seconde étude menée à tester les bryodines 1 et 2, protéines extraites des racines de bryone, a révélé la capacité de ces derniers d'inactiver les ribosomes [Gawlak et al, 1997].

Concernant l'activité antioxydante de *Bryonia dioica*, les résultats obtenus au cours des travaux résumés ci-dessous ont présenté un effet antioxydant variable en fonction de la partie utilisée (racine, partie aérienne) ainsi que l'extrait préparé.

Selon la bibliographie, l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des tiges, feuilles et fleurs de *Bryonia dioica* a révélé des  $IC_{50}$  de 321.41; 79.54 et 23.17  $\mu\text{g/ml}$  respectivement [Bagher Gholivand et Piryaei, 2012]. Cela est probablement lié à sa richesse en polyphénols et flavonoïdes, comme le montre les études réalisées par Barreira et al, 2013 qui ont déterminé quarante polyphénols dont 9 flavonols et 5 flavones dans les fruits de *Bryonia dioica*.

Le peu de travaux effectués sur cette plante, que ce soit pour l'activité antioxydante ou l'étude des composés phénoliques, nous a encouragé à l'étudier en ce qui concerne son pouvoir antioxydant afin d'enrichir les connaissances sur les activités biologiques de cette plante. Pour cela, au cours de notre étude; nous envisageons de tester l'activité antioxydante de quelques extraits de racines de *Bryonia dioica*, de ce fait la partie expérimentale de notre étude se déroulera comme suit:

- ❖ La préparation de différents extraits à partir de racines broyées de la bryone sous reflux: extraits aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, acétate d'éthyle et n-butanol, ces deux derniers sont récupérés à partir de la phase aqueuse de l'extrait eau-méthanol et eau-acétone après une extraction liquide-liquide.

- ❖ Les extraits préparés feront l'objet des tests phytochimiques afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines familles chimiques: les tanins, les flavonoïdes, les terpenoïdes, les saponosides, les coumarines, les alcaloïdes, les quinones libres, les anthraquinones et les sucres réducteurs.
- ❖ Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux dans les différents extraits; ceci afin de déterminer leur pourcentage.
- ❖ La mesure de l'activité antioxydante des extraits (aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, acétate d'éthyle et n-butanol) *in vitro* en mesurant le pourcentage d'inhibition du (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) DPPH.

Cette méthode spectrophotométrique est largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante des composés naturels ou extraits de plantes. Le 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical stable qui se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution. C'est une méthode qui présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide [Lee et al, 1998; Bozin et al 2008].

# **Matériels et méthodes**

L'objectif de cette présente étude réalisée au sein du laboratoire de recherche « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » du département de Biologie, est de mesurer le pouvoir réducteur de quelques extraits préparés à partir des racines broyées de *Bryonia dioica* *in vitro* sur DPPH, après avoir déterminé leur taux en polyphénols et flavonoïdes totaux. Pour cela, notre étude est réalisée comme suite :

- 1- Préparation des extraits: aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, en plus des fractions acétate d'éthyle et n-butanol;
- 2- Réalisation des tests phytochimiques;
- 3- Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux ;
- 4- Chromatographie sur couche mince CCM ;
- 5- La mesure du pouvoir réducteur des extraits *in vitro* en mesurant le pourcentage d'inhibition du DPPH.

## 1-Extraction :

### 1-1- Récolte de la plante :

*Bryonia dioica* «Berestom», a été récolté à maturité durant le mois de juin et le mois de juillet 2012 dans la Wilaya de Béchar, Sud Ouest algérien. Le matériel végétal ainsi récolté, est ensuite identifié au sein de « laboratoire d'Ecologie et Management des Ecosystèmes Naturels ». Dans notre laboratoire, les racines sont triées, coupées en petit morceau et séchées à l'air libre pendant quelques semaines, puis notre matière végétale a été réduite en poudre à l'aide d'un mortier, puis conservée soigneusement, à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'au jour de la préparation des extraits.



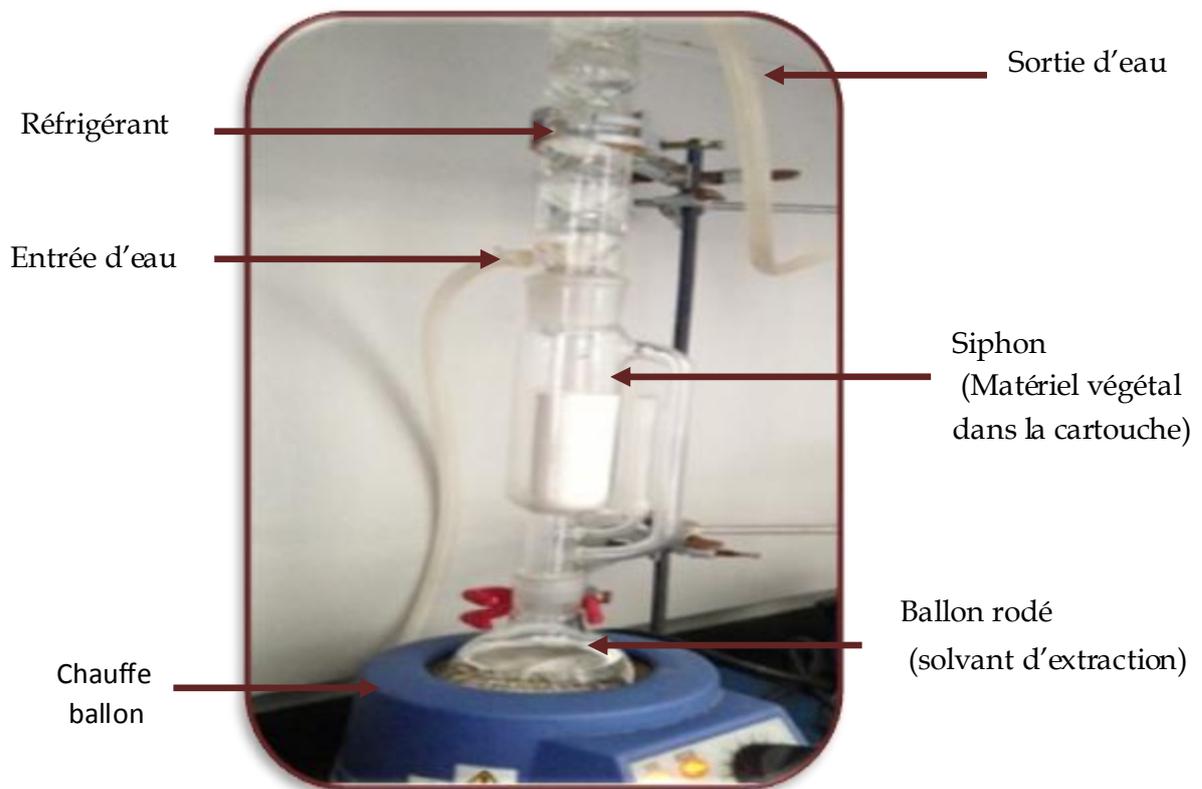
**Figure 1** : Schéma de feuilles, fleurs et fruits de *Bryonia dioica*.



**Figure 2** : Les racines de *Bryonia dioica*.

**1-2- Dégraissage du matériel végétal :**

Afin de déterminer le taux de lipides dans les racines de *Bryonia dioica* nous avons procédé à un dégraissage du matériel végétal (racines broyées) en utilisant le soxhlet pendant 3 heures en présence d'hexane.



**Figure 3** : Montage de dispositif du dégraissage des racines de *Bryonia dioica*.

**1-3- Préparation d'extrait aqueux (AQ):**

L'extrait aqueux est préparé à partir des racines broyées de la bryone, dont le protocole d'extraction est comme suite :

- ◆ Extraction solide-liquide de 10g de racines broyées en présence de 100 ml d'eau distillée, sous reflux et à chaud pendant 3 heures (**figure 4**) ;
- ◆ Filtration de la solution et récupération du filtrat;
- ◆ Evaporation à sec du filtrat dans l'étuve (35° C);
- ◆ Récupération du produit sous forme de poudre.

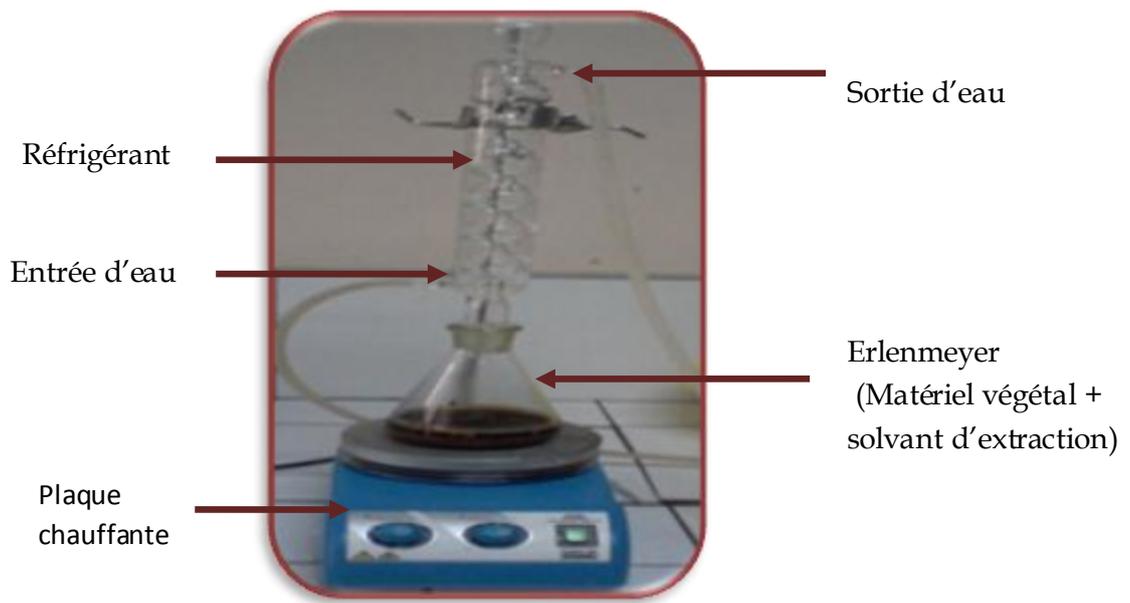
**1-4- Préparation d'extrait eau-méthanol (EM) :**

- ◆ Extraction sous reflux à chaud et sous agitation pendant 3 heures de 10g de racines broyées en présence de 100 ml de mélange eau / méthanol (30 / 70) (**figure 4**) ;
- ◆ Filtration de la solution ;
- ◆ Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (60° C) (**figure 5**);
- ◆ Récupération du produit sous forme de pâte (produit hygroscopique) sur les parois du ballon d'évaporation.

