

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
Université Mohamed Boudiaf - M'sila

Faculté des Sciences

Département de Microbiologie et de Biochimie

N° :



Domaine : Sciences de nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par :

ADJILA Zohra et AZZOUG Aicha

Intitulé

Etude de l'activité antioxydante des extraits
aqueux et organiques des tubercules
de *Bryonia dioica*.

Soutenu devant le jury composé de :

M^r KHERBACHE Abdallah	MAA (Université de M'sila)	Président
M^{lle} DEHIMI Khadidja	MCA (Université de M'sila)	Rapporteur
M^{me} BOUAZIZ Samia	MAA (Université de M'sila)	Examineur

Année universitaire : 2020 /2021

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions notre Dieu ALLAH, notre créateur de nous avoir donné la force, la volonté, la patience, l'espoir et le courage afin d'accomplir ce travail modeste.

Nous sommes très reconnaissants tout en remerciant chaleureusement l'encadreur M^{lle} Dehimi Khadidja de nous avoir encadrées, d'être disponible, d'être très patiente avec nous tout au long de notre formation et surtout pour ses précieux conseils, que nous ne les oublierons jamais. Toute notre gratitude et nos remerciements aux membres du jury qui nous ont honorés en évaluant ce travail.

Enfin, nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude et nos compliments à nos familles, qui nous ont toujours soutenus en nous donnant force, volonté et surtout leur présence qui nous a toujours encouragés à aller de l'avant. Un grand merci à tous ceux qui ont bien participé et contribué à la bonne mise en œuvre de ce mémoire, sans oublier bien sûr tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation.

ملخص

Bryonia dioica هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة *Cucurbitaceae* ؛ و هو شائع في الجزائر في مناطق التل ويسمى محليا "برستم". يستخدم هذا النبات على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج السرطان والأمراض الالتهابية. تم في هذه الدراسة تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المحضرة من درنات النبات بطرق مختلفة *in vitro*. تم استخلاص المواد النشطة بواسطة أربع مذيبات ذات قطبية مختلفة باستخدام تقنية النقع. تم الحصول على أعلى مردود للاستخلاص في المستخلص المائي (32.75%) ثم المستخلص الميثانولي (3.8%)، بينما أظهر مستخلصي الأسيتون والهكسان مردودا أقل (1.2% و 0.66%، على التوالي). تم العثور على أعلى محتوى من عديدات الفينول في مستخلصي الأسيتون والميثانول (27،05 و 18،90 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك / مغ مستخلص، على التوالي). أشارت النتائج إلى أن مستخلص الأسيتون يحتوي على أعلى كمية من الفلافونويدات (14.36 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين / مغ مستخلص) وكذلك من الدباغ (32.77 ميكروغرام مكافئ حمض التانيك / مغ مستخلص). من بين المستخلصات المدروسة، أظهر مستخلص الميثانول أعلى قدرة إزاحية ضد DPPH ($IC_{50} = 37.27$ مغ/مل) وأفضل قدرة على إرجاع الحديد بقيمة امتصاص قصوى قدرت بـ $A = 0.54$ عند تركيز 6 مغ/مل.

الكلمات المفتاحية : *Bryonia dioica* ، مستخلص مائي، مستخلصات عضوية، نشاطية مضادة للأكسدة، عديدات الفينول، DPPH، FRAP.

Résumé

Bryonia dioica est une plante médicinale appartenant à la famille des *Cucurbitaceae* ; elle est commune en Algérie dans les régions du Tell et appelée localement « Berestom ». Cette plante est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement des cancers et des maladies inflammatoires. Dans cette étude, l'activité antioxydante des extraits préparés à partir des tubercules de la plante est évaluée par différentes méthodes *in vitro*. L'extraction des substances actives est effectuée par quatre solvants à polarités différentes, en utilisant la technique de la macération. Le rendement d'extraction le plus élevé est obtenu pour l'extrait aqueux (32.75%) puis l'extrait méthanolique (3.8%), tandis que les extraits acétonique et hexanique ont montré les rendements les plus faibles (1.2% et 0.66%, respectivement). Les teneurs les plus élevées en polyphénols se trouvent dans les extraits acétonique et méthanolique (27.05 et 18.90 ug équivalent d'acide gallique /mg d'extrait, respectivement). Les résultats indiquent que l'extrait acétonique possède la teneur la plus élevée en flavonoïdes (14.36 ug équivalent quercétine/mg d'extrait) et aussi en tannins (32.77 ug équivalent d'acide tannique /mg d'extrait). Parmi les extraits étudiés, l'extrait méthanolique possède le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé contre le DPPH ($IC_{50} = 37.27$ mg/ml) et la meilleure capacité à réduire le fer avec une valeur d'absorbance maximale de $A = 0.54$ à une concentration de 6 mg /ml.

Mots clés : *Bryonia dioica*, extrait aqueux, extraits organiques, activité antioxydante, polyphénols, DPPH, FRAP.

Abstract

Bryonia dioica is a medicinal plant belonging to the Cucurbitaceae family; it is common in Algeria in the Tell regions and locally called « Berestom ». This plant is widely used in traditional medicine for the treatment of cancers and inflammatory diseases. In this study, the antioxidant activity of extracts prepared from the tubers of the plant is evaluated by different in vitro methods. The extraction of active substances is carried out by four solvents with different polarities, using the technique of maceration. The highest extraction yield is obtained for aqueous extract (32.75%) then methanolic extract (3.8%), while acetonc and hexanic extracts showed the lowest yields (1.2% and 0.66%, respectively). The highest levels of polyphenols are found in acetonc and methanolic extracts (27.05 and 18.90 ug equivalent of gallic acid/mg extract). The results indicate that acetonc extract has the highest flavonoids content (14,36 ug quercetin equivalent/mg extract) and also tannins content (32,77 ug tannic acid equivalent/mg extract). Among studied extracts, methanolic extract has the highest anti-radical power against DPPH ($IC_{50} = 37.27$ mg/ml) and the best capacity to reduce iron with a maximal absorbance value of $A = 0.54$ at a concentration of 6 mg/ml.

Keywords: *Bryonia dioica*, aqueous extract, organic extracts, antioxidant activity, polyphenols, DPPH, FRAP.

Listes des figures

Figure	Titre	Page
1	Structure du noyau phénol	11
2	Structure de dérivés de l'acide hydroxy benzoïque	11
3	Structure de dérivés de l'acide hydroxycinnamiques	12
4	Structures chimiques des principales familles des flavonoïdes	13
5	Structure de base des tannins condensés	14
6	Structure de base des tannins hydrolysables	14
7	La plante <i>Bryonia dioica</i>	16
8	Extraction aqueuse à partir des tubercules de <i>Bryonia dioica</i>	18
9	Extraction organique à partir des tubercules de <i>Bryonia dioica</i>	19
10	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	21
11	Courbe d'étalonnage de la quercétine	22
12	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.	23
13	Activité anti-radicalaire de la quercétine contre le DPPH.	29
14	Les concentrations des extraits de <i>Bryonia dioica</i> inhibitrices de 50 % du radical DPPH (IC50).	29
15	Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique	30
16	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Bryonia dioica</i> par la méthode de FRAP	31

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Composition en métabolites secondaires de différentes parties de <i>Bryonia dioica</i>	5
2	Rendements des extractions aqueuse et organique à partir les tubercules de <i>Bryonia dioica</i> .	25
3	Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins totaux des extraits de <i>Bryonia dioica</i> .	27

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AlCl_3 : Trichlorure d'Aluminium.

DMSO : Diméthyle sulfoxyde.

DPPH : 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl.

EAG : Equivalant d'acide gallique.

EAT : Equivalant d'acide tannique.

EQ : Equivalant de quercétine.

FeCl_3 : Chlorure de fer.

FRAP : Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (Ferric reducing /antioxidant power).

GPX : Glutathion peroxydase.

H_2O_2 : Peroxyde D'hydrogène.

IC_{50} : Concentration inhibitrice de 50%.

I% : Pourcentage d'inhibition.

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide hydrogéné.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NOS : Oxyde Nitrique Synthase.

Na_2CO_3 : Carbonate de Sodium.

NO : Monoxyde d'azote.

$\text{OH}\cdot$: Radical hydroxyle.

$\text{O}\cdot^-$: Anion Superoxyde.

$\text{ONOO}\cdot$: Peroxynitrite.

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet.

ROS : Reactive Oxygen Species (dérivés réactifs de l'oxygène).

SOD : Superoxyde dismutase.

UV : Ultraviolet.

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

XO : Xanthine oxydase.

Sommaire

Remerciements

ملخص

Résumé

Abstract

Listes des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction1

Chapitre 1 : Revue bibliographique.

1- La plante *Bryonia dioica*.....2

1.1- La famille des *Cucurbitaceae*2

1.2- Le genre *Bryonia* (Bryone)2

1.2.1- Morphologie2

1.2.2- Les espèces Algériennes du genre *Bryonia*2

1.3- L'espèce *Bryonia dioica*3

1.3.1- Description botanique3

1.3.2- Classification3

1.3.3- Composition chimique3

1.3.4- Intérêts thérapeutiques4

2-Les radicaux libres et le stress oxydant6

2.1- Les radicaux libres.....6

2.1.1- Définition6

2.1.2- Les principaux radicaux libres et ROS6

2.1.2.1- Le radical hydroxyle (OH[•]).....6

2.1.2.2- Le monoxyde d'azote (NO).....6

2.1.2.3- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxygène singulet (1O₂)6

2.1.2.4- Le radical superoxyde (O₂^{•-})7

2.1.3- Les sources des radicaux libres7

2.1.3.1- Origine endogène7

2.1.3.2- Origine exogène8

2.1.4- Rôles biologiques des radicaux libres.....8

2.2- Le stress oxydant8

2.2.1- Définition8

2.2.2- Les dégâts oxydatifs cellulaires.....8

2.2.2.1- Peroxydation des lipides.....8

2.2.2.2- Oxydation des protéines	8
2.2.2.3- Oxydation de L'ADN.....	9
2.2.3- Maladies liées au stress oxydant.....	9
3- les antioxydants	9
3.1- Définition	9
3.2- Les types d'antioxydants.....	9
3.2.1- Les antioxydants enzymatiques	9
3.2.1.1- La superoxyde dismutase (SOD)	9
3.2.1.2- La catalase	10
3.2.1.3- La glutathion peroxydase (GPX)	10
3.2.2- Les antioxydants non enzymatiques	10
3.2.2.1- L'acide ascorbique	10
3.2.2.2- La vitamine E.....	10
3.2.2.3- Le β carotène.....	10
3.2.2.4- Le sélénium.....	10
4- Les polyphénols	11
4.1- Définition	11
4.2.1- Les acides phénoliques.....	11
4.2.1.1- Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque	11
4.2.1.2- Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique	12
4.2.2- Les flavonoïdes.....	12
4.2.3- Les tannins.....	13
4.2.3.1- Les tannins condensés	13
4.2.3.2- Les tannins hydrolysables	14
4.3- Biosynthèse des polyphénols	14
4.3.1- La voie de Shikimate	14
4.3.2- La voie d'acétate-malonate	15
4.4- Les activités biologiques des polyphénols	15

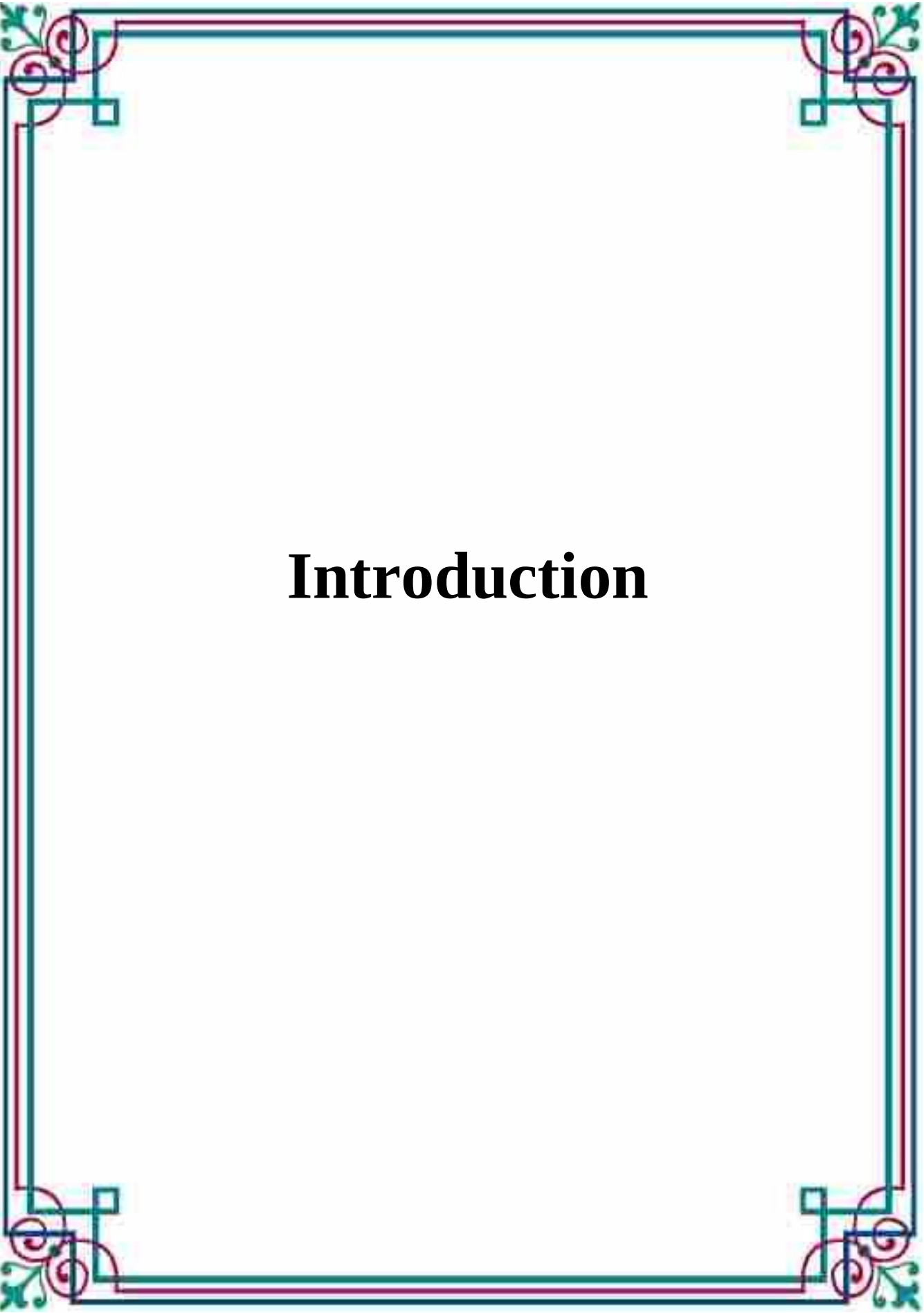
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1- Matériel.....	16
1.1- Matériel végétal.....	16
1.2- Produits chimiques	17
2. Méthodes.....	17
2.1. Préparation des extraits	17
2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux	17

2.1.2. Préparation des extraits organiques.....	17
2.2. Etude phytochimique	20
2.2.1- Les flavonoïdes.....	20
2.2.2 Les tanins.....	20
2.2.3 Les quinones	20
2.2.4 Les terpénoïdes	20
2.3- Dosages de quelques métabolites secondaires	20
2.3.1- Dosage des polyphénols totaux	20
2.3.2- Dosage des flavonoïdes.....	21
2.3.3- Dosages des tannins totaux	22
2.4- Etude de l'activité antioxydante des extraits de <i>Bryonia dioica</i>	23
2.4.1- Test de DPPH	23
2.4.2- Test de réduction du fer (FRAP)	24
2.5- Etude statistique	24

Chapitre 3 : Resultats et Discussion

1- Extraction	25
2- Etude phytochimique	26
3- Dosage des composés phénoliques de la plante	26
4-Activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de <i>B. dioica</i>	28
4.1- Piégeage du radical DPPH	28
4.2-Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)	30
Conclusion	33
Références	34



Introduction

Depuis des milliers d'années, les humains utilisent des plantes médicinales pour traiter et combattre les maladies, cependant, l'utilisation des plantes médicinales était pratiquée par expérience, mais sans savoir quelles sont leurs actions bénéfiques. Aujourd'hui, avec les progrès de la science, la séparation, l'identification et la quantification des molécules responsables des effets pharmacologiques de ces plantes devient très facile (Sekkoum et *al.*, 2014). Actuellement, plus de 30% des médicaments contiennent des principes actifs de sources naturelles (Odile et Daniel, 2007).

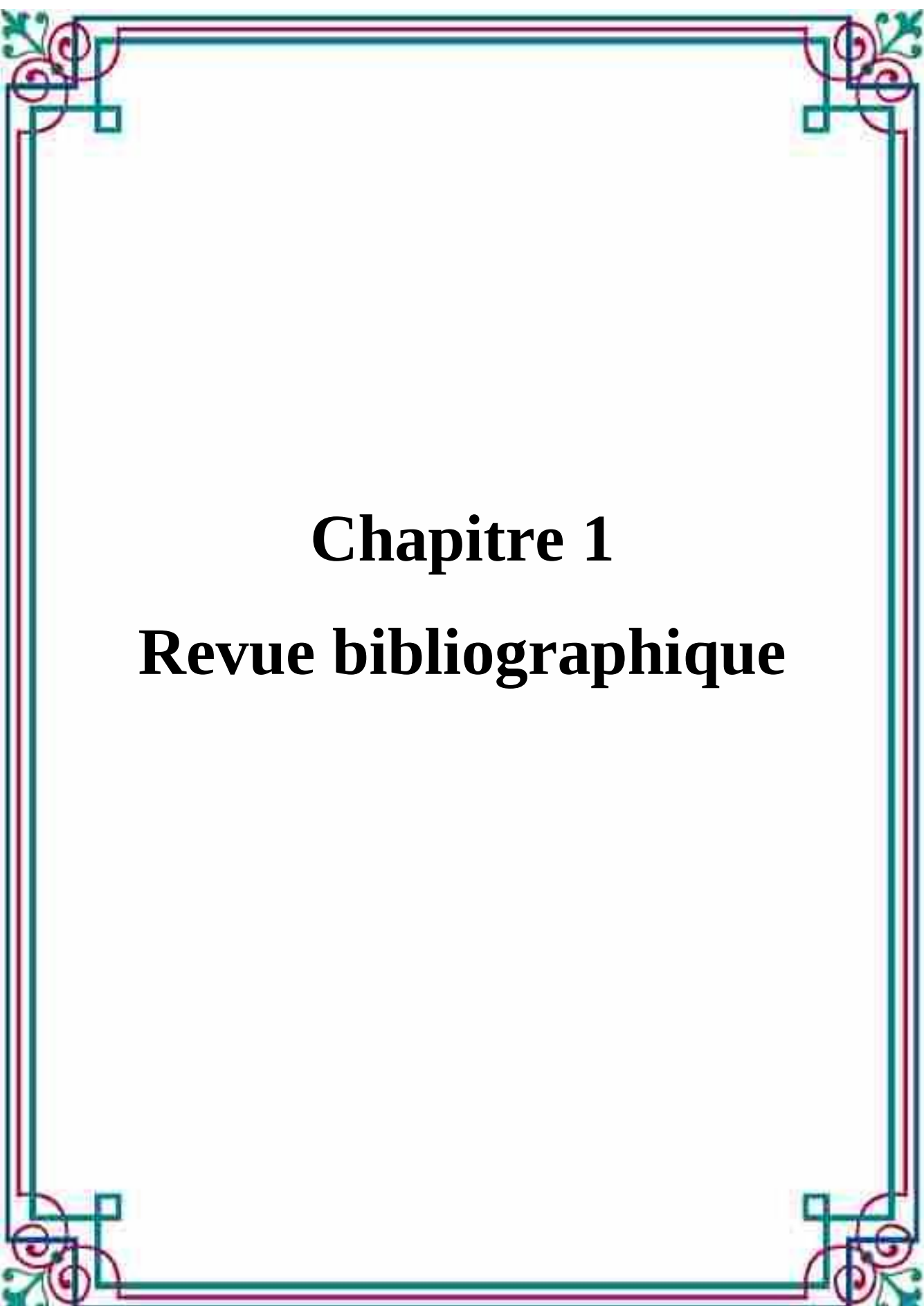
Les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal. Ils sont particulièrement importants à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. Ces composés sont connus pour leurs diverses activités biologiques, à savoir l'activité antioxydante (Koechlin, 2006).

Le stress oxydant correspond à la production excessive des espèces réactives de l'oxygène et/ou le manque de micronutriments antioxydants ou des cofacteurs du système enzymatique antioxydant (Reimund, 2002). Cependant, un stress oxydatif accru peut causer des destructions des tissus et dommages à la structure cellulaire (Pincemail et *al.*, 2002). Les antioxydants naturels jouent un rôle très intéressant dans la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif (Vârban et *al.*, 2009).

Bryonia dioica, connue sous le nom de « Berestom » en Algérie, appartient à la famille des Cucurbitacées, qui comportent des molécules cytotoxiques appelées cucurbitacines (Sallam et *al.*, 2010). Elle est commune dans le Tell en Algérie, ses racines sont prises par voie orale, seules ou mélangées avec différents ingrédients d'origine non végétale tels que l'eau ou le miel pour traiter plusieurs types de cancers et les maladies inflammatoires (Benarba, 2015). L'espèce *B. dioica* de la région de M'sila est étudiée pour la première fois dans ce travail, dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la région.

L'objectif principal de notre travail est d'étudier l'activité antioxydante des extraits à partir des tubercules de la plante médicinale *Bryonia dioica*. Cette étude est une contribution à :

- Préparation des extraits à partir des tubercules de la plante étudiée.
- Dosage spectrophotométrique des substances biologiquement actives (composés phénoliques).
- Evaluation de la capacité antioxydante des différents extraits de la plante par le test au DPPH et la méthode de FRAP.



Chapitre 1

Revue bibliographique

1- La plante *Bryonia dioica*

1.1- La famille des *Cucurbitaceae*

Les cucurbitacées sont une grande famille de plantes herbacées, annuelles ou vivaces, et rarement des arbustes, avec environ 800 espèces réparties en 120 genres (Yasir et *al.*, 2016), distribuées dans les régions tropicales et subtropicales du monde. La plupart des espèces de cette famille sont utilisées en alimentation (courges, courgettes, concombres, cornichons, melons, pastèques ...). Plusieurs espèces appartenant à cette famille sont à l'origine d'intoxications, leur toxicité est en effet liée à des terpènes tétracycliques et aux cucurbitacines (Bruneton, 2005).

1.2- Le genre *Bryonia* (Bryone)

1.2.1- Morphologie

Le genre *Bryonia* renferme seulement des plantes herbacées. La bryone possède une racine charnue, volumineuse, parfois bifurquée, ressemblant à un très gros navet, d'odeur nauséuse, de saveur âcre, amère et caustique.

Les tiges, à port de liane, peuvent atteindre 5 mètres et s'enroulent sur divers supports grâce à de longues vrilles. Les feuilles, couvertes de poils rudes, sont lobées, en forme de cœur.

La plante fleurit du Mai à Août et elle est dioïque avec deux sortes de pieds, les uns porteurs de fleurs stériles, les autres, avec des fleurs, petites, blanc-jaunâtre, groupées par deux ou trois, insérées au même niveau qu'une vrille et qu'une feuille.

Le fruit est une petite baie globuleuse de la taille d'un pois, verte puis rouge vif à maturité, renfermant 3 à 6 graines brunes, aplaties, lisses, de 7 à 8 mm avec couleur jaune puis brunâtre (Garnier et *al.*, 1961 ; Hammiche et *al.*, 2013).

1.2.2- Les espèces Algériennes du genre *Bryonia*

Il existe deux espèces du genre *Bryonia* en Algérie (Quezel et Santa, 1963) :

- *Bryonia acuta*.
- *Bryonia dioica*.

1.3- L'espèce *Bryonia dioica*

1.3.1- Description botanique

Bryonia dioica est une plante vivace dioïque, à racine charnue et volumineuse. Les tiges sont érigées, grimpantes, grêles, pourvues de vrilles simples très longues. Les feuilles sont palmatilobées, scabres et cordiformes. Les fleurs sont petites, blanc-jaunâtres, en inflorescences longuement pédonculées. Étamines 5 dont 4 sont soudées. Fruits ovales, petits, de 6 à 8 mm, rouges à maturité (Quezel et Santa, 1963).

1.3.2- Classification

La plante *Bryonia dioica* est connue en Algérie sous les noms vernaculaires Querioua et Fashira dans quelques régions et sous le nom de Berestom dans d'autres régions comme M'sila. Il est à noter que ce nom vernaculaire (Berestom) est utilisé aussi dans d'autres régions pour désigner une autre plante médicinale dite *Aristolochia*. L'espèce *Bryonia dioica* est commune en Algérie dans les régions du Tell et plus rare ailleurs. Elle pousse parmi les broussailles surtout sous les Jujubiers et dans les forêts (Chenni et *al.*, 2012). La classification de la plante étudiée est comme suit (Quezel et Santa, 1963) :

Règne : Végétal

Sous règne : Trachéophytes

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Ordre : Cucurbitales

Famille : Cucurbitacées

Genre : *Bryonia*

Espèce : *Bryonia dioica*

1.3.3- Composition chimique

Les études phytochimiques sur l'espèce *B. dioica* ont montré que la partie aérienne contient des flavones C-glycosides (la vitexine, l'isovetexine, l'isoorientine, le saponarine et l'utonarine), des caroténoïdes, le tocophérol, l'acide ascorbique, l'acide oxalique, l'acide malique, l'acide citrique et l'acide fumarique. Le fruit mature de la bryone contient environ 8,72% de sucres totaux dont 2,95% glucose ; 3,24% fructose ; 2,19% sucrose ; 0,35%

tréhalose et 1,90% de lipides totaux dont 17,21% d'acides gras saturés et 53,91% d'acides gras polyinsaturés essentiellement l'acide linoléique (50,49%), l'acide oléique (28,47%) et l'acide palmitique (11,60%) (Rafael et *al.*, 2011). Il contient en plus une protéine très toxique dite la bryodifine. Les racines de la plante renferment des composés tri et tétra-terpènes cycliques oxygénés appelés cucurbitacines, des triterpènes glycosidiques, des lipides, une glycoprotéine appelée bryodine, l'acide bryonolique, des phytostérols, la bryonine et la bryonicine qui sont respectivement une saponine et un alcaloïde amorphe et amer (Tableau 1) (Sturm et Stuppner, 2000 ; Ukiya et *al.*, 2002 ; Barker et *al.*, 2010).

1.3.4- Intérêts thérapeutiques

En médecine traditionnelle, *B. dioica* est connue par ses propriétés anti-tumorales et anti-inflammatoires. Elle est utilisée pour le traitement des affections rhumatismales, les bronchites et les pleurésies. Pour l'activité anticancéreuse, la poudre des racines est mélangée avec du miel et utilisée contre plusieurs types de cancer surtout le cancer de colon et de sein (Barker et *al.*, 2010). La plante possède aussi des propriétés purgatives et diurétiques (Le Floch, 1983). Quelques études ont confirmé certaines activités de la plante comme l'activité anti-inflammatoire des triterpènes glycosidiques des racines (Ukiya et *al.*, 2002) et l'activité anti-VIH (Wachinger et *al.*, 1993).

Tableau 01 : Composition en métabolites secondaires de différentes parties de *Bryonia dioica* (Chekroun, 2016).

Partie de la plante	Métabolites secondaires
Racine	-Saponine : bryonine -Hétérosides triterpéniques : bryodulcoside, bryoside, cucurbitacine, bryonidine, bryonosides A à G, cabenoside D, le bryoamaride et l'acide bryonolique.
Tige et feuille	-Alcaloïde : bryonicine
Fruit	-Flavonoïdes : 5 flavones et 9 flavonoles : Apigenine-C-hexoside-O-hexoside Apigenine-6-C-glucoside-8-C-glucoside Apigenine-6-C-glucoside-7-O-glucoside Apigenine-C-hexoside-O-hexoside Apigenine-6-C-glucoside Quercetine-O-hexoside Quercetine-O-rhamnosyl-pentoside Quercetine-O-rhamnosyl-rhamnoside Quercetine-3-O-neohesperidoside Kaempferole-O-pentosyl-rhamnoside Kaempferole-O-pentosyl-rhamnoside Kaempferole-O-rhamnosyl-hexoside-O-rhamnoside Kaempferole-3-O-neohesperidoside Kaempferole-3,4-di-O-rhamnoside

2-Les radicaux libres et le stress oxydant

2.1- Les radicaux libres

2.1.1- Définition

Un radical libre est une espèce chimique, molécule ou simple atome, contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur une orbitale. Il se distingue par un demi de vie très courte et une grande réactivité. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acception d'un autre électron ou le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Goudable et Favier, 1997). On retrouve aussi les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) qui sont des dérivés de l'oxygène, possédant des électrons dont l'état énergétique est excité et très réactionnel (Benhamdi et *al.*, 2014).