**1-5- Préparation de l'extrait eau-acétone (EA) :**

Cet extrait est préparé de la même manière que l'extrait eau-méthanol en utilisant l'acétone à la place du méthanol, cela est réalisé comme suite :

- ◆ Extraction sous reflux à chaud et sous agitation pendant 3 heures de 10g de racines broyées en présence de 100 ml de mélange eau / acétone (30 / 70) (**figure 4**) ;
- ◆ Filtration de la solution ;
- ◆ Evaporation à sec du filtrat à l'aide d'un rota-vapor (40° C) (**figure 5**);
- ◆ Récupération du produit sur les parois du ballon d'évaporation.



**Figure 4 :** Extraction sous reflux des racines de *Bryonia dioica*



**Figure 5 :** Rotavapor : évaporation à sec des extraits organiques.

#### 1-6- Préparation de l'extrait acétate d'éthyle (AE) :

L'extrait acétate d'éthyle **AE1** et **AE2** est récupéré à partir de l'extrait eau-méthanol (**EM**) et l'extrait eau-acétone (**EA**) respectivement après extraction et concentration au rotavapor, c'est dire on élimine le méthanol ou l'acétone et on récupère la phase aqueuse, cette dernière est traitée par une extraction liquide/liquide en utilisant :

- ◆ L'hexane (volume/volume) pour éliminer le maximum de graisses restantes et des pigments;

- ◆ Récupération de la phase aqueuse et extraction 3 fois par l'acétate d'éthyle (volume /volume);
- ◆ La phase organique d'acétate d'éthyle est évaporée à sec à l'aide d'un rotavapor (40°C);
- ◆ Le produit final est récupéré sur les parois du ballon d'évaporation.

### 1-7- Préparation de l'extrait n-butanol (n-B):

La préparation de l'extrait n-butanol **n-B1** et **n-B2** se fait de la même manière que celle de l'extrait acétate d'éthyle seulement les phase aqueuse de l'extrait EM et EA récupérées après traitement par l'acétate d'éthyle est traitée par une extraction liquide-liquide par :

- ◆ n-butanol 3 fois (volume /volume);
- ◆ La phase organique du n-butanol est évaporée à sec à l'aide d'un rotavapor (40°C);
- ◆ Le produit final est récupéré dans les parois du ballon d'évaporation.

### 1-8- Calcul des rendements des extraits de *Bryonia dioica* :

Nous pouvons déterminer le rendement des extraits des racines broyées de *Bryonia dioica* (aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, eau-méthanol fraction acétate d'éthyle, eau-acétone fraction acétate d'éthyle, eau-méthanol fraction n-butanol, eau-acétone fraction n-butanol), en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt (\%)} = (P1-P2) / P3 \times 100$$

**P1** : Poids du ballon après évaporation ;

**P2** : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

**P3** : Poids de la matière végétale de départ.

### 2-Les tests phytochimiques:

A fin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains composés chimiques, un screening phytochimique est réalisé dans les extraits préparés.

#### ↳ Les flavonoïdes [Karumi et al., 2004]

À 5 ml de chaque extrait (aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, eau-méthanol fraction acétate d'éthyle, eau-acétone fraction acétate d'éthyle, eau-méthanol fraction n-butanol, eau-acétone fraction n-butanol), on ajoute quelques gouttes d'HCl concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium. La présence des flavones aglycones est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange.

#### ↳ Les tanins [Karumi et al., 2004]

Un volume de 2 ml de chaque extrait (AQ, EM, EA, EA1, EA2, n-B1, n-B2), est additionné à 2 à 3 gouttes de la solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1%. Après quelques minutes d'incubation, le chlorure ferrique développe une coloration verdâtre qui indique la présence des tanins catéchiques ou bleu-noirâtre qui révèle l'existence des tanins galliques.

#### ↳ Les alcaloïdes [Majob, 2003]

Pour chaque extrait on réalise la procédure suivante : on ajoute 5 ml d'HCL 1% à 1ml de chaque extrait, le tout est chauffé au bain marie, puis on divise chaque extrait en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme suite :

- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1.358 g d' $\text{HgCl}_2$  dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- **Réactif de Wagner** : Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de  $\text{I}_2$ . Le volume obtenu est ajusté à 100ml avec l'eau distillée.

#### ↳ Les saponines

\***Réaction de Libermann-Burchard** : À 5 ml de nos extraits, on ajoute 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrée. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration rouge, alors que, les triterpènes donnent une coloration verte.

\***Indice de mousse** : à 5ml de chaque extrait (AQ, EM, EA, EA1, EA2, n-B1, n-B2), on ajoute 10 ml d'eau chaude, le tout est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est supérieur à 1 cm cela indique la présence de saponosides [N'Guessan et al, 2009].

#### ↳ Les quinones libres [Oloyede, 2005]

Sur un volume de chaque extrait (AQ, EM, EA, EA1, EA2, n-B1, n-B2), quelques gouttes de NaOH à 1% sont ajoutées. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

#### ↳ Les terpénoïdes [Edeoga et al, 2005]

À 5 ml de chaque extrait (AQ, EM, EA, EA1, EA2, n-B1, n-B2), on ajoute 2 ml de chloroforme et 3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrée. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

#### ↳ Les coumarines [Benme hdi, 2000]

Une quantité de quelques milligrammes de chaque extrait (AQ, EM, EA, EA1, EA2, n-B1, n-B2) est solubilisée dans 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont :

- La première représente un témoin ;
- La deuxième est traitée avec 0.5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines.

#### ↪ Les anthraquinones [Oloye de, 2005]

À 10 ml de chacun de nos extraits (AQ, EM, EA, EA1, EA2, n-B1, n-B2), on ajoute 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10% et on agite. L'apparition de couleur violette indique un test positif.

#### ↪ Les sucres réducteurs

On ajoute 1 ml de liqueur de Fehling à 5 ml de chaque extrait (AQ, EM, EA, EA1, EA2, n-B1, n-B2). Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité rouge brique.

#### ↪ Les amines

On applique sur papier filtre une goutte de chaque extrait (AQ, EM, EA, EA1, EA2, n-B1, n-B2). Après séchage à 80°C dans l'étuve, le papier est pulvérisé avec quelques gouttes d'une solution de la ninhydrine. Ensuite le papier est séché une 2<sup>ème</sup> fois dans l'étuve à 110°C pendant 5min, la présence des amines est observée sous forme d'une tache violette.

## 2- dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux :

Pour effectuer ce dosage, chaque extrait est préparé à une concentration de 1 mg/ml.

- ◆ L'extrait aqueux (**AQ**) est solubilisé dans l'eau distillée;
- ◆ L'extrait eau-méthanol (**EM**) est solubilisé dans eau-méthanol (v/v) ;
- ◆ L'extrait eau-acétone (**EA**) est solubilisé dans eau-méthanol (v/v) ;
- ◆ Les extraits acétate d'éthyle (**AE1**) et (**AE2**) sont solubilisés dans le méthanol;
- ◆ Les extraits n-butanol (**n-B1**) et (**n-B2**) sont solubilisés dans l'eau distillée.

### 3-1- Dosage des polyphénols totaux [Vermerris et Nicholson, 2006]

#### ❖ Principe :

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerris et Nicholson, 2006** en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et l'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleus de tungstène et de molybdène.

#### ❖ Mode opératoire :

- Un volume de 0.1 ml de chaque extrait ou d'acide gallique est mélangé avec 2 ml de la solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparé;

- le tout est agité par un vortex et incubé pendant 5 minutes;
- 100 µl du réactif Folin-Ciocalteu 0.2N est ajouté;
- Le mélange obtenu est incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes;
- la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

\* Une courbe étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme standard à différentes concentrations initiales (0,05/0,1/0,2/0,3/0,4/0,5/0,6/0,7/0,8/0,9/1mg/ml).

**Tableau 2** : Dosage des polyphénols totaux.

<b>Concentration du l'acide gallique (µg/ml)</b>	50	100	200	300	400	500	600
<b>Acide gallique (ml)</b>	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5	3
<b>Eau distillée (ml)</b>	2.75	2.5	2	1.5	1	0.5	0
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (µl)</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>Incubation 5 min à température ambiante</b>							
<b>Folin Ciocalteu (µl)</b>	100	100	100	100	100	100	100
<b>Incubation 30 min à température ambiante.</b>							
<b>La lecture se fait au spectrophotomètre à 700 nm.</b>							

\*La concentration des polyphénols totaux présents dans nos extraits exprimée en µg Eq d'acide gallique/mg d'extrait est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphénols}] = a \cdot f / b$$

- a = concentration des polyphénols en µg/ml déterminée à partir de courbe étalon.
- f= facteur de dilution (x22).
- b= concentration initiale des extraits (1 mg/ml).