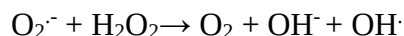
2.1.2- Les principaux radicaux libres et ROS

2.1.2.1- Le radical hydroxyle (OH·)

Le radical hydroxyle est produit à partir la réaction entre le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les ions Fe²⁺ selon la réaction de Fenton (Djenidi, 2019) :

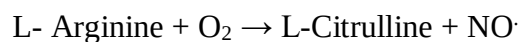


Il y'a aussi un mécanisme réactionnel dit réaction d'Haber et Weiss qui peut produire le radical hydroxyle à partir la réaction entre le peroxyde d'hydrogène avec le radical superoxyde selon l'équation suivante (Djenidi, 2019) :



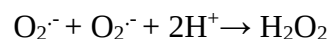
2.1.2.2- Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique est un radical libre produit par les différents types cellulaires (ubiquitaire). Il est produit par l'enzyme NOS à partir de l'arginine et l'oxygène selon la réaction suivante (Belkheiri, 2010 ; Guillouty, 2016) :



2.1.2.3- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxygène singulet (1O₂)

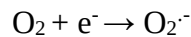
Le peroxyde d'hydrogène est produit par la dismutation de l'anion superoxyde, cette réaction est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) :



Il est beaucoup plus stable et a la capacité de traverser les membranes cellulaires (Coriat, 2012). L'oxygène singulet est produit par la réaction des radicaux peroxy au cours de la peroxydation lipidique. Il possède deux électrons non appariés et hautement oxydatifs (Tissier, 2011).

2.1.2.4- Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

Le radical libre superoxyde, chargé négativement, possède une réactivité plus faible. Il est produit par la réduction du dioxygène lors de la respiration cellulaire selon la réaction suivante (Tissier, 2011) :



2.1.3- Les sources des radicaux libres

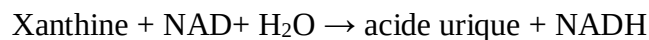
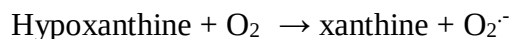
2.1.3.1- Origine endogène

A- Les mitochondries

Ces organites sont la principale source des radicaux libres, elles produisent environ 90% des ROS cellulaires. Elles forment le lieu principal de la consommation de l'oxygène, qui est réduit en eau, alors qu'une proportion d' O_2 est transformée en ROS tels que l'anion superoxyde, ces réactions se produisent en présence de plusieurs enzymes telles que la NADH déshydrogénase (Kadeche, 2018).

B- La xanthine oxydase

La xanthine oxydase produit l' $O_2^{\cdot-}$ par la réduction de l'hypoxanthine en xanthine et celle-ci en acide urique (Dwassy, 2014), selon les réactions suivantes (Favier, 2003) :



C- La NADPH oxydase

La NADPH oxydase est une enzyme qui catalyse la production de l'anion superoxyde selon la réaction suivante (Babior, 1999) :



D- L'enzyme NOS (Nitric oxide synthase)

Les NO synthases sont à l'origine de la synthèse du radical $NO^{\cdot}$, elles peuvent aussi donner des anions superoxyde (Landmesser et *al.*, 2003).

E- L'auto-oxydation des petites molécules

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones produit souvent l'anion superoxyde (Dwassy, 2014).

2.1.3.2-Origine exogène

Il existe plusieurs sources exogènes de radicaux libres telles que les diverses pollutions, les produits chimiques, les radiations UV, les infections pathogènes, certaines carences nutritionnelles, les insecticides et la fumée (Kadeche, 2018).

2.1.4- Rôles biologiques des radicaux libres

Les radicaux libres jouent des rôles importants dans la réaction immunitaire, ils activent la NADPH oxydase, la superoxyde dismutase (SOD) et la NO synthase (NOS), conduisant ainsi à la formation de l'anion superoxyde, l' H_2O_2 , le $\text{OH}^\cdot$ et d'autres radicaux libres. L'acide hypochlorique (HOCl), quant à lui, est l'oxydant bactéricide le plus puissant durant la phagocytose. De plus, ces radicaux jouent des rôles dans la transmission du signal intra- et intercellulaire. L'expression de certains gènes est aussi régulée par quelques radicaux libres (Favier, 2003).

2.2- Le stress oxydant

2.2.1- Définition

C'est un déséquilibre entre la formation des radicaux libres et la capacité du corps à les neutraliser (Fraipont et Preiser, 2017).

2.2.2- Les dégâts oxydatifs cellulaires

2.2.2.1- Peroxydation des lipides

Les premières cibles des ROS sont les lipides en raison de leur sensibilité résultant de leur insaturation (possèdent les acides gras polyinsaturés). La peroxydation des lipides produit les peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. Elle produit des modifications de la fluidité, la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Garait, 2006).

2.2.2.2- Oxydation des protéines

Les modifications oxydatives des protéines par les ROS provoquent l'introduction d'un groupe carboxyle dans la protéine. Il existe deux classes de réactions d'oxydations des protéines : la première qui casse les liaisons peptidiques et modifie la chaîne peptidique, l'autre qui peut modifier les peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation

lipidique. Ces modifications causent la perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Rouaki, 2016).

2.2.2.3- Oxydation de L'ADN

L'ADN mitochondrial est la cible privilégiée des oxydations par les ROS par rapport à l'ADN nucléaire. Les réactions d'oxydation de l'ADN provoquent plusieurs dommages sur l'ADN qui peuvent être classés en deux types : les lésions des bases purines et pyrimidines par l' $\text{OH}^\cdot$ et peroxynitrite dont la cible privilégiée de nombreux oxydants est la guanine (8-oxo-7,8dihydro-2'-deoxyguanosine), ainsi que la modification de bases par la fixation de produits secondaires, par exemple : l'ajout du groupe amine par les aldéhydes réactifs issue de la peroxydation lipidique (Rouaki, 2016).

2.2.3- Maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est la cause initiale de plusieurs maladies (Monogens, 2013) :

- Mutagénèse et cancérogénèse.
- Le vieillissement cellulaire.
- Sénescence et affections neuro-dégénérative (comme la maladie d'Alzheimer).
- Le diabète et l'hyperglycémie.
- Cataractes.
- Maladies inflammatoires.
- Les pathologies vasculaires et cardiaques.

3- les antioxydants

3.1- Définition

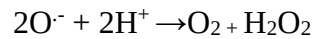
L'antioxydant est une substance à faible concentration, qui a la capacité d'entrer en compétition avec des substrats oxydables et retarder ou empêcher leur oxydation (Tanoh et *al.*, 2018).

3.2- Les types d'antioxydants

3.2.1- Les antioxydants enzymatiques

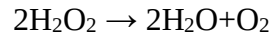
3.2.1.1- La superoxyde dismutase (SOD)

Les SOD sont des métalloprotéines qui représentent une des premières lignes de défense contre les oxydants. Elles assurent la catalyse de la dismutation mono-électronique du $\text{O}_2^\cdot$ en dioxygène et H_2O_2 (Hamma et *al.*, 2015).



3.2.1.2- La catalase

C'est une hémoprotéine qui décompose le H_2O_2 en H_2O et O_2 . Elle est localisée dans les peroxysomes (Medjeldi marzougui, 2012). L'activité de la catalase est liée avec la concentration (Guillouty, 2016).



3.2.1.3- La glutathion peroxydase (GPX)

Les GPX sont des séléno-protéines qui peuvent réduire le peroxyde d'hydrogène et les hydro-péroxydes de lipides en H_2O et en alcools lipidiques, respectivement (Hamma et *al.*, 2015).

3.2.2- Les antioxydants non enzymatiques

3.2.2.1- L'acide ascorbique

C'est le meilleur piègeur des ROS. Il empêche la peroxydation lipidique par renouvellement de la vitamine E. Il a plusieurs fonctions au système immunitaire, synthèse du collagène et des globules rouges, aussi dans le métabolisme de fer (Haleng et *al.*, 2007).

3.2.2.2- La vitamine E

C'est un ensemble d'isomères, les tocophérols et tocotriénols, son rôle est la formation d'un radical tocophéryle à partir de la réaction avec le radical peroxy ($\text{ROO}^\cdot$), elle inhibe aussi la propagation de la peroxydation lipidique (Haleng et *al.*, 2007).

3.2.2.3- Le β carotène

C'est le précurseur de la vitamine A. Il a la capacité de piéger l'oxygène singulet, et peut inhiber les réactions en chaîne de lipo-péroxydation (Goudable et Favier, 1997).

3.2.2.4- Le sélénium

C'est un oligoélément qui se trouve dans les aliments riches en protéines animales et certains fruits secs, il joue un rôle de cofacteur de la glutathion peroxydase et réduit l'oxydation des lipoprotéines, d'ADN et des lipides (Bennamara, 2017).

4- Les polyphénols

4.1- Définition

C'est le groupe le plus présent chez les végétaux (8000 structures), sont caractérisés par des propriétés biologiques (antioxydantes par exemple). Leur structure de base est constituée d'un cycle aromatique hydroxylé, le phénol (Figure 1) (Matou, 2019).

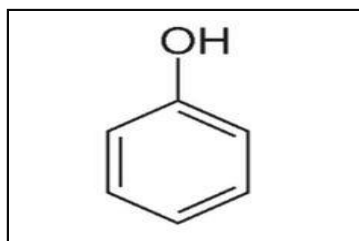


Figure 01 : Structure du noyau phénol (Matou, 2019).

4.2- Classification des polyphénols

Les principaux groupes des polyphénols sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins.

4.2.1- Les acides phénoliques

Ce sont des composés organiques avec au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Il existe deux types (Benhammou, 2011) :

4.2.1.1- Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque

Ces acides phénols sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque en C₆-C₁, ce sont très communs soit sous forme libre ou liée à l'état d'ester ou d'hétéroside (Figure 2).

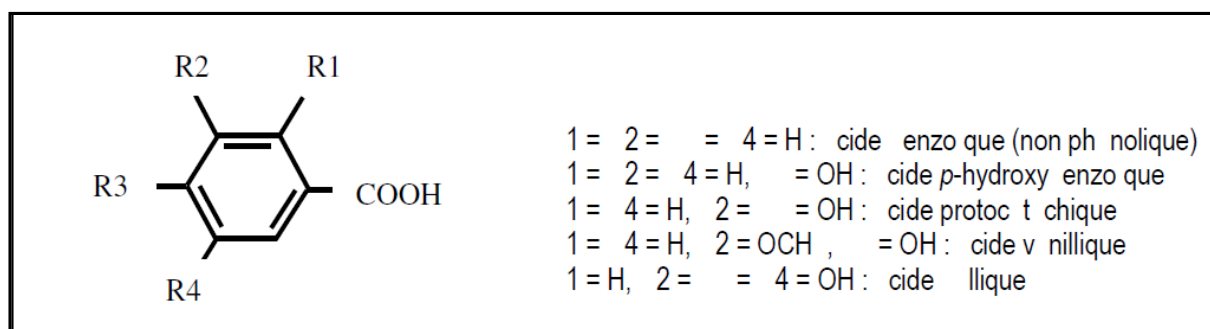


Figure 02 : Structure chimique des acides hydroxy-benzoïques (Achat, 2013).

4.2.1.2- Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

Les acides phénols en C₆-C₃ ont une large distribution (acide p-coumarique, caféique, ...), les autres (acide o-coumarique, acide férulique) sont peu fréquents. Les acides cinnamiques et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés phénol-propaniques qui varient par le degré d'hydroxylation et méthyoxylation (Figure 3).

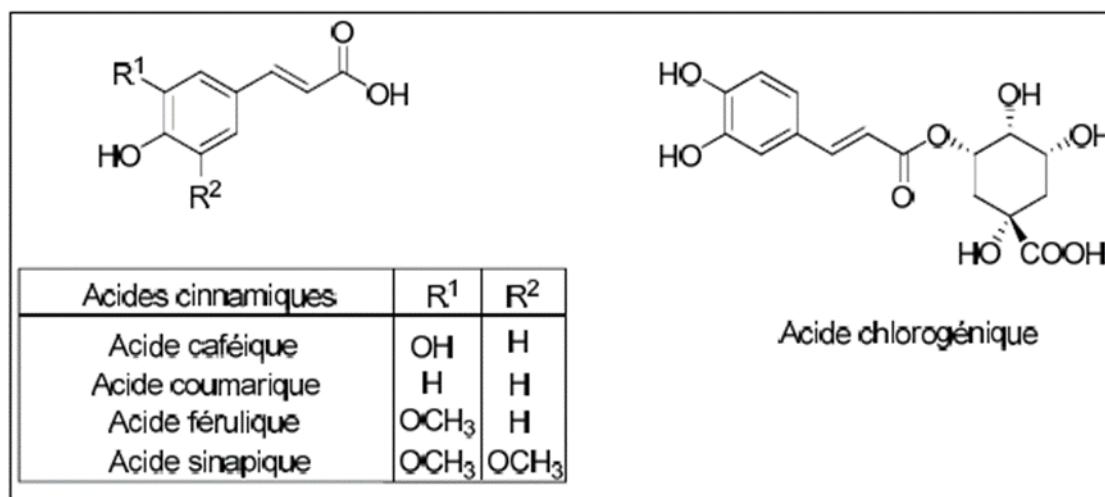


Figure 03 : Structure de dérivés de l'acide hydroxycinnamiques (Belkheiri, 2010).

4.2.2- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des micronutriments qui jouent un rôle d'antioxydants et possèdent différentes propriétés biologiques. Ils ont tous la même structure chimique de base, squelette de quinze atomes de carbones, constitué de deux cycles aromatiques A et B qui sont liés entre eux par un hétérocycle C₃, formant ainsi une structure C₆-C₃-C₆. Il existe plusieurs familles de flavonoïdes selon la position des substitutions dans la structure de base, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7 (Figure 4) (Talbi et *al.*, 2015).

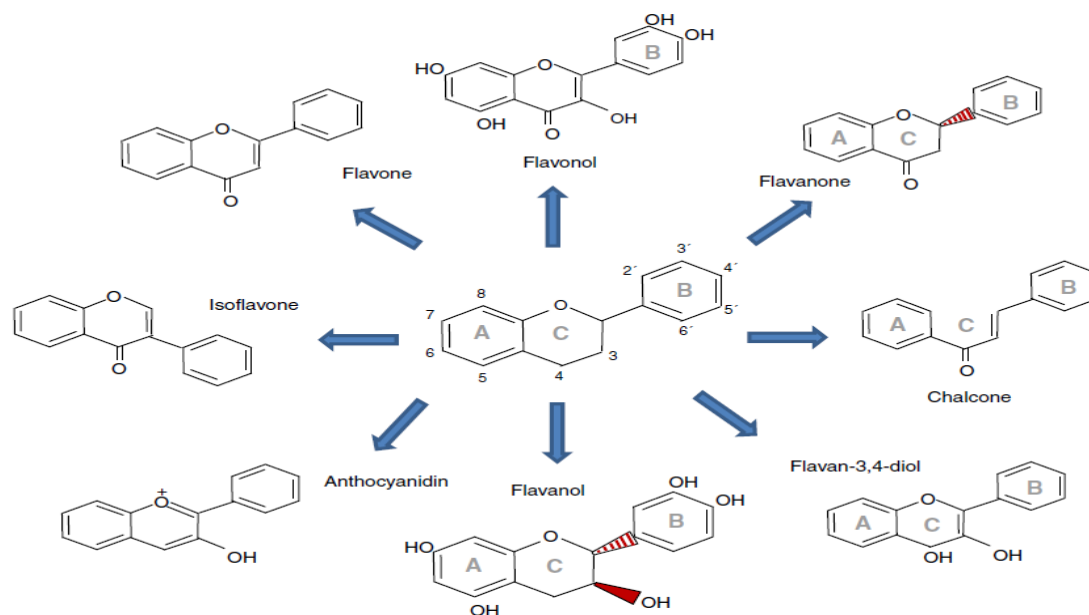


Figure 04 : Structures chimiques des principales familles des flavonoïdes
(Fraga et Oteiza, 2011).

4.2.3- Les tannins

Ce sont des polyphénols à un poids moléculaire très élevé. Ils sont plus hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont liés aux glucides et aux protéines. Selon leur structure, les tannins sont subdivisés en deux groupes (Muanda, 2010) :

4.2.3.1-Les tannins condensés

Les tanins condensés (proanthocyanidines ou procyanidines) sont des polyphénols de haute masse molaire, résultant de la polymérisation enzymatique ou auto-oxydative des unités de flavan-3,4-diol liées par les liaisons C4-C8 ou bien C4-C6 (proanthocyanidines de type B). D'autre part, quand cette condensation est produite entre les unités adjacentes par des liaisons C4-C8 et une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, ces proanthocyanidines sont donc de type A (Figure 5).

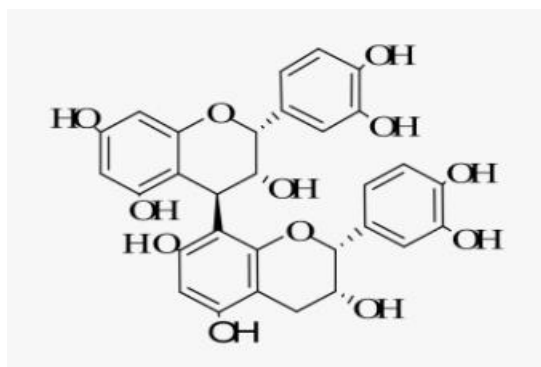


Figure 05 : Structure de base des tannins condensés (Talbi et *al.*, 2015).

4.2.3.2- Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des dimères d'acide gallique concentrés sur un dérivé glycosyle (Figure 6). Hydrolysables vient du mot hydrolyse, donc ces tannins peuvent subir facilement une hydrolyse (acide / basique), ou encore une hydrolyse enzymatique.

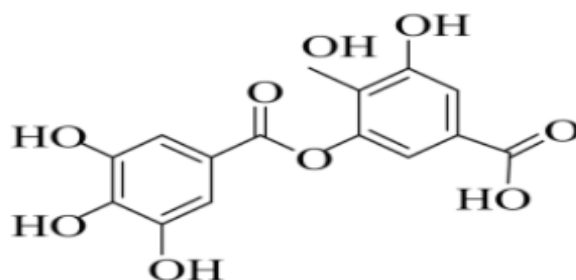


Figure 06 : Structure de base des tannins hydrolysables (Talbi et *al.*, 2015).

4.3- Biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies :

4.3.1- La voie de Shikimate

La condensation de l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate conduit à la formation de l'acide shikimique. Ce dernier est transformé en acide chorismique qui à son tour va être transformé en acide cinnamique. Ces composés sont à l'origine des composés phénoliques (C₆-C₁) formant les tannins hydrolysables et la chalcone qui est la molécule de base des flavonoïdes et des tannins condensés (Madi, 2018).

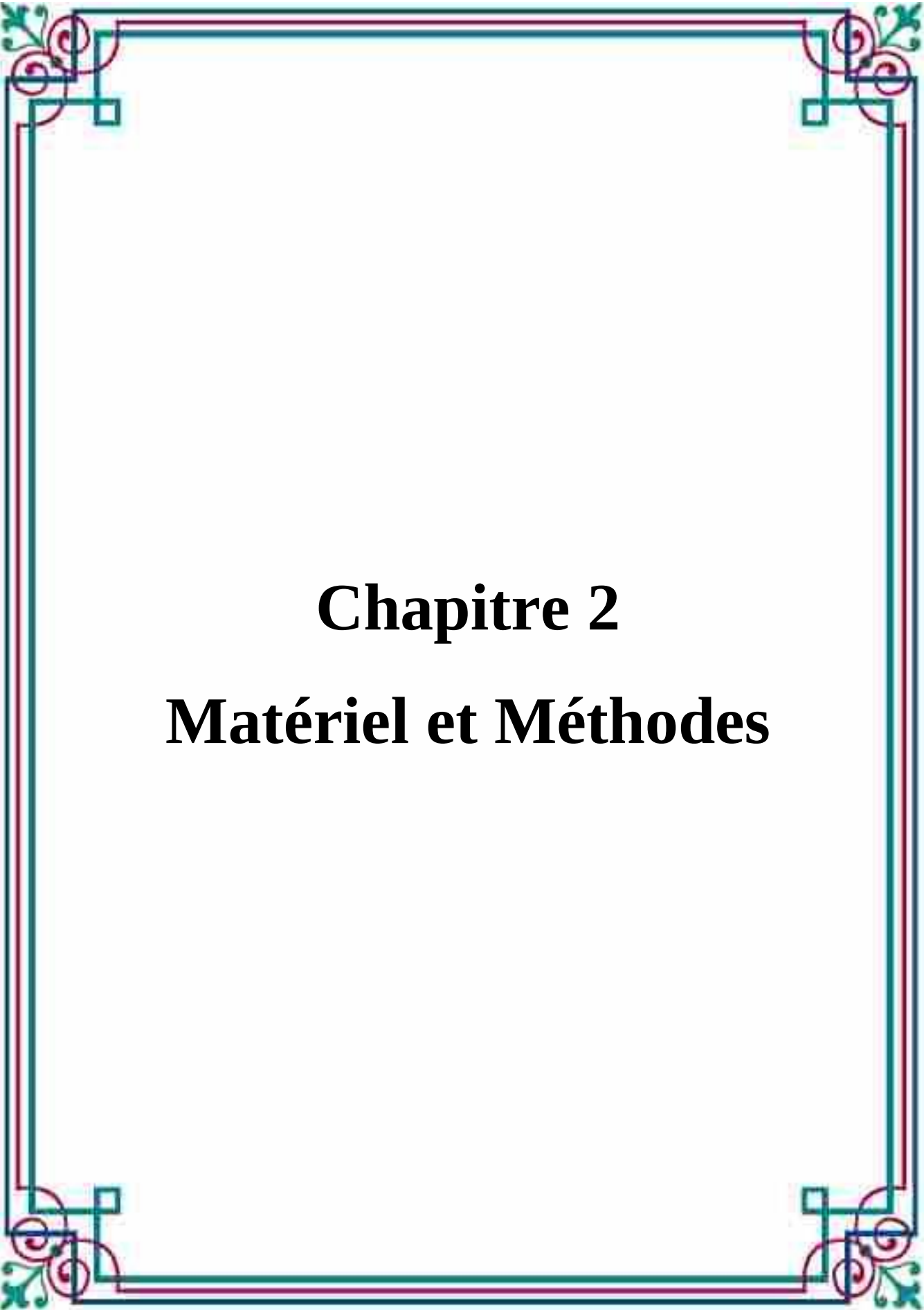
4.3.2- La voie d'acétate-malonate

La formation des composés phénoliques par la voie d'acétate-malonate suite à une condensation de deux malonyl CoA et une molécule d'acétyl CoA qui forme une chaîne latérale, cette chaîne se cyclise ensuite (Zeghad, 2018).

Les deux voies se condensent pour créer une autre voie mixte responsable de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes (Zeghad, 2018).

4.4- Les activités biologiques des polyphénols

Le rôle des composés phénoliques est largement démontré dans la protection contre nombreuses pathologies grâce à leurs propriétés antioxydantes, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-radicalaires, antiallergiques, antibactériennes, antivirales, anti-estrogéniques, antiathérogènes et anti-thrombotiques. Ces activités sont dues à leur capacité d'interagir avec certaines enzymes, hormones, neurotransmetteurs et d'autres facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies (Martin et Andriantsitohaina, 2002 ; Ali et *al.*, 2007 ; Falleh et *al.*, 2008 ; Chew et *al.*, 2009).



Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1- Matériel

1.1- Matériel végétal

La plante *Bryonia dioica* (Figure 7) a été récoltée la fin du mois de Mars 2021 dans la région du Beni Yalmane à M'sila. Elle a été identifiée par Pr. Laouar Hocine (Laboratoire de valorisation des ressources biologiques, Université Ferhat Abbas-Sétif 1). Les tubercules ont été récupérés, lavés, écaillés, coupés en couches fines, séchés à l'obscurité pendant 7 jours et broyés pour obtenir une poudre d'une couleur jaunâtre qui sera utilisée pour l'extraction.



A



C



B

Figure 07 : La plante *Bryonia dioica*. A : Plante poussant entre les roches sous Jujubier, B : Partie aérienne et tubercules de la plante, C : Fleurs de *B. dioica* (Plante photographiée par l'auteur).

1.2- Produits chimiques

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : Le méthanol pur (CH_3OH), hexane, acétone, quercétine, Chlorure d'aluminium (AlCl_3), carbonate de sodium (Na_2CO_3), Folin-Ciocalteu, acide gallique, acide trichloracétique (TCA), Ferricyanide de potassium (K_3FeCN_6), chlorure ferreux (FeCl_3), 2, 2 diphényl-1-picryle hydrazyl (DPPH) et l'acide ascorbique.

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits

Dans l'objectif de l'extraction des composés actifs de la plante *Bryonia dioica*, on a utilisé quatre solvants de différentes polarités : l'eau distillée, le méthanol, l'acétone et l'hexane.

2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux

L'extraction aqueuse a été réalisée par la méthode décrite par Gnanaprakash et ses collaborateurs en 2010. Dans un flacon, on met 40 g de la plante et on ajoute 400 ml d'eau distillée avec agitation à 70 °C pendant une heure. Le mélange est laissé durant 48 h à température ambiante et à l'abri de la lumière, avec agitation occasionnelle. La filtration du mélange a été réalisée à l'aide du coton et par du papier whatman successivement. L'élimination de l'eau est faite par un rotavapor (évaporation), l'extrait obtenu est séché à l'étuve puis conservé à 4 °C jusqu'à l'utilisation (Figure 8).

2.1.2. Préparation des extraits organiques

L'extraction organique a été réalisée selon la méthode de Siracusa et ses collaborateurs en 2011, avec quelques modifications. 50 g de poudre de la plante ont été macérés dans 500 ml d'hexane sous agitation pendant une heure. Le mélange est laissé deux jours avec agitation occasionnelle à température ambiante et à l'abri de la lumière. La filtration du mélange a été réalisée à l'aide du coton et puis du papier whatman. Les débris de la plante ont été macérés à la suite dans 500 ml d'acétone et ensuite dans du méthanol, en utilisant la même méthode que l'hexane. Après évaporation des solvants, les extraits obtenus ont été séchés à l'étuve puis conservés à 4°C (Figure 9).

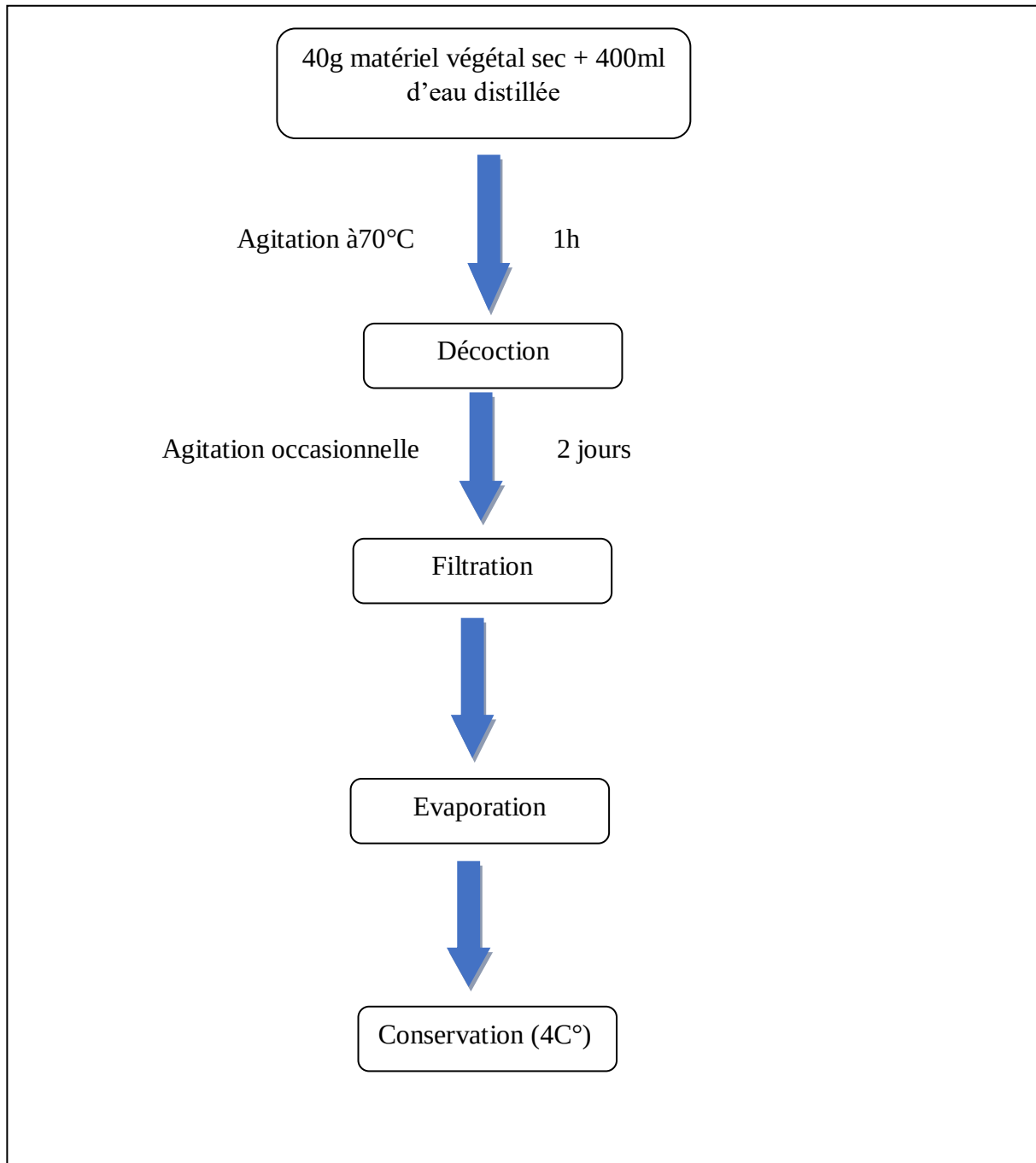


Figure 08 : Extraction aqueuse à partir des tubercules de *Bryonia dioica* (Gnanaprakash et *al.*, 2010).