### 3-2- Dosage des flavonoïdes [Ardestani et al ., 2007]

#### ❖ Principe :

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

❖ **Mode opératoire :**

- Un volume de 500 µl de chaque extrait ou de catéchine est mélangé avec 2 ml d'eau distillée;
- ajouter 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 15 % ;
- Après 6 min d'incubation à température ambiante, 150 µl de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) 10 % sont ajoutés au mélange;
- le tout est laissé pendant 6min pour la 2<sup>ème</sup> fois. Ensuite, 2ml d'hydroxyde de sodium à 4 % sont ajoutés aux tubes;
- le volume total est complété à 5 ml par l'eau distillée;
- Après 15 min, la lecture est faite à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

\*Une courbe d'étalonnage est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme standard à différentes concentrations (0,05/0,1/0,2/0,3/0,4/0,5/0,6/0,7/0,8/0,9/1mg/ml). Les résultats obtenus sont exprimés en µg équivalent de catéchine par mg d'extrait.

**Tableau 3 :** Dosage des flavonoïdes totaux.

Concentration du Catéchine (µg/ml)	50	100	200	300	400	500	600
Volume du Catéchine (ml)	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5	3
Extrait (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Eau distillée (ml)	2	2	2	2	2	2	2
NaNO <sub>2</sub> (ml)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
<b>Après 6 min à température ambiante</b>							
AlCl <sub>3</sub> (ml)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
<b>Après 6 min à température ambiante</b>							
NaOH (ml)	2	2	2	2	2	2	2

**Complété le volume à 5ml et incubation 15min**

**la lecture au spectrophotomètre à 510nm**

La concentration des flavonoïdes en  $\mu\text{g}$ . Eq catéchine/mg d'extrait présents dans notre échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Flavonoïdes totaux}] = a. f / b$$

- a = concentration des flavonoïdes en  $\mu\text{g/ml}$  déterminée à partir de la courbe étalon.
- f= facteur de dilution (x10).
- b= concentration initiale des extraits (1 mg/ml).

#### **4- Chromatographie sur couche mince :**

##### **❖ Principe :**

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

##### **❖ Mode opératoire :**

- ✓ Une concentration de 1mg/ml est préparée pour chaque extrait des racines de *Bryonia dioica*.
- ✓ Les témoins utilisés sont : l'acide gallique, la cathéchine, la myristine et la quercétine préparés à 0,1% dans le méthanol.
- ✓ Pour cette séparation nous avons utilisé des plaques d'aluminium en gel de silice 10x10cm.

##### **❖ Choix de la phase mobile :**

Parmi plusieurs systèmes de solvants cités en bibliographie nous avons choisi de tester les systèmes cités dans le **tableau 4** :

**Tableau 4** : les systèmes utilisé en CCM sur gel de silice

systemes	Phase mobile
Système 01	Eau/MeOH (20 : 80)
Système 02	Chloroforme/MeOH/H <sub>2</sub> O (40 :60 :0,1)
Système 03	Acétate d'éthyle /chloroforme/MeOH (90/5/5)
Système 04	Eau / acétone (20 :80)
Système 05	CHCl <sub>3</sub> /acétone/Eau (40 :60 :0,1)
Système 06	CHCl <sub>3</sub> /acétone/acétate d'éthyle/Eau (75 :20 :5 :0,2)
Système 07	N-butanol/A. acétique/Eau (50 :40 :10)
Système 08	Acétone /MeOH/H <sub>2</sub> O (100 :13,5 :4)
Système 09	Chloroforme/ acétone (80 :20)
Système 10	Chloroforme /acétate d'éthyle Chloroforme (50 :50)

❖ **Révélation :**

Après développement, les plaques ont été séchées, puis visualisées séparément par une lampe UV à 366nm. Les rapports frontaux des spots issus de la séparation ont été calculés et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits.

$$R_f = d / D$$

- **d** : Distance parcourue par la substance ;
- **D** : Distance parcourue par le solvant

**5- Evaluation de l'activité antioxydante par DPPH [Atoui *et al*, 2005]**

### ❖ Principe :

C'est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution.

### ❖ Mode opératoire :

- ✓ A 1950 µl de la solution du DPPH à  $6.34 \cdot 10^{-5} \text{M}$  (0.0025g DPPH dans 100ml méthanol) on ajoute 50µl de chaque extrait à différente concentration (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/ml) ;
- ✓ Pour le contrôle négatif, on mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl de DPPH ;
- ✓ Le blanc de l'appareil est le méthanol ;
- ✓ incubation 30 minutes à température ambiante ;
- ✓ La lecture se fait à 515 nm, comparée au standard qui contient l'acide ascorbique à différentes concentrations : 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.2 mg/ml.

### ❖ Calcul des pourcentages d'inhibition :

Le pourcentage de réduction du DPPH est donné par la formule suivante (Yen et al, 1994) :

$$\% \text{ PR du DPPH} = \frac{(\text{DO cont à } t_0) - (\text{DO éch à } t_{30 \text{ min}})}{(\text{DO cont à } t_0)} \times 100$$

- % PR du DPPH : pourcentage de réduction ou d'inhibition du DPPH.
- DO cont à  $t_0$  : densité optique du DPPH à  $t_0$ .
- DO cont à  $t_{30}$  : densité optique à 30 min après avoir ajouté l'extrait.

### ❖ Calcul des $\text{IC}_{50}$ :

Par définition la valeur  $\text{IC}_{50}$  est la concentration de l'acide ascorbique ou de l'extrait qui peut réduire 50 % du DPPH, cette dernière est déterminée graphiquement [Sánchez, 1998]. Les  $\text{IC}_{50}$  sont calculées graphiquement par la formule de la régression des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées à l'aide du logiciel Origin 50.

# **Résultats et interprétations**

## I- Les extractions

### 1-1- Détermination du taux des lipides

Le dégraissage des racines broyées de *Bryonia dioica* a permis d'éliminer 5% de matière grasse.

### 1-2- Détermination des caractéristiques et des rendements des extraits de racines de *Bryonia dioica*

Après extraction et récupération des extraits sous forme de poudre ou pate, le rendement, la couleur, l'aspect physique ainsi que la solubilité de chaque extrait sont déterminés et représentés dans le **tableau 5**

**Tableau 5** : Caractéristiques des extraits préparés à partir des racines de *Bryonia dioica*

Extrait	Aspect physique	couleur	Rendement (%)	solubilité
Aqueux (AQ)	poudre	marron	14,28	Eau distillée
Eau-méthanol (EM)	pate	marron foncé	9,59	ED/MeOH (v/v)
Eau-acétone (EA)	pate	marron	17,58	ED/MeOH(v/v)
Acétate d'éthyle (A)	poudre	orange	1,21	MeOH
n-butanol (n-B1)	pate	marron	1,57	Eau distillée
Acétate d'éthyle (A)	poudre	marron	1,71	MeOH
n-butanol (n-B2)	pate	marron	2,11	Eau distillée

## 2- Les tests phytochimiques des extraits des racines de *Bryonia dioica* :

Les tests phytochimiques réalisés sur les sept extraits: aqueux (AQ), eau-méthanol (EM), eau-acétone (EA), EM acétate d'éthyle (AE1), EM n-butanol (n-B1), EA acétate d'éthyle (AE2) et EA n-butanol (n-B2) révèlent l'apparition d'une coloration, précipité ou encore une floculation par l'intermédiaire de certains réactifs spécifiques. La présence ou l'absence des différentes familles de composés chimiques sont présentées dans le **tableau 6**.

**Tableau 6** : Résultats des tests phytochimiques des extraits des racines de *Bryonia dioica*

Métabolites secondaires		AQ	EM	EA	AE1	AE2	n-B1	n-B2
Les flavonoïdes		-	+	+	traces	traces	-	+
Les tanins	cathéchi ques	-	++ vert	-	++	++	++	++
	galliques	-	-	-	-	-	-	-
Les alcaloïdes	Mayer	-	traces	+	traces	-	++	++
	wagner	traces	-	+	-	-	-	+
Les saponosides triterpéniques		-	-	-	++ vert	++ vert	-	++ vert
Les quinones libres		++ jaune	- marron	+	++	+	- vert	+
Les terpénoïdes		-	++	-	++	+	+	++
Les coumarines		traces	+	+	+	-	-	-
Les anthraquinones		-	-	-	-	-	-	-
Les sucres réducteurs		+	-	-	-	-	++	-
Les amines		-	++	++	+	traces	-	+

(++) : Test fortement positif.

(+) : Test positif.

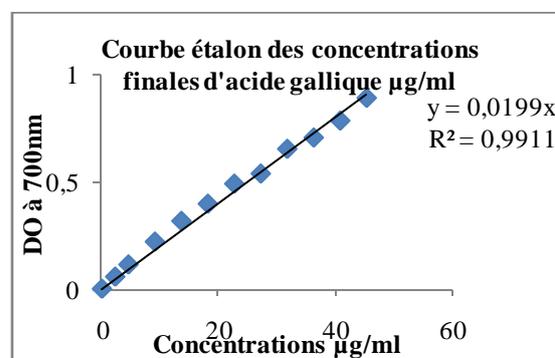
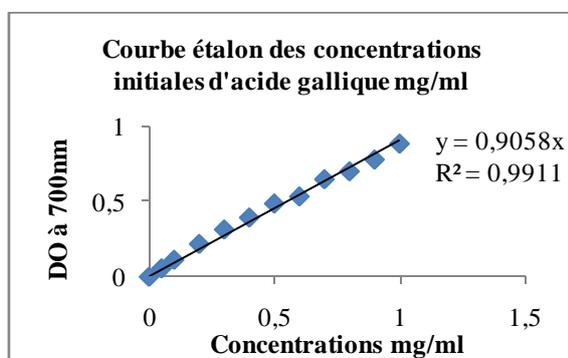
(-) : Test négatif.