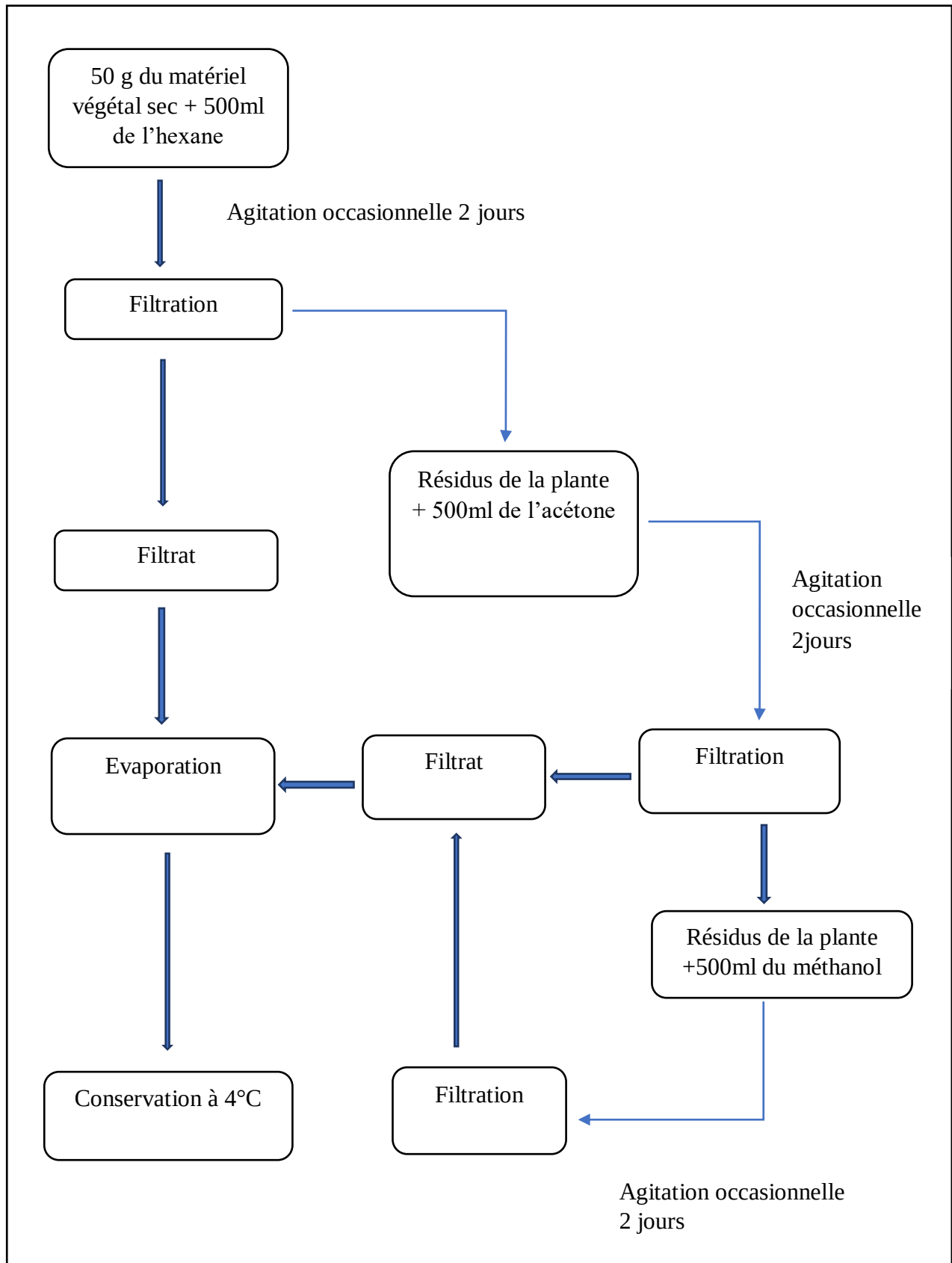


Figure 09 : Extraction organique à partir des tubercules de *Bryonia dioica* (Siracusa et al., 2011).

2.2. Etude phytochimique

Pour détecter la présence des principales familles chimiques dans les extraits de la plante *Bryonia dioica*, on a utilisé des tests phytochimiques selon la méthode de Ganatra et ses collaborateurs (2012).

2.2.1- Les flavonoïdes

Pour prouver la présence des flavonoïdes, on ajoute quelques gouttes d'hydroxyde de sodium dilué (NaOH) à 1ml de chaque extrait de la plante à une concentration de 4mg /ml. L'apparition d'une couleur jaune intense a été produite dans l'extrait de la plante qui devient incolore lorsqu'on ajoute quelques gouttes d'acide dilué ce qui indique la présence des flavonoïdes.

2.2.2 Les tanins

La présence des tanins dans les extraits est confirmée lorsqu'on remarque la formation d'un précipité noir bleuté ou noire verdâtre après ajout de quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3) 0.1% à 1ml de chaque extrait (concentration de 4mg/ml).

2.2.3 Les quinones

L'apparition de la couleur rouge confirme la présence des quinones suite à l'ajout de 0.5ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) à 0.5 ml de chaque extrait (4mg/ml).

2.2.4 Les terpénoïdes

La formation d'un anneau brun rougeâtre à l'interface après l'ajout de 0.5 ml de chloroforme à 1ml de chaque extrait (4mg/ml), puis 0.75 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4), indique la présence des terpénoïdes.

2.3- Dosages de quelques métabolites secondaires

2.3.1- Dosage des polyphénols totaux

La méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Li et *al.*, 2007) détermine la teneur en phénols totaux des extraits de la plante ; cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin du mélange de l'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques des extraits, ce qui entraîne la formation d'un produit de réduction de couleur bleue.

On ajoute 200 µl de chaque extrait dissout dans le DMSO (pour les extraits organiques) ou dans un mélange d'eau distillée et de méthanol (1:1) pour l'extrait aqueux, à une concentration de 2mg/ml, à 1ml de réactif Folin-Ciocalteu dix fois dilué. On mélange les solutions et on les incube pendant 4 minutes, après, on rajoute 800 µl de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75g/l) et on incube le mélange final à l'obscurité et à une température ambiante pendant 2 heures. Ensuite, on mesure l'absorbance par un spectrophotomètre à 765 nm.

L'acide gallique, préparé dans le méthanol, est utilisé comme standard à des concentrations de 10, 20, 40, 80 et 100 µg/ml pour établir la courbe d'étalonnage (Figure 10). Les concentrations des polyphénols totaux dans les quatre extraits sont calculées à partir de l'équation de régression de la courbe et sont exprimées en µg d'équivalents d'acide gallique / mg d'extrait sec (µg EAG /mg E).

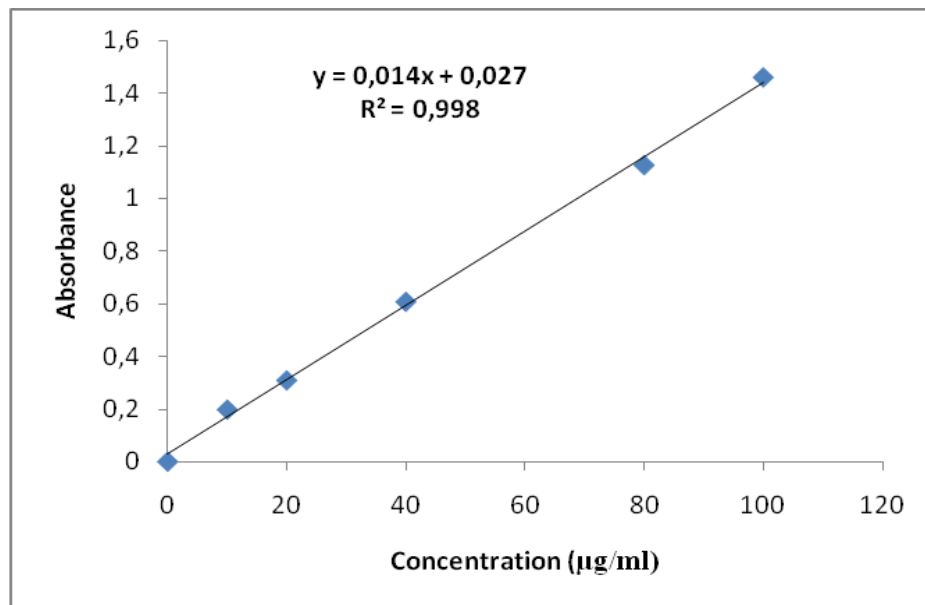


Figure 10 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.3.2- Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode de trichlorure d'Aluminium (AlCl_3) décrite par (Bahorum et *al.*, 1996). Elle se base sur la propriété chélatrice de l'ion aluminium.

Un millilitre de chaque extrait à une concentration de 2 mg/ml est ajouté à 1 ml d'une solution aqueuse de trichlorure d'Aluminium (2%). Après agitation et incubation à l'obscurité durant 10 min, l'absorbance est déterminée à $\lambda = 430$ nm. Le blanc utilisé contient seulement le solvant (DMSO pour les extraits organiques ou mélange eau distillée et méthanol 1 : 1,

pour l'extrait aqueux) et le AlCl_3 . La courbe d'étalonnage de la quercétine (Figure 11), dissoute dans le méthanol à différentes concentrations (5, 10, 20 et 40 $\mu\text{g/ml}$), est établie et les teneurs en flavonoïdes dans les extraits sont calculées à partir de l'équation de régression et sont exprimées en μg d'équivalents de la quercétine / mg d'extrait sec ($\mu\text{g EQ / mg E}$).

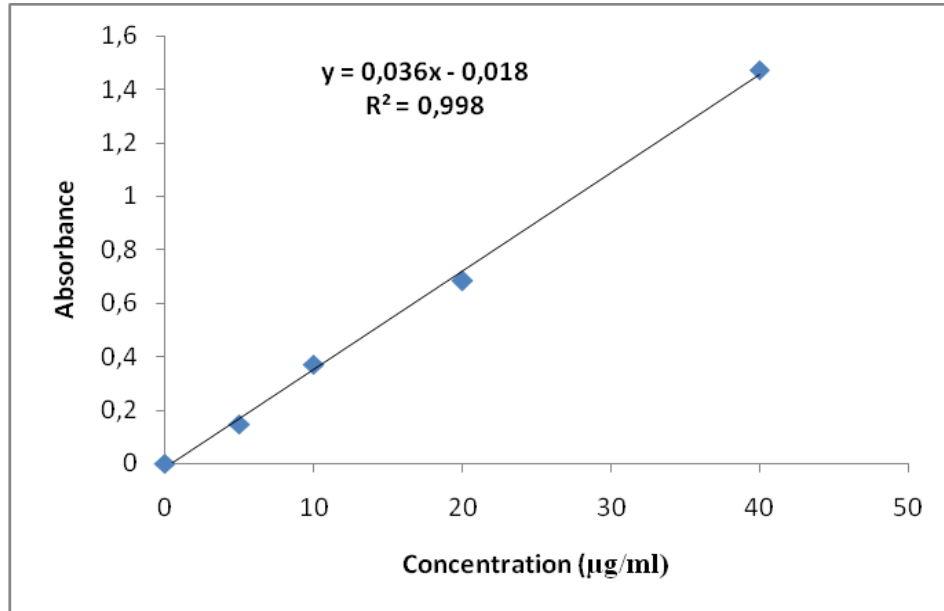


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.
Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.3.3- Dosages des tannins totaux

La teneur en tannins totaux a été estimée en utilisant la méthode décrite par Prasanth et ses collaborateurs (2017).

On ajoute 350 μl de chaque extrait à une concentration de 3mg/ml ou bien d'acide tannique (préparé dans l'eau distillé), à 1.5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dix fois dilué. Après agitation, on rajoute 1.5 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3 , 0.75 %). Le mélange final est incubé dans un bain marie pendant 45 minutes à 45°C. L'absorbance est déterminée à $\lambda = 765\text{nm}$; les mêmes étapes sont suivies pour préparer le blanc mais en remplaçant l'extrait par le solvant.

La courbe d'étalonnage de l'acide tannique (Figure 12), préparé à différentes concentrations (37.5, 75, 150 et 300 $\mu\text{g/ml}$), est établie et on calcule les teneurs en tannins totaux dans les quatre extraits à partir de l'équation de régression et on les exprime en μg d'équivalents d'acide tannique /mg d'extrait sec ($\mu\text{g EAT / mg E}$).

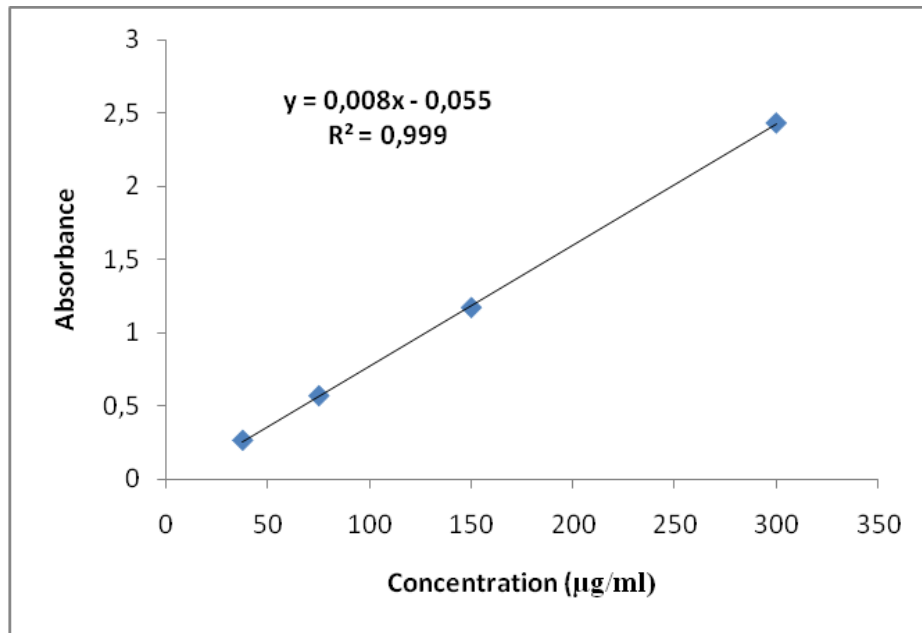


Figure 12 : courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.4- Etude de l'activité antioxydante des extraits de *Bryonia dioica*

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée est réalisée par deux tests différents :

2.4.1- Test de DPPH

Le test de DPPH (2,2'diphenylpicrylhydrazyl) est utilisé dans l'analyse de l'activité antioxydante, il est réalisé selon le protocole décrit par Brand Williams et ses collaborateurs (1995). La réduction du radical DPPH s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune.