L'examen phytochimique réalisé sur nos extraits des racines broyées de *Bryonia dioica* nous a révélé la présence des flavonoïdes et des tanins dans chaque extrait sauf l'extrait aqueux et n-butanol. Les saponosides se présentent dans l'extrait acétate d'éthyle (AE1) et acétate d'éthyle (AE2) et n-butanol (n-B2). Les quinones libres, sont révélées dans tous les extraits sauf l'extrait eau-méthanol et l'extrait n-butanol (n-B1), ainsi que les terpénoïdes sont présente dans tous les extraits sauf l'extrait aqueux et l'extrait eau-acétone, alors que les amines sont présentes dans l'extrait eau-méthanol, acétate d'éthyle et le n-butanol. De plus nous avons obtenu un test négatif pour et les anthraquinones dans tous les extraits.

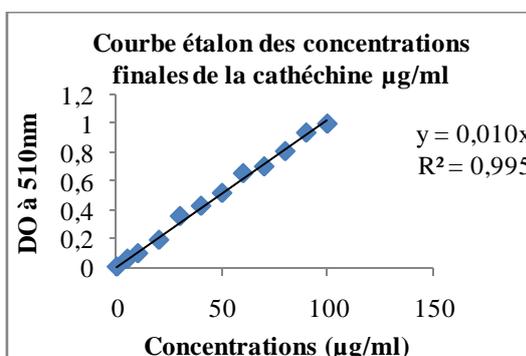
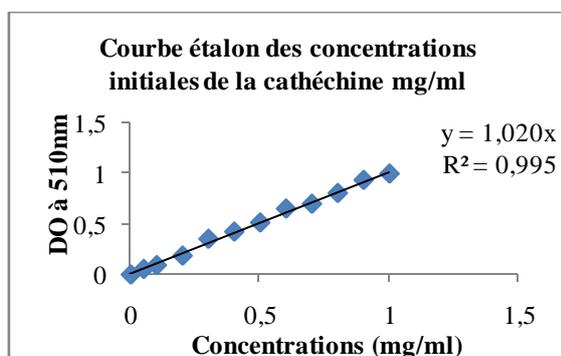
### 3- Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

La méthode utilisée pour le dosage de polyphénols totaux est celle utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, alors que le dosage des flavonoïdes totaux est réalisé par la méthode colorimétrique au Chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Les **figures 6 et 7** représentent les courbes étalons des concentrations initiales et finales de l'acide gallique et la catéchine respectivement.

Les résultats obtenus au cours du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux dans les sept extraits : aqueux (AQ), eau-méthanol (EM), eau-acétone (EA), EM acétate d'éthyle (AE1), EM n-butanol (n-B1), EA acétate d'éthyle (AE2) et EA n-butanol (n-B2), sont représentés dans le **tableau 7**.



**Figure 6** : Courbe étalon de l'acide gallique



**Figure 7** : Courbe étalon de la catéchine

**Tableau 7** : Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux dans les extraits de *Bryonia dioica*

Extraits	Quantité des polyphénols		Quantité de flavonoïdes	
	µg.Eq acide gallique /mg d'extrait	µg.Eq acide gallique/100g de matière végétale	µg.Eq catéchine /mg d'extrait	µg.Eq catéchine/100g de matière végétale
AQ	29,14	18,91	14,7	20,99
EM	242,77	105,83	62,02	59,49
EA	177,08	141,5	20,13	35,39
AE1	393,49	14,98	101,87	12,33
AE2	272,45	43,96	76,67	13,11
n-B1	565,52	19,68	49,47	7,77
n-B2	275,73	33,77	47,57	10,04

les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que l'extrait l'extrait n-B1 riche en composé phénoliques avec un présente un taux 565,52 mg eq d'acide gallique par mg d'extrait, suivie par l'extrait AE1 393,49 µg.eq acide gallique/mg d'extrait, ensuite 275,73 µg.Eq acide gallique/mg d'extrait pour l'extrait n-B2, pour l'extrait AE2 renferme 272,45 µg.eq acide gallique/mg, tandis que l'extrait AQ ne contient que 29,14 µg.eq acide gallique/mg.

Le dosage de flavonoïde totaux montre que la teneur la plus élevée est celle de AE1, il renferme 101,87 µg.eq catéchine/mg d'extrait, suivie par AE2 76,67 µg.eq catéchine/mg d'extrait, l'extrait EM contient 62,02 µg.eq catéchine/mg d'extrait, pour l'extrait n\_B1 renferme 49,47 µg.eq catéchine/mg d'extrait et l'extrait n-B2 contient 47,57 µg.eq catéchine/mg d'extrait, alors que l'extrait aqueux contient une faible teneur en flavonoïdes 14,7 µg.eq catéchine/mg d'extrait.

#### 4- Chromatographie sur couche mince :

pour la caractérisation de nos extraits des racines de *Bryonia dioica* aqueux (AQ), eau-méthanol (EM), eau-acétone (EA), EM acétate d'éthyle (AE1), EM n-butanol (n-B1), EA acétate d'éthyle (AE2) et EA n-butanol (n-B2), une chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques de gel de silice en utilisant onze systèmes d'élution de polarité

différente, ainsi que certains standards comme: l'acide gallique, la cathéchine, la myristine et la quercétine. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **tableau 8**.

**Tableau 8** : Résultats de quelques analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de racines de *Bryonia dioica* à 366nm

Système	Extraits							Témoins			
	AQ	EM	AE1	n-B1	EA	AE2	n-B2	R <sub>r</sub>			
	R <sub>r</sub>							Cat	AG	Myr	QU
Systeme 01	0	0,8	0,79	0,79	0,75	0,74	0,74	0,85	0,77	0,92	0,72
Systeme 02	0	0,8	0,81	0,68	0,79	0,75	0,7	0,72	0,9	0,71	0,82
Systeme 03	0	0,27	0,29	0,29	0,28	0,32	0,25	0,8	0,43	0,86	0,88
			0,41			0,73					
			0,52			0,88					
			0,79								
			0,87								
Systeme 04	0	0,86	0,8	0,79	0,64	0,85	0,75	0,85	0,82		
Systeme 05	0	0,19	0,16	0,17	0,28	0,3	0,19	0,41	0,38	0,45	0,34
			0,28			0,53					
			0,39			0,74					
			0,42			0,94					
			0,78								
			0,82								
			0,94								
Systeme 06	0,82	0,91	0,14	0,72	0,08	0,09	0,79	0,80	0,92	0,82	0,88
			0,73		0,8						
Systeme 07	0	0,85	0,87	0,83	0,87	0,22	0,86	0,88	0,82	0,85	0,94
						0,86					
Systeme 08	0	0,69	0,75	0,6	0,73	0,64	0,70	0,87	0,76	0,82	0,80

<b>Système 09</b>	0	0,21	0,08 0,14 0,22 0,35 0,42 0,49 0,80	0,94	0,31	0,08 0,15 0,23 0,35 0,43 0,52 0,82	0,95	0,94	0,97	0,95	0,67
<b>Système 10</b>	0	0,06 0,19 0,35 0,47 0,74	0,21	0,12	0,11 0,19 0,28 0,37 0,51 0,55 0,8	0,13	0,18	0,14	0,11	0,26	0,34

**AQ : Extrait aqueux.**

**EM : Extrait eau-méthanol**

**EA : Extrait eau-acétone**

**AE1 : acétate d'éthyle EM**

**AE2 : acétate d'éthyle EA**

**n-B1 : n-butanol EM**

**n-B2 : n-butanol EA**

**AG : Acide gallique**

**Cat : catéchine**

**Myr : Myristine**

**QU : quercitine**

**Figure 8** : Chromathogramme de *Bryonia dioica* sur CCM



**Système 01**



**Système 02**



Systeme 03



Systeme 04



Systeme 05



Systeme 06



Systeme 07



Systeme 08



Systeme 09

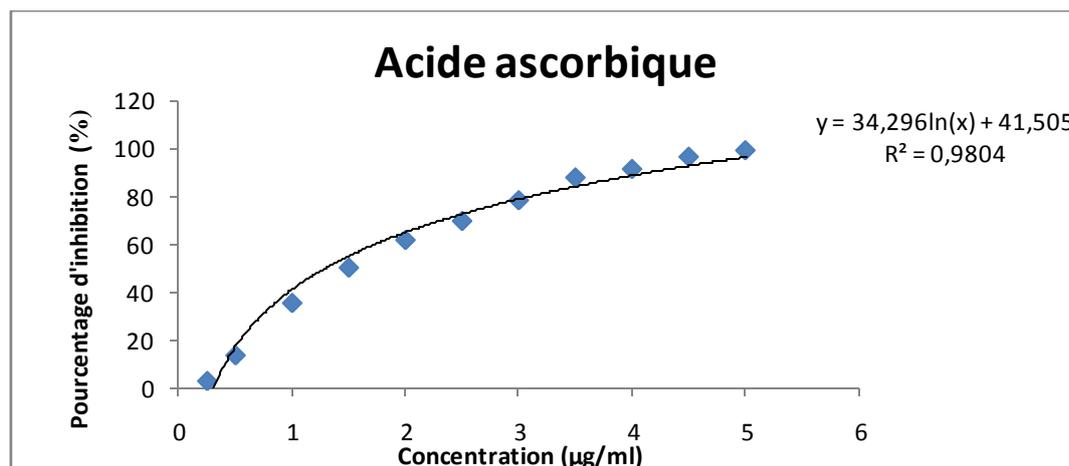


Systeme 10

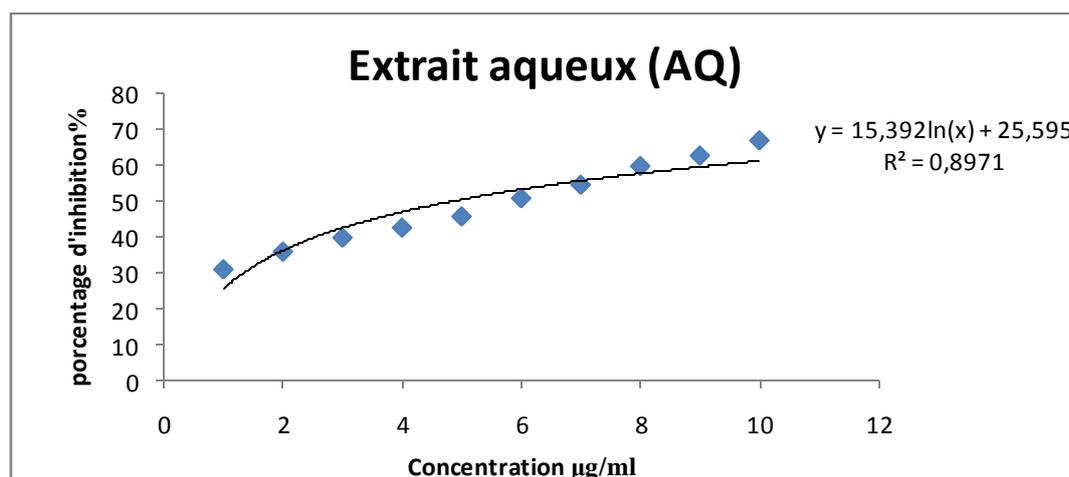
## 5. Etude de l'activité antioxydante :

### 111- Le pouvoir réducteur des extraits de *Bryonia dioica* sur le DPPH

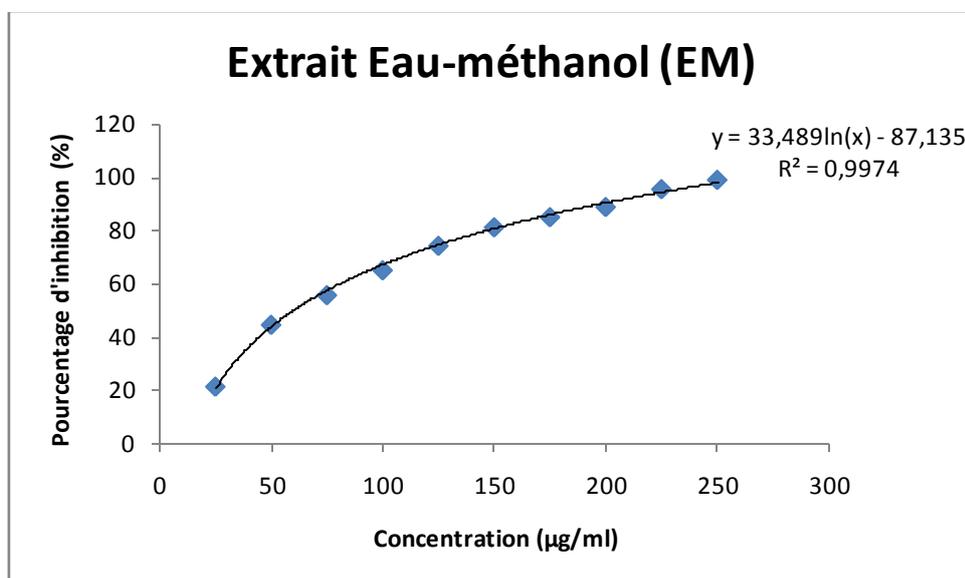
Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH. Les **tableaux 9 et 10**, représentent l'activité antioxydante de l'acide ascorbique, et l'extraits : aqueux, eau- méthanol, eau-acétone, acétate d'éthyle, et n-butanol à différentes concentrations.



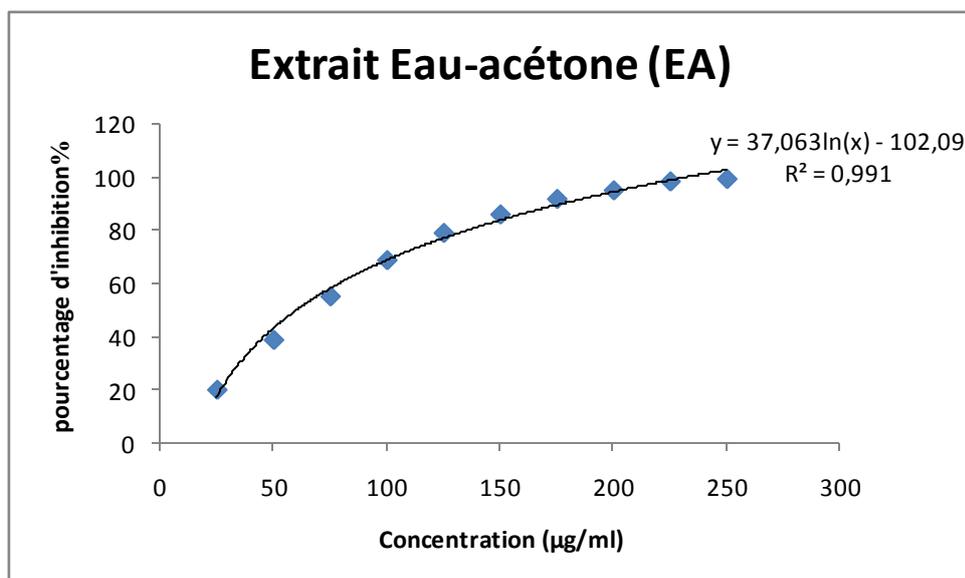
**Figure 9** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique



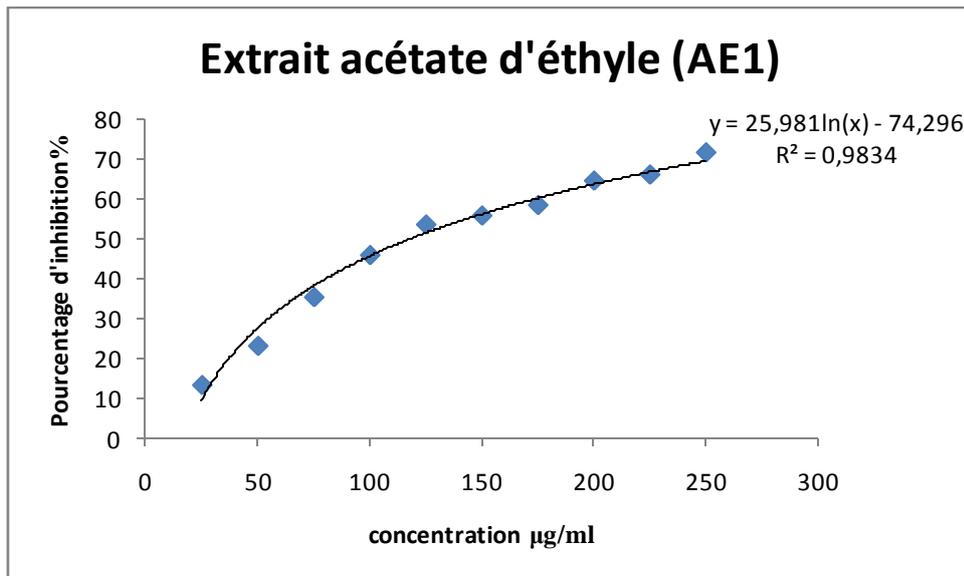
**Figure 10** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux



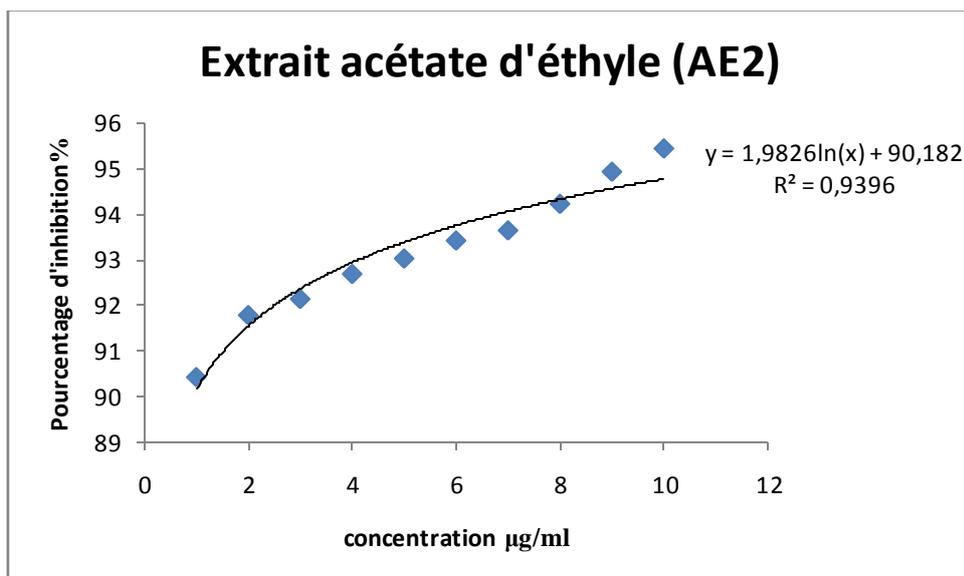
**Figure 11** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait EM