1250 µl d'une solution méthanolique de DPPH (0.04 mg/ml) sont ajoutés à 50 µl de chaque extrait à différentes concentrations (8, 6, 4 et 2mg /ml) ou 50 µl du solvant (blanc). Après agitation, les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. l'absorbance est mesurée à $\lambda = 517$ nm. La quercétine est utilisée comme témoin positif (dissoute dans le méthanol). Chaque solution est répétée trois fois.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$I\% = [(A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{témoin}}] \times 100$$

I% : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH.

$A_{\text{témoin}}$: Absorbance du blanc.

$A_{\text{éch}}$: Absorbance de l'échantillon.

2.4.2- Test de réduction du fer (FRAP)

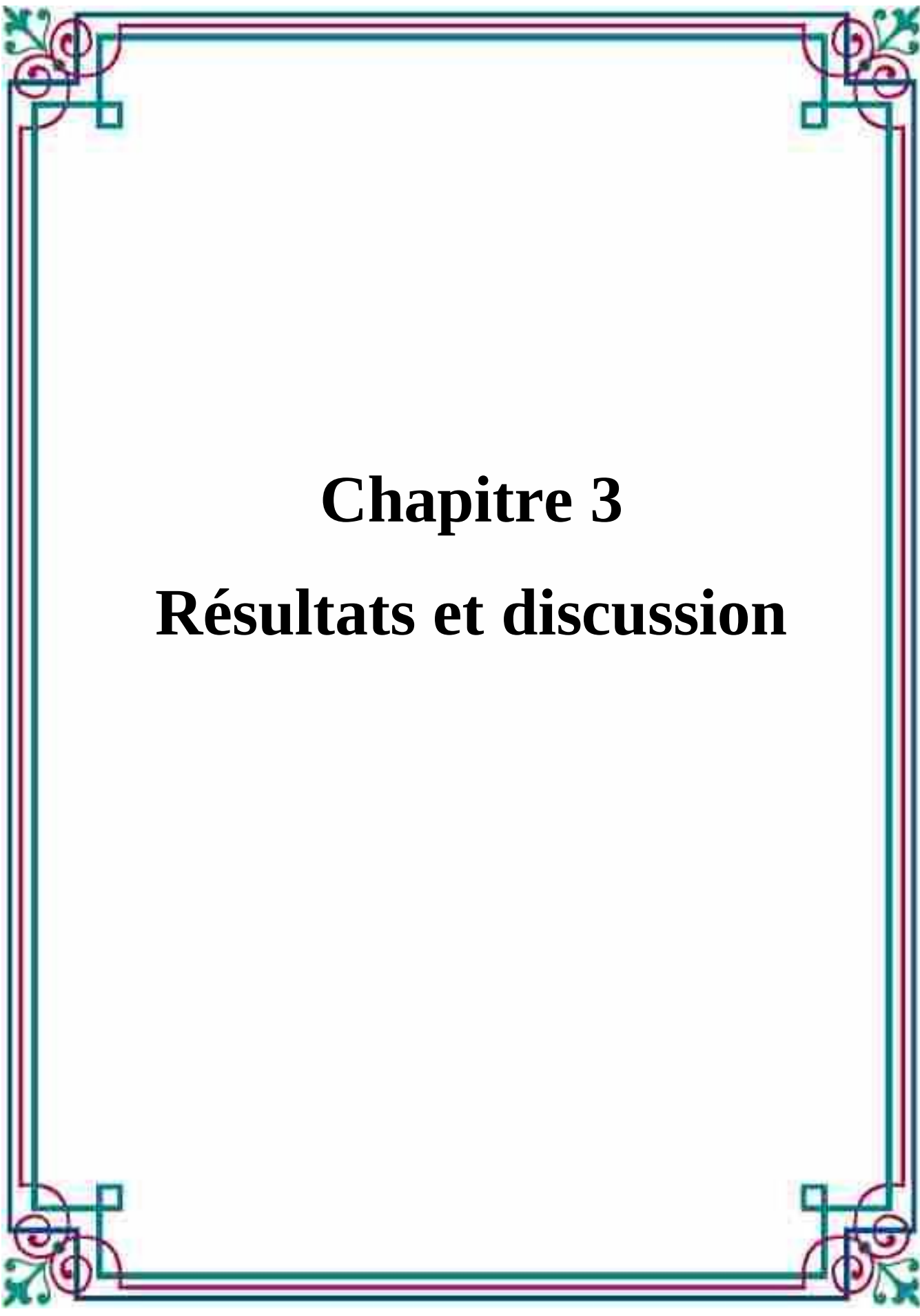
Le premier qui a découvert ce test en 1986 est Oyaizu, c'est un test direct et rapide utilisé pour mesurer le pouvoir réducteurs des antioxydants.

On ajoute 0.5 ml de chaque extrait à différentes concentrations (1, 2, 4 et 6 mg /ml), à 1250 μ l de tampon phosphate (0.2M, pH 6,6) et 1250 μ l de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] à 1%. On agite le mélange réactionnel et ensuite on l'incube à 50° C pendant 20 minutes dans un bain marie, puis on rajoute 1250 μ l d'acide trichloracétique à 10% au mélange et on centrifuge à 3000 tr/min pendant 10 minutes. Ensuite on mélange 1250 μ l du surnageant avec 1250 μ l d'eau distillée et 250 μ l de chlorure ferrique ($FeCl_3$) à 0.1%.

On utilise l'acide ascorbique autant que contrôle positif préparer à différentes concentrations (5, 10, 20, 40 et 50 mg / ml). On répète chaque solution trois fois. À la fin, on se sert d'un spectrophotomètre pour lire l'absorbance du milieu réactionnel à 700 nm. L'augmentation de la réduction du fer est indiquée par l'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel.

2.5- Etude statistique

Les courbes et les histogrammes sont réalisées par Microsoft Excel 2010. Les résultats des tests exécutés sont exprimés en moyenne de trois répétitions $\pm$ écart-type. Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)].



Chapitre 3

Résultats et discussion

1- Extraction

La préparation des extraits à partir de la partie souterraine (tubercules) de la plante *Bryonia dioica* est effectuée par des solvants à différentes polarités et ont permis d'obtenir quatre extraits : hexanique, acétonique, méthanolique et aqueux. Les rendements d'extraction sont exprimés en pourcentage (%) de masse d'extraits par rapport à la masse initiale du matériel végétal. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 02 : Rendements des extractions aqueuse et organique à partir les tubercules de *Bryonia dioica*.

Extrait	Rendement (%)
Hexane	0.57
Acétone	1.2
Méthanol	3.8
Aqueux	32.75

Selon le tableau, le rendement le plus élevé (32.75%) est obtenu dans l'extraction aqueuse, suivie par l'extrait du méthanol (3.8%), puis l'extrait d'acétone (1.2%), et le rendement le plus bas est obtenu par l'extrait hexanique (0.57 %). On peut constater que pour la plante étudiée le rendement augmente avec la polarité des solvants d'extraction.

La méthode d'extraction appliquée est basée sur la solubilité différentielle des composés végétaux dans les solvants. Les flavonoïdes di-, tri, et tétra-glycosylés et les acides hautement polaires dissous dans l'eau sont des substances polaires (Jones et Kinghon, 2006), tandis que les substances moins polaires (dérivés d'acides phénoliques) peuvent être séparées par les solvants organiques moins polaires (Cazes, 2009). Le méthanol peut récupérer les flavonoïdes, les aminoacides, les terpènes et les cires (Andersen et Markham, 2006), ainsi que les tannins, les saponines, et les anthocyanines (Cowan, 1999). L'acétone est également un solvant couramment utilisé pour la préparation d'extraits riches en flavonoïdes (Cowan, 1999). L'hexane est fréquemment utilisé pour l'extraction des aglycones lipidiques et flavonoïdes très méthoxylés (Boussoualim, 2014).

En plus du choix des solvants, l'extraction est effectuée dans les conditions comme la température, l'agitation, le ratio solvant /matériel végétal et le temps d'extraction, qui affectent aussi le rendement d'extraction et le contenu total en composés phénoliques, et aussi

ils affectent les activités biologiques reliées à ces métabolites (Lee et *al.*, 2003, Azmir et *al.*, 2013). On effectue l'extraction aqueuse sous forme d'une décoction, c'est la même méthode recommandée en médecine traditionnelle, la solubilité de certains composés et l'extraction des tannins et terpénoïdes est augmentée par le réchauffement du mélange matériel végétal et d'eau (King et Bott, 2012).

2- Etude phytochimique

Les résultats de détection des différents composés chimiques présents dans les extraits de *Bryonia dioica* ont permis de confirmer la présence des flavonoïdes, des tannins et des quinones dans tous les extraits étudiés, alors que les terpénoïdes sont présents dans tous les extraits à l'exception de l'extrait d'hexane.

Les tests utilisés dans l'étude phytochimique préliminaire sont des techniques faciles qui donnent une idée générale sur les divers groupes de composés chimiques contenus dans chaque extrait de la plante. Les flavonoïdes et les tannins font partie des polyphénols qui sont les métabolites secondaires les plus importants dans les plantes. Les quinones se distinguent par leur activité antimicrobienne, ils possèdent des cycles aromatiques avec deux substituants cétones ; les terpénoïdes sont des précurseurs pour la synthèse des stéroïdes dans les plantes (Tiwari et *al.*, 2011).

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux décrits par Chekroun et *al.* (2015) qui confirment la présence des flavonoïdes, des tannins, des quinones et des terpénoïdes dans les extraits aqueux et butanolique préparés à partir des racines de *B. dioica*. D'autres études réalisées par Kadhim (2014) et par Khamees et *al.* (2017) ont montré la présence de flavonoïdes, alcaloïdes, stéroïdes et l'absence des tannins dans les feuilles de la plante.

3- Dosage des composés phénoliques de la plante

L'étude quantitative des extraits de *Bryonia dioica* au moyen des dosages Spectrophotométriques avait pour objectif la détermination de la teneur en composées phénoliques. Les résultats sont exprimés en termes d'équivalents d'un standard à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Tableau 3).

Tableau 03 : Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins totaux des extraits de *Bryonia dioica*.

Extrait	Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mgE}$)	Flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ/mgE}$)	Tannins totaux ($\mu\text{g EAT/mgE}$)
Aqueux	04.136 ± 0.639	02.043 ± 0.000	07.284 ± 0.088
Méthanol	18.904 ± 2.284	00.988 ± 0.175	15.319 ± 0.530
Acétone	27.059 ± 0.930	14.368 ± 0.174	32.777 ± 1.060
Hexane	07.392 ± 0.452	06.469 ± 0.044	16.986 ± 0.000

(EAG : Equivalents d'acide gallique, EQ : Equivalents de quercétine, EAT : Equivalents d'acide tannique, E : extrait).

Selon le tableau, l'extrait acétonique est le plus riche en polyphénols par rapport aux autres extraits ($27.059 \mu\text{g EAG/mgE}$), Suivi par l'extrait méthanolique ($18.904 \mu\text{g EAG/mgE}$), tandis que les extraits hexanique et aqueux sont les plus pauvres en polyphénols avec des concentrations de 7.392 et $4.136 \mu\text{g EAG/mgE}$, respectivement.

Dans le dosage des flavonoïdes, l'extrait acétonique semble le plus riche en flavonoïdes avec une concentration de $14.368 \mu\text{g EQ/mgE}$, Suivi par l'extrait hexanique ($6.469 \mu\text{g EQ/mgE}$), puis l'extrait aqueux ($2.043 \mu\text{g EQ/mgE}$) et enfin l'extrait méthanolique qui a montré une quantité très faible de flavonoïdes ($0.988 \mu\text{g EQ/mgE}$). On peut remarquer que la teneur des flavonoïdes est plus élevée dans les extraits préparés par les solvants les moins polaires.

La quantification des tannins dans les extraits a révélé que la quantité la plus élevée est trouvée toujours dans l'extrait d'acétone ($32.777 \mu\text{g EAT/mgE}$), suivi des extraits hexanique et méthanolique qui présentent des teneurs proches (16.986 et $15.319 \mu\text{g EAT/mgE}$, respectivement) et en dernier lieu l'extrait aqueux avec une concentration de $7.284 \mu\text{g EAT/mgE}$.

D'après une étude réalisée par Chekroun et *al.* (2015), l'extrait aqueux des tubercules de *B. dioica* contient une teneur en polyphénols égale à 226.87 mg EAG/gE , et l'extrait butanolique contient une concentration de 541.78 mg EAG/gE . Pour les teneurs en flavonoïdes, la même étude a montré que les extraits aqueux et butanolique contiennent 53.67 et 120.6 mg d'équivalents de la catéchine par g d'extrait, respectivement. Une autre étude par Bourhia et ses collaborateurs en 2020, a montré que la teneur totale en composés phénoliques dans

l'extrait méthanolique préparé à partir des racines de *B. dioica* est de 430.643 mg EAG/gE, alors que la teneur en flavonoïdes pour le même extrait est de 7.21 mg EQ/gE. Ces résultats sont loin de ceux obtenus dans la présente étude car la teneur en molécules biologiquement actives varie en fonction de certains paramètres au cours de la croissance des plantes, tels que la salinité, la sécheresse et l'ensoleillement qui affectent la biosynthèse des métabolites secondaires (Ghedaba et *al.*, 2010), ainsi que la sensibilité aux voies de dégradation (l'oxydation, la lumière,...), le stade de maturité, les conditions climatiques, pédologiques et le stress de prédation (Mahmoudi et *al.*, 2013).

4-Activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de *B. dioica*

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de *Bryonia dioica* a été réalisée par deux tests in vitro : le test au DPPH et la méthode de FRAP.

4.1- Piégeage du radical DPPH

Le test de DPPH est l'un des tests les plus connus en raison de sa rapidité, sensibilité, commodité et de sa reproductibilité (Alam et *al.*, 2013). Le DPPH se distingue par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. L'existence de ces radicaux (DPPH.) donne une coloration violette foncée de la solution et sa réduction par les agents antioxydants entraîne un passage de la couleur violette à la couleur jaune ce qui diminue son absorbance. L'activité antioxydante a été évaluée par spectrophotométrie à 517 nm (Molyneux, 2004 ; Popovici et *al.*, 2010). L'inhibition du radical DPPH est exprimée en IC₅₀ qui représente la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour inhiber (réduire) 50% des radicaux DPPH (Maisuthisakul et *al.*, 2007). Les résultats obtenus pour les extraits et la quercétine utilisée comme contrôle positif sont présentés dans les figures 13 et 14.

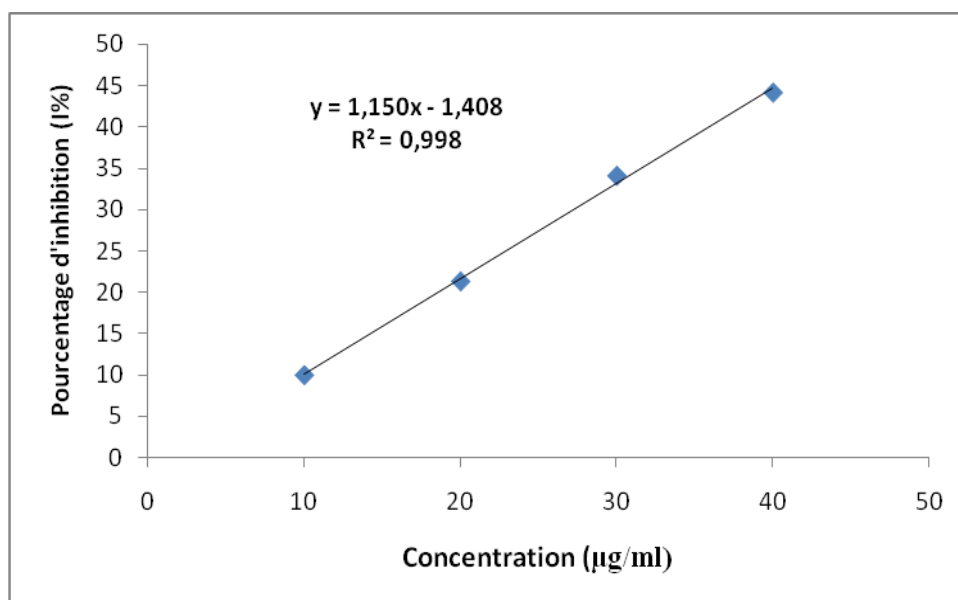


Figure 13 : Activité anti-radicalaire de la quercétine contre le DPPH.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

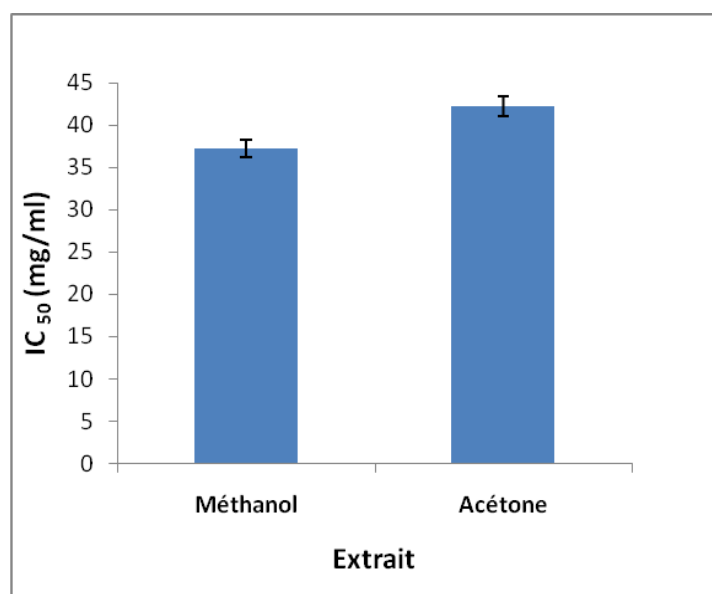


Figure14 : Les concentrations des extraits de *Bryonia dioica* inhibitrices de 50 % du radical DPPH (IC₅₀).

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± SD.

D'après les résultats obtenus, le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente parallèlement à l'augmentation de la concentration soit pour la quercétine ou pour les extraits de la plante. En général, les extraits étudiés n'ont pas montré une activité considérable dans ce test avec des valeurs d'IC₅₀ très élevées. L'extrait méthanolique a donné une IC₅₀ égale à

37.27 mg/ml, alors que l'extrait acétonique a donné une valeur de 42.22 mg/ml. Concernant les extraits aqueux et hexanique, ces extraits n'ont pas montré aucune activité antiradicalaire même pour la plus grande concentration utilisée (15 mg/ml). Le standard utilisé (la quercétine) a montré une activité antioxydante très élevée par rapport aux extraits avec une IC_{50} de 44.70 μ g/ml.

Selon Chekroun et *al.* (2015), les extraits aqueux et butanolique des tubercules de *B. dioica* ont donné dans le test au DPPH des IC_{50} de 47.25 et 2.25 μ g/ml, respectivement. Les résultats obtenus par Bourhia et ses collaborateurs en 2020, montrent que l'extrait méthanolique des racines de la plante étudiée a donné une IC_{50} égale à 0.975 mg/ml.

L'activité anti-radicalaire des extraits des plantes médicinales est due à la richesse des polyphénols en groupements hydroxyles qui sont caractérisés par leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres, ainsi, Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Heim et *al.*, 2002 ; De peindo et *al.*, 2007 ; De Quiros et *al.*, 2010).

4.2-Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)

L'activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de la plante *Bryonia dioica* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Les résultats sont résumés dans les figures 15 et 16.

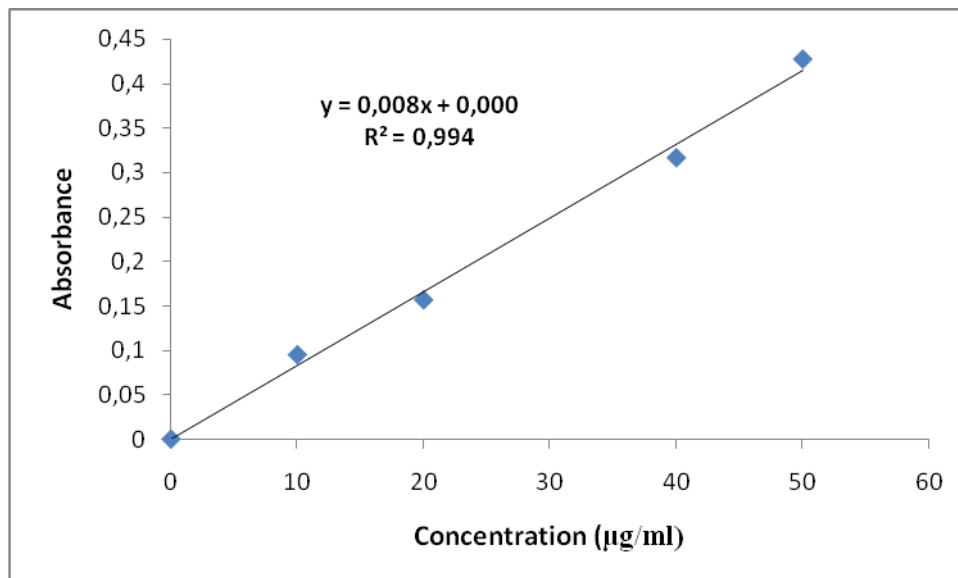


Figure 15 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.
Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

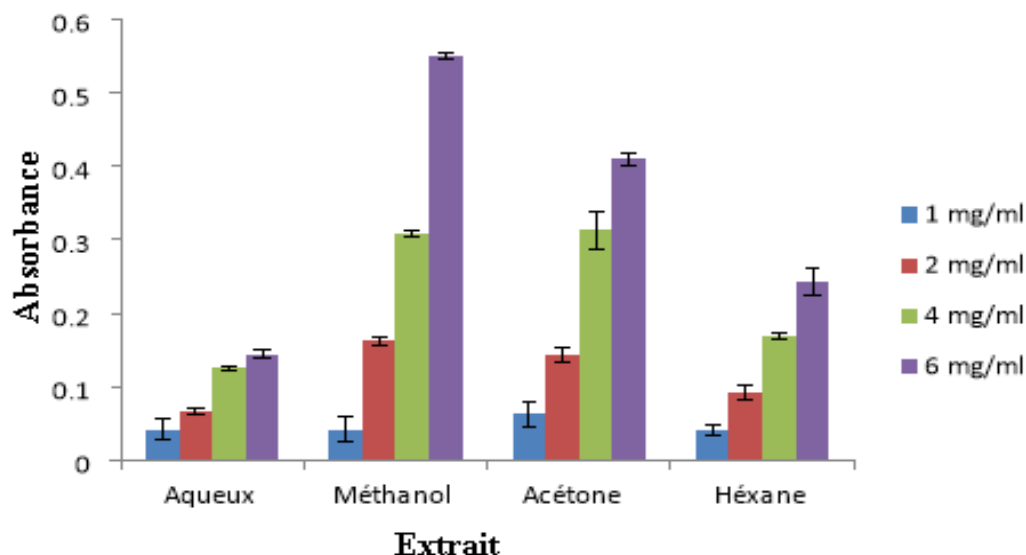


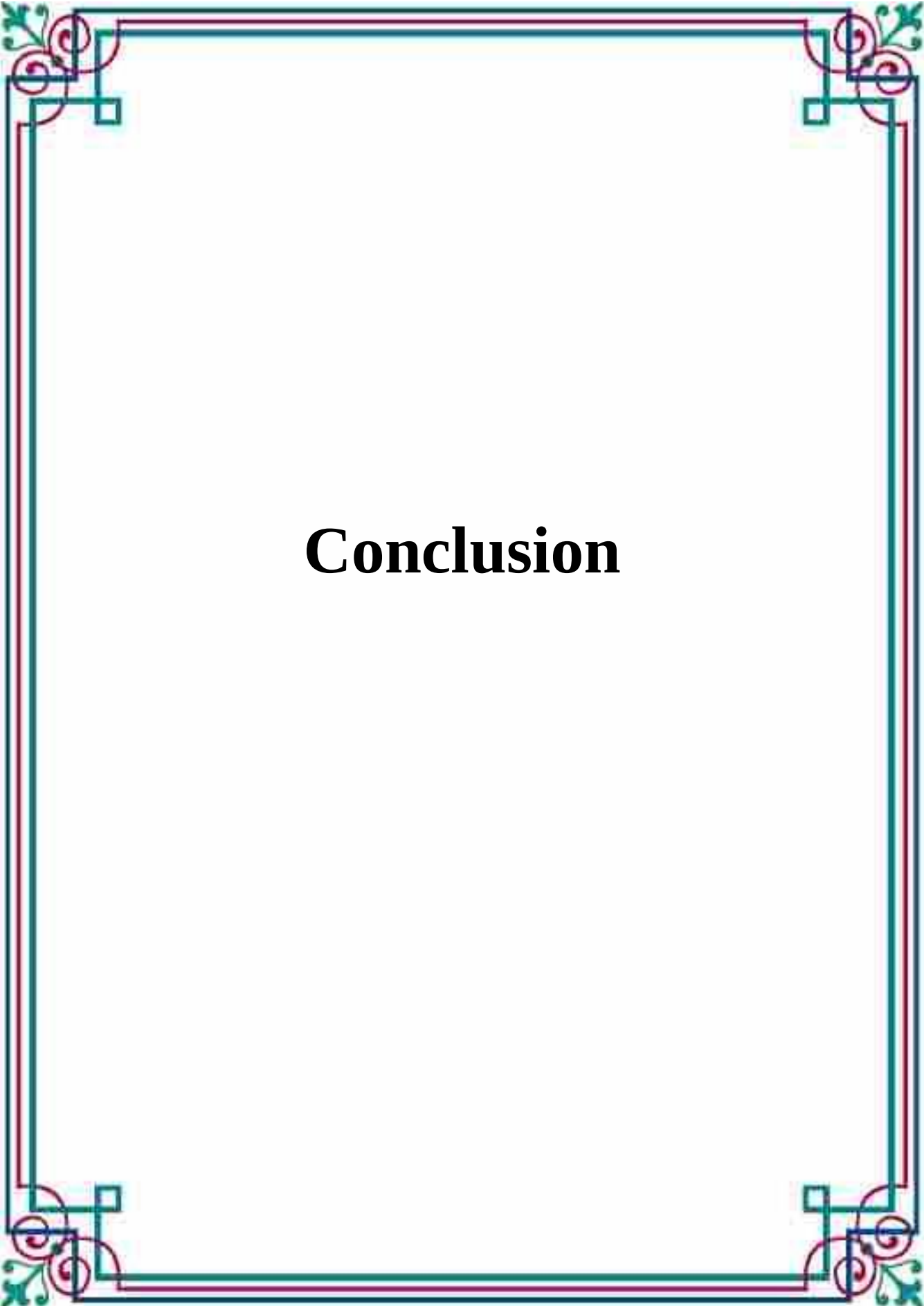
Figure16 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Bryonia dioica* par la méthode de FRAP.

Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions $\pm$ SD.

La méthode de FRAP est un essai simple, rapide et reproductible qui mesure la capacité des antioxydants à réduire les ions ferriques en donnant un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} , ce qui induit le passage de la couleur jaune à la couleur vert pâle et bleue en fonction de la concentration d'antioxydants dans les échantillons. Cette transformation de couleur est suivie par spectrophotométrie à 700 nm (Chung et *al.*, 2002 ; Bougandoura et Bendimerad, 2012 ; Bentabet et *al.*, 2014).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que tous les extraits présentent une capacité réductrice dose-dépendante, c'est-à-dire que le pouvoir réducteur de fer est proportionnel à la concentration des extraits et du standard (augmentation de l'absorbance). La capacité des extraits à réduire le fer est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique dont la valeur de l'absorbance de ce dernier est de 0.42 pour la concentration (50 $\mu\text{g/ml}$). Parmi les extraits étudiés, l'extrait méthanolique a montré la meilleure capacité réductrice ($A = 0.54$) par rapport aux autres extraits pour la même concentration (6 mg/ml), suivi de l'extrait acétonique ($A = 0.41$), puis l'extrait hexanique ($A = 0.24$) et enfin l'extrait aqueux ($A = 0.14$) qui a donné la plus faible capacité réductrice. Dans l'étude réalisée par Chekroun et ses collaborateurs en 2015, les extraits aqueux et butanolique des racines de *B. dioica* ont donné des valeurs d'absorbance à 700 nm de 0.74 et 1.79 dans le test de FRAP.