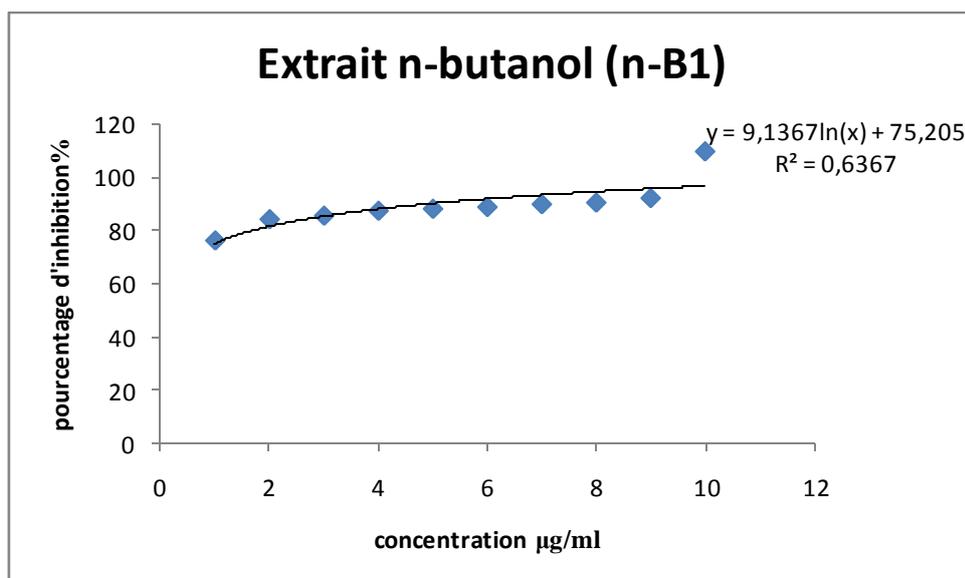
**Figure 12** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait EA



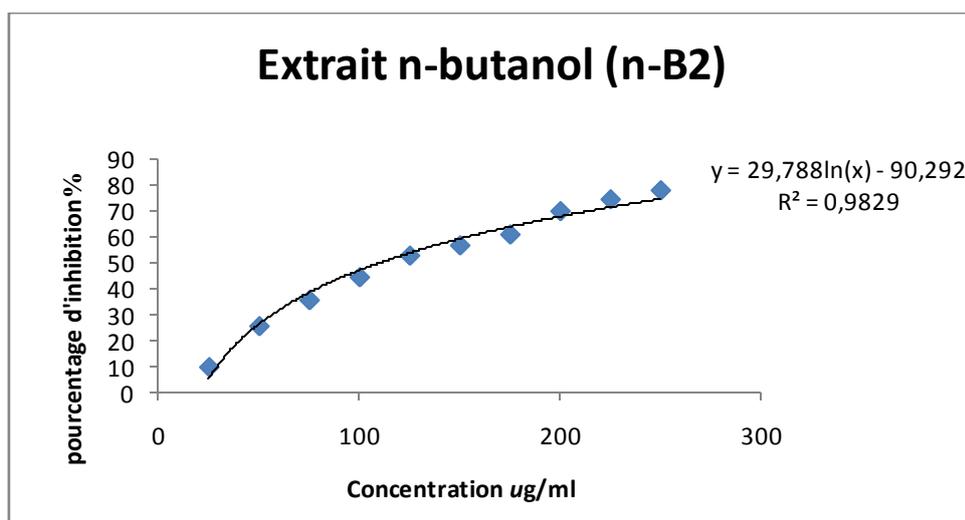
**Figure 13** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait EM acétate d'éthyle



**Figure14** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait EA acétate d'éthyle



**Figure 15:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait EM n-butanol



**Figure 16 :** Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des différentes concentrations d'extrait EA n-butanol.

**Tableau 9 :** Pourcentage de réduction du DPPH par l'acide ascorbique

Concentration (µg/ml)	0.25	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
% de réduction du DPPH	3.13	13.86	35.68	50.43	61.97	69.9	78.54	88.05	91.6	96.7	99.4

**Tableau 10** : Pourcentage de réduction du DPPH par les extraits aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, EM acétate d'éthyle, EA acétate d'éthyle, EM n-butanol, EA n-butanol.

Les extraits	Concentration finales des extraits ( $\mu\text{g/ml}$ )							
	25	50	100	150	175	200	225	250
AQ	30.93	35.84	42.49	50.67	54.39	59.57	62.48	66.69
EM	21.59	44.78	65.25	81.38	85.18	89.00	95.70	99.18
EA	19.95	38.71	68.74	85.94	91.78	95.00	98.37	99.30
AE1	26.03	51.97	77.17	89.86	95.04	94.56	97.08	98.61
AE2	57.31	75.22	90.84	93.42	93.94	94.22	94.92	95.43
n-B1	52.39	66.46	82.05	91.39	/	96.43	/	99.31
n-B2	9.68	25.43	44.23	56.45	60.4	69.62	74.16	77.62

**Tableau 11** :  $\text{IC}_{50}$  des extraits : aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, EM acétate d'éthyle, EA acétate d'éthyle, EM n-butanol, EA n-butanol et l'acide ascorbique

Les extraits	Ac. ascorbique	AQ	EM	EA	AE1	AE2	n-B1	n-B2
$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	1.57	147,00	60	67.90	46.53	18.49	24.92	117.00

# Discussion

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale; une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

De ce fait, plusieurs travaux ont été réalisés sur les plantes médicinales dont la présente étude qui est consacrée à la recherche d'éventuels effets antioxydant des extraits : aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, acétate d'éthyle et n-butanol des racines de *Bryonia dioica*.

Le dégraissage des racines de *Bryonia dioica* a permis d'évaluer un taux de 5% de matière grasse. Les rendements en extraits obtenus à partir de la racine de la plante, sont 17,58% pour l'extrait EA et 14,28 % pour l'extrait AQ suivi par 9,59% pour l'extrait EM et 2,11% pour l'extrait n-B2 et 1,71% pour l'extrait EA2, 1,57 % pour l'extrait n-B1, et en fin 1,21% pour l'extrait AE1.

Au cours de notre expérimentation, nous avons réalisé quelques tests phytochimiques à fin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains familles chimiques dans l'extrait aqueux, eau-méthanol, eau-acétone, acétate d'éthyle et n-butanol de racines broyées de *Bryonia dioica*. Cet examen phytochimique nous a révélé la présence de tanins, de coumarines et de flavonoïdes dans tous les extraits sauf l'extrait aqueux qui est dépourvue de flavonoïdes. Les saponosides se présentent dans tout les extraits sauf l'extrait aqueux(AQ), eau- méthanol (EM), Eau-acétone (EA), Les quinones libres, les terpénoïdes sont révélés dans l'extrait eau-méthanol, EM acétate d'éthyle (AE1), EM n-but (n-B1), EA acétate d'éthyle (AE2), EA n-but (n-B2), ainsi les coumarines sont présentes dans tous les extraits sauf le n-B1 et n-B2 et AE2, alors que les amines sont présent dans l'extrait EM, , AE1, EA et n-B2. Concernent les sucres réducteurs on note un test positif seulement pour l'extrait aqueux et l'extrait n-B1. De plus nous avons obtenus un test négatif pour les anthraquinones dans la plus part des extraits.

Cependant, nous notons à quelques différences entre nos résultats et ceux obtenus par **Schauenberg, 1977** qui ont révélé la présence des alcaloïdes et les saponosides dans l'extrait aqueux, les flavonoïdes dans l'extrait acétate d'éthyle, et l'absence des coumarines dans l'extrait aqueux et l'extrait eau-méthanol ainsi que les terpenoïdes dans l'extrait aqueux. Ces différences peuvent être liées au mode de préparation des extraits, la partie utilisée de la plante, ainsi qu'à la saison de récolte de la plante.

Le dosage des polyphénols et de flavonoïdes totaux dans nos extraits, nous à révélé la présence de 18,91 µg.Eq acide gallique/100g de matière sèche et 20,99 µg.Eq catéchine/100g de matière sèche dans l'extrait aqueux, aussi 141,5 µg.Eq acide gallique/100g

de matière sèche et 35,39 µg.Eq catéchine/100g de matière sèche dans l'extrait eau - acétone ; et 105,83 µg.Eq acide gallique/100g de matière sèche et 59,49 µg.Eq catéchine/100g de matière sèche pour l'extrait eau - méthanol.

D'après **Bagher gholivand, 2012** la teneur en polyphénols de *Bryonia dioica* est de 35.18 mg.Eq au niveau des tiges 151.92 mg.Eq au niveau des feuille. La teneur de flavonoïdes est de 226.57 mg.Eq au niveau des tiges et 32.14 mg.Eq au niveau des feuilles. Ces valeurs relativement importantes en polyphénols et flavonoïdes totaux, nous a mené à réaliser une analyse chromatographie par CCM afin de déterminer la composition de nos extraits en utilisant certains composés phénoliques de références utilisés comme témoins.

Concernant la séparation des extraits bruts des racines de *Bryonia dioica*, une chromatographie sur couche mince à été utilisée sur les plaques en utilisant dix systèmes d'élution différents ont été testés. Selon les résultats obtenus, le troisième, le cinquième, le neuvième et le dixième système donnent une bonne résolution pour les extraits bruts des racines de notre plante tenant compte du nombreux taches révélés dans le chromatogramme. Pour l'essai d'identification des composés par CCM, nous avons utilisé quatre témoins, sur les dix systèmes d'élution. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **tableau 08**. La séparation par l'acétate d'éthyle /chloroforme /MeOH (90 :5 :5) et CHCl<sub>3</sub> /acétone /Eau (40 :60 :0,1) et chloroforme /acétone (80 :20) ainsi le chloroforme /acétate d'éthyle (50 :50) a révélé plus des taches. Ils représentent les meilleurs systèmes d'élution pour la séparation des composés phénoliques, comparés aux autres systèmes.

Ces résultats sont en accord avec les résultats des tests photochimiques.

De plus, les extraits de racines de *Bryonia dioica* sont également évalués pour leur activité antioxydante. Le radical DPPH<sup>•</sup> est l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al., 2008**).

Grace à cette méthode, nous avons étudié l'activité antioxydante des extraits de notre plante l'extrait Eau-méthanol et Eau-acétone ont montré un pouvoir de piéger le DPPH<sup>•</sup> Un peu plus important que celui des autres extraits.

Les pourcentages d'inhibitions à la concentration de 250 µg/ml sont dans un ordre décroissant allant de l'extrait Eau-acétone, Eau - méthanol, EM n-butanol, EM acétate d'éthyle, EA acétate d'éthyle, EA n-butanol, aqueux.

Pour chacun des extraits analysés pour leur capacité de piégeage de radicaux libres du DPPH, l'IC<sub>50</sub> a été déterminée afin de pouvoir comparer cette capacité entre eux et par rapport à l'acide ascorbique comme molécule de référence. L'IC<sub>50</sub> est définie comme étant la concentration en produit nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH plus la valeur de l'IC<sub>50</sub> est petite, plus l'activité antioxydante de l'extrait testé est grande (**Pokorny et al ., 2001**)

A partir des représentations graphiques des **figures 9 à 16**, nous avons calculé les IC<sub>50</sub> de chaque extrait, dont celle de l'acide ascorbique. Les valeurs des IC<sub>50</sub> obtenues pour l'ensemble des extraits, sont représentées dans le **tableau 10**, dont les valeurs sont exprimées en concentrations finales µg /ml.

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que la réduction de 50% du DPPH a été atteinte pour tous les extraits testés. L'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique 1,57 µg /ml est proche de celle obtenue de **bagher gholivand., 2012**. L'IC<sub>50</sub> des différents extraits varie de 18,49 µg/ml pour AE2 à 147 mg/ml pour l'extrait AQ. Cela qui nous permet de constater que les extraits de ***Bryonia dioica*** ont une capacité antioxydante moyenne et dépendante de la composition en métabolites secondaire de l'extrait comparativement à l'acide ascorbique, agent antioxydant de référence 1,54 µg/ ml.

# Conclusion

Les dernières décennies sont marquées par l'intérêt particulier porté à la mise en valeur des plantes à intérêt médicinale comme source de substances bioactives naturelles. Les polyphénols constituent une famille de composés qui sont omniprésents dans le règne végétale. Ils semblent particulièrement intéressants, en raison de leur fort pouvoir antioxydant.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude de pouvoir antioxydant en plus du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits de racines broyées de *Bryonia dioica*, appartenant à la famille des cucurbitacées.

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montrent que les extraits préparés ont un pouvoir réducteur intéressant et variable, ce dernier augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait testé. Cette activité antioxydante est probablement liée à la richesse de nos extraits en métabolites secondaires. Dans ce contexte la présence des flavonoïdes, tanins, coumarines, terpénoïdes et des alcaloïdes est révélée avec des intensités variables dans les racines broyées de notre plante. De plus, le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux a montré une richesse en composés phénoliques.

Notre étude reste toutefois incomplète, pour cela il serait intéressant de tester d'autres méthodes pour mieux évaluer l'activité antioxydante, citant à titre d'exemple: FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), et ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

# Références

1. **Ahmet S; 2003.** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (*Balanitaceae*). Thèse de pharmacie, Bamako, 112 p.
2. **Akihisa T; Yasukawa K; Kimura Y; Takido M; Kokke W.C.M.C; Tamura T ; 1994.** Five D:C-Friedo-oleanane triterpenes from the seeds of *Trichosanthes kirilowii Maxim* and their anti-inflammatory effects. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*.42:1101-1105.
3. **Antwerpen V ;2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents vascular-related disease. *Nutr Rev*, 54: 1.
4. **Ardestani A ; Yazdanparast R; 2007.** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation. *Food and chemical toxicology* 2007; 45: 2402-2411.
5. **Atoui AK ; Mansouri A ; Boskou G ; Kefalas P ; 2005.** Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* 2005; 89: 27-36.
6. **Aurousseau, B ; 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : baker (*Ericaceae*), tambourissa trichophylla baker (*monimiaceae*) et embelia concinna baker (*myrsinaceae*), Thèse de doctorat.
7. **Bagher Gholivand M ; Piryaei M ;2012.** The antioxidant activity, total phenolics and total flavonoids content of *Bryonia dioica* Jacq. *biologija*. 2012. Vol. 58. No. 3. P. 99–105 c Lietuvos mokslų akademija, 2012.
8. **Bammi, J, N. Gmira, A. Douira, A. Remmal, R. Khelifa et M. Manai ; 2002.** A study of antibacterial and antiviral activities of essential oils of oregano and clove. The first African Congress on Biology and Health. 23, 24, 25 April, 2002. Ferhat Abbas University. Setif, Algeria.
9. **Barlow .S.M; 1990.** toxicological aspects of antioxydants used as food addives. In: *Food antioxydants*, Hudson B.J.F.(ed.), Elseveir ,Amsterdam ,1990,253-307.
10. **Barreira JCM, Oliveira MBPP, Ferreira ICFR; 2013.** Optimized chromatographic analysis of ergosterol in the most appreciated wild and cultivated edible mushrooms. *Food Anal Method* (In press).
11. **Bellakhdar, J. ; 1997.** La pharmacopée marocaine, traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoir populaire— Ed. le Fennec. Casablanca, Maroc. 129-533.

12. **Benarba, B, Boumedienne Meddah, AbdelkaderAoues; 2012.** *Bryonia dioica* aqueous extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway in BL41 Burkitt's lymphoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*.141:510-516.
13. **Benariba N, Djaziri R, Bellakhdar W, Belkacem N, Kadiata M, Malaisse WJ, Sener A ; 2013.** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 3(1):35-40
14. **Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O, Castellví A, Alonso E, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J. ;2002.** Changes in low-density lipoprotein electro negativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids *Atherosclerosis*. 160(1):223-32.
15. **Benmehdi, H ; 2000.** Valorisation des plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Thèse de Magister. Chimie organique appliquée. Université de Tlemcen.
16. **Bharathi .L. K , H. S. Singh , S. Shivashankar A. N. Ganeshamurthy , P. Sureshkumar Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.;2013.** Assay of Nutritional Composition and Antioxidant Activity of *Three Dioecious Momordica* Species of South East Asia DOI 10.1007/s40011-013-0205-7 The National Academy of Sciences, India 2013.
17. **Bidie, A.P; Banga B, Adou F. Yapou1, Jean David N'guessan1 & Allico Joseph DJAMAN1 ;2011.** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne *Sciences & Nature* Vol. 8 N°1: 1 - 11 (2011)
18. **Bloomer, R. J. and K. H. Fisher-Wellman; 2008.** "Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake." *Gend Med* 5(3): 218-28.
19. **Bossokpi; 2002.** I.P.L. Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam (*Rutaceae*). Thèse de pharmacie, Bamako (Mali)
20. **Bozin B., Mimica- dukic N., samojlik I ., Goran A., Igc R; 2008.** phenolics as antioxydants in garlic(*Allium sativum L.,Alliaceae*) .*Food Chemistry*; 111:925-9.
21. **Bruneton, J. ;1999.** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3<sup>ème</sup> édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris .
22. **Caubet, S. Tomasi, J. Boustie, F ; 2012.** Le Dévéhat. Atlas des plantes toxiques. *EMC - Pathologie professionnelle et de l'environnement* 2012;7(1):1-29 [Article 16-065-A-10].

23. **Chevaley I. ; 2000.** Contribution à l'étude des phytochimique des Saxifragacées, isolement d'antioxydants à partir de *Saxifraga stelleris L. et Saxifraga cuneifolia L* et d'un composé antifongique de *Ribes rubrum L.* Thèse de doctorat, Lausanne, 175 p.
24. **Cohen J H, Kristal A R and Stanford J L ;2000.** Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68.
25. **Cook N.C et Samman S; 1996.** Flavonoids chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources, *J Nutr Biochem.* 1996,7, pp 66-76.
26. **Cowan, M.M; 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Ree*, 12.
27. **De Zwart L, J. Meerman, J. Commandeur & N. Vermeulen ; 1999.** Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical. Biol. Medic.*, 26: 202-226.
28. **Delattre J., Beaudeau J-L., Bonnefort-Rousselot D ; 2005.** Radicaux libres et stress oxydant : Aspect biologiques et pathologiques. Tec et Doc Lavoisier, Londres -Pris -New York.
29. **Djeridane A, Yousfi M, Brunel J M, Stocker P; 2010.** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a power ful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants
30. **Edeoga, H.O; Okwu, D.E; Mbaebie, B.O; 2005.** Phytochemical constituents of some Negerian medicinal plants. *African journal of biotechnology.* 4: 685-688.
31. **El-Agamey, A., Lowe, G.M., Mc Garvey, D.J. Mortensen, V., Phillip, D.M., Truscott, T.G; 2004.** Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, *Arch. Biochem. Biophys*, 430 (1): 37-48.
32. **El-Haci Imad Abdelhamid, Fawzia Atik Bekkara, Wissame Mazari, Mohammed Gherib; 2013.** Phenolics content and antioxidant activity of some organic extracts of endemic medicinal plant *Anabasis aretioides* Coss. & Moq. from Algerian Sahara *Pharmacognosy Journal* 5 (2013) 108-112.
33. **Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D ; 2007.** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
34. **El-Sayed S. Abdel-Hameed, Salih A. Bazaid, Mohamed M. Shohayeb, Mortada M. El-Sayed and Eman A. El-Waki ;2012.** Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus erectus* .

- 35. Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z ;1986.** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé, 64(2) : 159-164.
- 36. Favier A ; 2003.** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, 108-115.
- 37. Garnier G, Bézanger- Beauquesne, L. and Debraux, G ; 1961.**Ressources médicinales de la flore Française Tome 1, Paris VIème, Vigot Frères, Editeurs, 1961.
- 38. Garrel C, Ceballos-Picot, I., Germain G, and Al-Gubory, K. H; 2007.** Oxidative stress- inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death in vivo. Free radical research 41, 251-9.
- 39. Gauche, E., Hausswirth, C. ;2006.** Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène
- 40. Gawlak S. L, Neubauer, M, Klei, H. E, Chang, C. Y, Einspahr, H. M. and Siegall, C. B; 1997.** Molecular, biological, and preliminary structural analysis of recombinant bryodin 1, a ribosome-inactivating protein from the plant *Bryonia dioica*, Biochemistry, 1997, 36, 3095-103.
- 41. Habsah M, Faridah Abasa, Dharma Permana, Nordin H. Lajisa, Abdul Manaf Alib, Mohd Aspollah Sukaric, Taufiq Y. Hinc, Hiroe Kikuzakid, and Nobuji Nakatanid ; 2004.** DPPH Free Radical Scavenger Components from the Fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (*Zingiberaceae*) Z. Naturforsch. 59c, 811D815 (2004); received April 13/July 15, 2004.
- 42. Halliwell B. (1991).** Reactive oxygen species in living systems: source of oxidative stress during the menstrual cycle. Biomarkers. 13(2):160-83.
- 43. Halliwell B and Gutteridge J M C ; 2007.** Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford (fourth edition).
- 44. Haslam, E. (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. J. Nat Pro, 59: 205 215.
- 45. Jacob C, Knight, I, Winyard, P.G; 2006.** Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. Biological chemistry 387, 1385-1397.

- 46. Joël Boustié, Alain Caubet, Michel ; 2002 .** Paris. Atlas des intoxications d'origine végétale. EMC - Pathologie professionnelle et de l'environnement 2002;7(1):1-29 [Article 16-065-A-10].
- 47. Kahouadji, M.S ; 1995.** Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc orientale — Mem. Doc. 3<sup>ème</sup> cycl. (ined.). Fac. Sci., Univ. Mohamed I, Oujda, Maroc. 206 p.
- 48. Karumi Y ; Onyeyili PA ; Ogugb uaja VO; 2004.** Identification of active principales of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. J Med Scien 2004 ; 4: 179-182.
- 49. Kirschvink N, de Moffarts B, Lekeux P. ;2008.** The oxidant/antioxidant Journal of Chemical Ecology, 14, 1789-1805.
- 50. Kolesnikov, M.P., Gins, V.K. ; 2001.** Phenolic substances in medicinal plants. Appl. Biochem. Micro, 37 (4): 392-399.
- 51. Koolman J, Rohm KH. ;1999.** Atlas de Poche de Biochimie. Flammarion:Paris. L. Growing in Taif, Saudi Arabia. European Journal of Medicinal Plants 2(2): 93-112,
- 52. Landis, G.N., Tower, J; 2005.** Superoxide dismutase evolution and life span regulation. Mech. Ageing Dev. 126: 365–379.
- 53. Le K, Chiu F and Ng K; 2007.** Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii. Food Chemistry, 105, 353-363.
- 54. Lee S.K., Mbwambo Z.H, Chung H.S, L, Games E.J.C, Metha R.G. et al; 1998.** Evaluation of the the antioxidant potential of natural products. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening; 1:35-46
- 55. Majob F., Kamalinejab M., Ghaderi N., Vahidipour H.R., 2003.** Phytochemical screening of some species of Iranian plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 77-82.
- 56. Menon, S. G., and Goswami, P. C; 2007.** A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. Oncogene 26, 1101-9.
- 57. Milane H ; 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. p : 13-36.
- 58. Mogode D ; 2005.** « Etude phytochimique et pharmacologique de Cassia Mol Physiol, 257: 163 - 173.
- 59. Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. ; 2001.** The interaction of dietary carotenoids with radical species, Arch. Biochem. Biophys, 385 (1) :13–19.

60. **Munoz S., Salvarelli S., Saiz M, Conde F; 1992** .A toxic protein from *Bryonia dioica* Jacq. Fruits: the brydiofin *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183 : 1011-1018 .
61. **Oloyede, O.I; 2005**. Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. Pakistan journal of nutrition. 4: 379-381.
62. **Packer L and Weber S U; 2001**. The role of vitamin E in the emerging field of nutraceuticals. In: Kramer K, Hoppe P and Packer L. Nutraceuticals in health and disease prevention. New York (Marcel Dekker), p: 27-43.
63. **Perret C ; 2001** Analysis de tanins inhibiteurs de stilbéne oxydase produite par *Btrytis cinerea*. Thèse de doctorat. Université Neuchatel.
64. **Perrony S ;2005**. La perception gustative et la consommation des tannins chez le *MAKI (Lemur catta)*.Thèse de doctorat en Eco-Ethologie . Muséum national d'histoire naturelle.
65. **Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O ;1999**. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. Vaisseaux, Cœur, Poumons 4 (5).
66. **Pincemail J, Siquet J, Chappelle J.P ; 2000**. Evaluation des concentration plasmatiques en antioxydants anticorps contre les LDL oxydées et homocysteine dans un échantillon de la population liégeoise. Ann.Biol. Chin. 58 : 178-185.
67. **Power SK, Smuder AJ, Kavazisan,Hudson; 2010**.experimental guides lines for studies designed to investgate the impacte of antioxidant supplementation on exercise performance international journal of spot nutrition and exercise metabolism 20:2-14
68. **Pryor, W.A; 2000**. Vitamin E and heart disease: basic science toclinical intervention trials, Radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol. Cell. Biochem, 266: 37–56.
69. **Ricci D, Giamperi L, Bucchini A, Fratemale D ;2006**. Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. Fitoterapia. 77(4):310–312.
70. **Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G.;1996**. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine 1996,20, (7),933-956.
71. **S.d.sanja, n.r.sheth, n.k.patel, dhaval patel, biraju patel; 2009**. characterization and evaluation of antioxidant activity of *portulaca oleracea*. international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, vol. 1, issue 1, july-sep.

- 72. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F ; 2009.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- 73. Sandhar H K, Kumar B , Prasher S, Tiwari P, Salhan M and Sharma P; 2011.** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*,1 (1), 25-41.
- 74. Sayre LM , Moreira PI, Smith MA, Perry G ; 2008.** Metal ions and oxidative (4): 564- 582. /chlorure. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Académie universitaire.
- 75. Scalbert, A; 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- 76. schauenberg, p. and paris, f; 1977.** *Guide des plantes médicinales*, Milan, Delachaux et niestlé, 1977.
- 77. Smyth T; Ramachandran V. N.; Smyth W. F; 2009.** A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents* 33: 421 - 426.
- 78. Stadtman E. & Berlett, B; 1998.** Reactiveoxygen-mediated protein oxidation in aging and disease.*Drug Metab. Rev*, 36; 225-243
- 79. Stalikas, C. D.; 2007.**Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids Review. *J. Sep. Sci.* 30, 3268 – 3295
- 80. Sultana Bushra, Farooq Anwar , and Muhammad Ashraf ;2009.** Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts 14, 2167-2180; doi: 10.3390/molecules14062167
- 81. Tamer Fouad, M.D; 2003.** Free radicals, Types, sources and damaging reactions, Internal and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F.
- 82. Tang S Y and Halliwell B ; 2010.** Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 1-5.
- 83. Tang Y. et al; 2006.** Arithmetic processing in the brain shaped by cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10775–10780
- 84. Thierry Bal, Damien Debay and Alain Destexhe,** Cortical feedback controls the frequency and synchrony of oscillations in the visual thalamus, 20: 7478-88, (2000)

- 85. Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Toriumi M, Koike K, Kimura Y, Nikaido T, Aoi W, Nishino H. and Takido, M ; 2002.** Anti inflammatory and anti-tumor-promoting effects of cucurbitane glycosides from the roots of *Bryonia dioica*, J Nat Prod, 2002, 65, 179-83.
- 86. Valko M, Rhodes C.I, Moncol I, Izakovic M, Mazur M; 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact 2006, 160, 1-40.
- 87. Vergani L, Floreani M, Russell A, Ceccon M, Napoli E, Cabrell A, Valente L, Bragantini F, Leger B, Dabbeni-Sala F ;2004.** Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. Eur J Biochem. 271 :3646–3656.
- 88. Vermerris W; Nicholson R; 2006.** Isolation and Identification of Phenolic Compounds, Phenolic Compound Biochemistry, Springere-Book 2006; 151-191.
- 89. Wachinger M, Samtleben R, Gerhauser C, Wagner H and Erfle, V ; 1993.** Bryodin, a single-chain ribosome-inactivating protein, selectively inhibits the growth of HIV-1-infected cells and reduces HIV-1 production, Res Exp Med (Berl), 1993, 193, 1-12.
- 90. Walker J.E.M, Saraste M.J, Runswick and N.J.Gay ;1982.** Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. Embo J, 1 (8): 945-51
- 91. Williams,G.M.; 1994.** Interventive prophylaxis of liver cancer. European Journal of Cancer Prevention, 3, 89-99.
- 92. Xiang Q, Gao ,Y,8 cXu,Y.H ;2007.** Capillary electrophoresis-amperometric determination of antioxidant propyl gallate and butylate dhydroxyanisolein foods. Analytical Science, 23(6), 713-717.
- 93. Yen G.C et Duh.P.D ; 1994.** Scavenging effect of methanolic extract of peanut hulls on free radical and active oxygen species.J . Agri. Food Tech., vol42, pp629-632.