Le pouvoir réducteur des extraits des plantes est lié à la présence de molécules qui ont la capacité de donner des électrons. Ces molécules inhibent la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+) (Ferreira et *al.*, 2006).



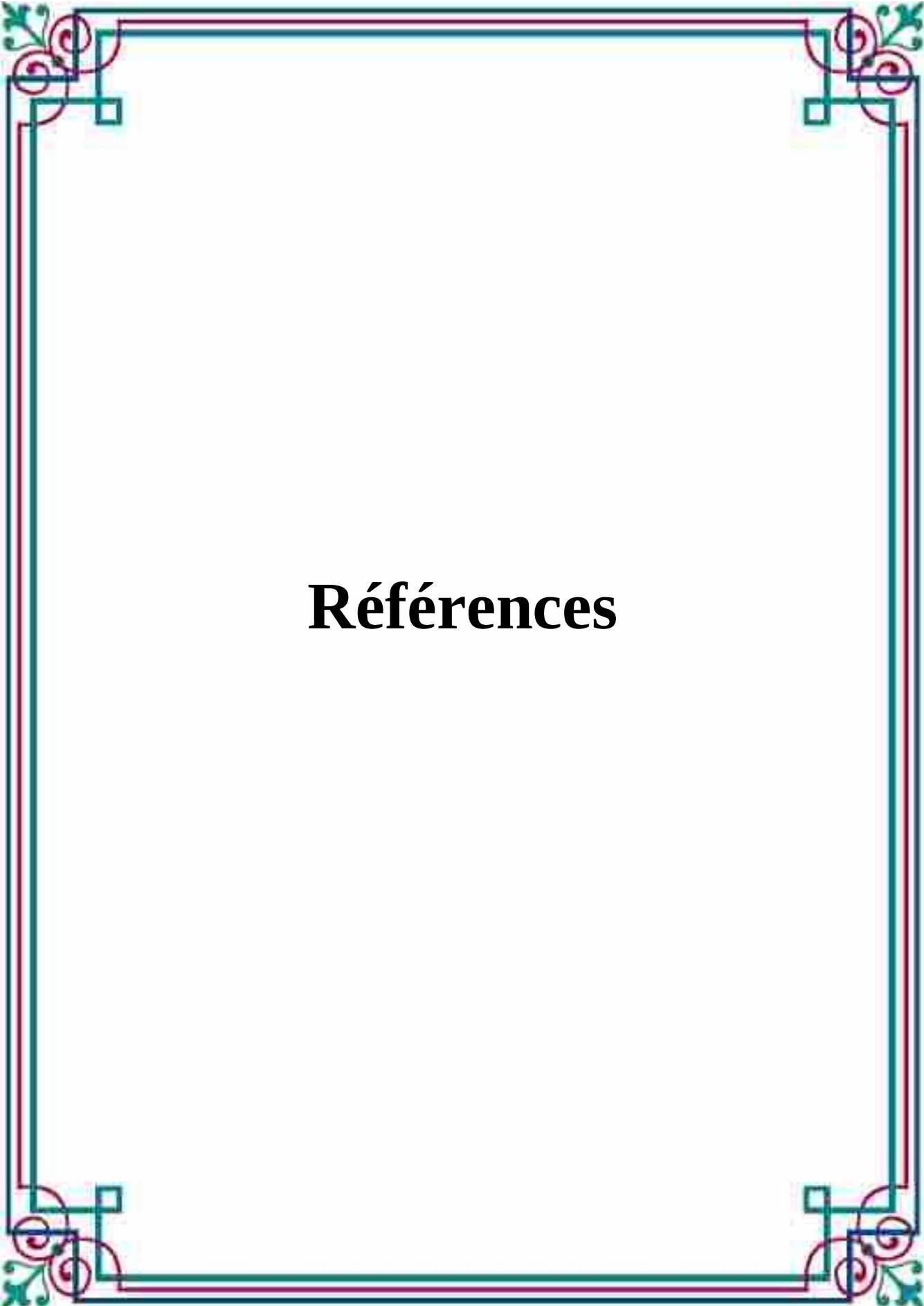
Conclusion

Les plantes médicinales constituent une source fiable et majoritaire de principes actifs, ce qui explique leur exploitation accrue en industrie pharmaceutique. Les polyphénols sont les composés végétaux les plus intéressants et les plus étudiés.

L'espèce *Bryonia dioica* récoltée de la région de M'sila est étudiée pour la première fois dans ce travail. L'investigation phytochimique de la plante a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des quinones dans tous les extraits (organiques et aqueux) préparés à partir des tubercules de la plante, tandis que les terpénoïdes sont trouvés dans tous les extraits sauf la fraction d'hexane. Le dosage des composés phénoliques a montré que la teneur la plus élevée des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins se trouve dans l'extrait acétonique.

L'évaluation de l'activité antioxydante a montré que seulement les extraits méthanolique et acétonique possèdent une activité de piégeage contre les radicaux DPPH. La capacité réductrice de fer évaluée par la méthode de FRAP a révélé que tous les extraits ont un pouvoir dose-dépendant et l'activité la plus importante est celle de l'extrait méthanolique.

Enfin, d'autres études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les composés phytochimiques des extraits de la plante, plus précisément les molécules impliquées dans les effets antioxydants et pour évaluer d'autres activités biologiques possibles de la plante.



Références

A

- Achat, S. (2013, November).** Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Avignon.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013).** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*, 21(2), 143-152.
- Ali, M. B., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007).** Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 12(3), 607-621.
- Andersen OM., Markham KR., (2006).** *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group. USA. p. 2.
- Azmir J., Zaidul ISM., Rahman MM., Sharif KM., Mohamed A., Sahena F., Jahurul MHA., Ghafoor K., Norulaini NAN., Omar AKM., (2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117(4), 426-436.

B

- Babior, B. M. (1999).** NADPH oxidase: an update. *Blood*, *The Journal of the American Society of Hematology*, 93(5), 1464-1476.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., ... & Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086-1089.
- Barker, E. C., Gatbonton-Schwager, T. N., Han, Y., Clay, J. E., Letterio, J. J., & Tochtrop, G. P. (2010).** Bryonolic acid: a large-scale isolation and evaluation of heme oxygenase 1 expression in activated macrophages. *Journal of natural products*, 73(6), 1064-1068.
- Belkheiri, N. (2010).** *Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Benarba, B. (2015).** Ethnomedicinal study of *Bryonia dioica*, a plant used as anti-breast cancer herbal therapy in North West Algeria. *Journal of Medicinal Herbs and Ethnomedicine*. Vol, 1, 113.
- Benhamdi, A., Bentellis, A., Rached, O., Du Laing, G., & Mechakra, A. (2014).** Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two steppic plant species in an old antimony mining area. *Biological trace element research*, 158(1), 96-104.
- Benhammou, N. (2011).** *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien* (Doctoral dissertation).
- Bennamara, F. T. (2017).** Stress oxydant et pathologies humaines (Doctoral dissertation, Université Mohammed V-Rabat), 106-113.
- Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., et Boucherit, K. (2014).** Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.

Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, (9), 14.

Bourhia, M., Laasri, F. E., Aghmih, K., Ullah, R., Alqahtani, A. S., Mahmood, H. M., ... & Benbacer, L. (2020). Phytochemical composition, antioxidant activity, antiproliferative effect and acute toxicity study of *Bryonia dioica* roots used in North African alternative medicine. *Intl J Agric Biol*, 23(3), 597-602.

Boussoualim, N. (2014). *Activités biologiques de plantes médicinales : Anchusa azurea Mill. et Globularia alypum L.* Soutenue (Doctoral dissertation, Université de Sétif 1-Ferhat Abbas).

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Bruneton, J. (2005). *Plantes toxiques et végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*, 3e éd. Paris, France, Lavoisier.

C

Cazes, J. (Ed.). (2009). *Encyclopedia of chromatography*. CRC press.

Chekroun, E. (2016). *Contribution à l'étude phytochimique et recherche d'activités antioxydante et antidiabétique de deux cucurbitacées : Bryonia dioica Jacq et Citrullus colocynthis (L.) Schrad* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en Biologie, Université Aboubekr Belkaïd, Aboubekr Belkaïd. Tlemcen, p : 26).

Chekroun, E., Benariba, N., Adida, H., Bechiri, A., Azzi, R., & Djaziri, R. (2015). Antioxidant activity and phytochemical screening of two Cucurbitaceae : *Citrullus colocynthis* fruits and *Bryonia dioica* roots. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(8), 632-637.

Chenni, M., Neggaz, S., Forts, Z., El Abed, D. (2012). Etude du pouvoir antibactérien de l'extrait méthanolique de la racine de *Bryonia dioica* Jacq., de la région d'Oran. *Phyto Chem & BioSub Journal*.6(2),78-82.

Chew, M. H., Xu, G. G., Ho, P. W., & Lee, C. W. (2009). A propos d'un cas de syndrome compartimental glutéal après traitement chirurgical d'un anévrisme de l'aorte abdominale. In *Annales de Chirurgie Vasculaire* (Vol. 23, No. 4, pp. 579-e17). Elsevier Masson.

Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., et Chou, S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2454-2458.

Coriat, R. (2012). *Applications d'une modulation pharmacologique des dérivés des formes réactives de l'oxygène pour une optimisation thérapeutique des patients traités par chimiothérapie* (Doctoral dissertation, Université René Descartes-Paris V).

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564.

D

- De Pinedo, A. T., Peñalver, P., & Morales, J. C. (2007).** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chemistry*, 103(1), 55-61.
- De Quirós, A. R. B., Frecha-Ferreiro, S., Vidal-Pérez, A. M., & López-Hernández, J. (2010).** Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research and Technology*, 231(3), 495-498.
- Djenidi, H. (2019).** Activité antioxydante et antiradicalaire des aliments d'origine végétale consommés dans les régions de Biskra et Sétif (Doctoral dissertation).
- Dwassy, A. (2014).** *Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques* (Doctoral dissertation).

F

- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- Favier, A. (2003).** The oxidative stress : concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches. *Actualité Chimique*, (11-12), 108-115.
- Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, L.M.L., Arango, M.E.M. (2006).** The *in vitro* screening for acetylcholine esterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* .108, 31.
- Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2011).** Dietary flavonoids: role of (–) -epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(4), 813-823.
- Fraipont, V., & Preisser, J. C. (2017).** Mise à jour sur l'utilisation des pharmanutriments chez le patient agressé—deuxième partie : antioxydants, acide gras oméga-3. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 31(1), 16-23.

G

- Ganatra, S. H., Durge, S. P., & Patil, S. U. (2012).** Preliminary phytochemicals investigation and TLC analysis of *Ficus racemosa* leaves. *J Chem Pharm Res*, 4, 2380-2384.
- Garait, B. (2006).** *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- Garnier, G., Bézanger-Beauquesne, L., & Debranx, G. (1961).** *Ressources médicinales de la flore française*.
- Ghedadba, N., Hambaba, L., Aberkane, M. C., Oueld-Mokhtar, S. M., Fercha, N., & Bousselsela, H. (2014).** Évaluation de l'activité hémostatique *in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubiumvulgare* L. *Algerian Journal of Natural Products*, 2(2), 64-74.
- Gnanaprakash, K., Madhusudhana Chetty, C., Ramkanth, S., Alagusundaram, M., & Tiruvengadarajan Vs, A. P. S. (2010).** Aqueous extract of *Flacourtia indica* prevents carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat.

Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.

Guillouty, A. (2016). *Plantes médicinales et antioxydants* (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

H

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charilier, C., Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.

Hamma, S. A Nouri, N. Fergani, I. Lekhal, A. Cheriet S. Abadi N, Lezzar, A. Benlatreche, C. (2015). Biologie des espèces réactives et Stress oxydant. *Journal algérien de médecine*, 23(2), 48-53.

Hammiche, V., Merad, R., & Azzouz, M. (2013). *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen* (pp. 171-174). Paris: Springer.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.

J

Jones, W.P., Kingdon, D., (2006). Extraction of plant secondary metabolites in natural products isolation. Eds. Humana Press. Totowa. Pp: 334-335. and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.

K

Kadeche, L. (2018). *Évaluation des effets protecteurs de la supplémentation en quercétine et en vanilline sur la cytotoxicité induite par la métribuzine chez le rat de la souche wistar*. 118p. Thèse du Doctorat, Biologie Animal. Faculté des sciences, Université BADJI MOKHTAR, ANNABA, Algérie.

Kadhim, E. J. (2014). Phytochemical investigation and hepato-protective studies of Iraqi Bryonia dioica (Family Cucurbitaceae). *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(4), 187-90.

Khamees, A. H., Kadhim, E. J., Sahib, H. B., & Mutlag, S. H. (2017). In vitro Analysis of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Iraqi Bryonia dioica. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 43(1), 248-52.

King, M. B., & Bott, T. R. (Eds.). (2012). *Extraction of natural products using near-critical solvents*. Springer Science & Business Media.

Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.

L

Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., ... & Harrison, D. G. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial

cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of clinical investigation*, 111(8), 1201-1209.

Le Floch, E. (1983). *Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne.* Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7292-7295.

Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776.

M

Madi, A., & Belkhiri, A. (2018). Caractérisation phytochimique et évaluation des activités biologiques de *Cleome arabica* (Doctoral dissertation, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة).

Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.

Maisuthisakul, P., Suttajit, M., & Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food chemistry*, 100(4), 1409-1418.

Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002, Décembre). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* (Vol. 51, No. 6, pp. 304-315). Elsevier Masson.

Matou, M. (2019). Composition et propriétés biologiques d'extraits de *Phyllanthus amarus* Schumacher et Thonning (1827) utilisés en médecine traditionnelle aux Antilles (Thèse de doctorat, Antilles).

Medjeldi Marzougui, S. (2012). *Peroxydase d'origine Végétale : purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés* (Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar).

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. Technol*, 26(2), 211-219.

Mongens, M. (2013). *Origine et conséquences du stress oxydant* (Doctoral dissertation).

Muanda, F. N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Thèse de doctorat en Chimie organique. Ecole doctorale SESAMES Université Paul Verlaine-Metz*, 294.

O

Odile C. and Daniel R., (2007). Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie. 3^{ème} Edition, Wolters Kluwer, France, 141.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.

P

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233-239.

Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.

Prasanth, D. S. N. B. K., Rao, A. S., & Yejella, R. P. (2017). Phytochemical, *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of *Argyrea pilosa* Wight & Arn. (whole plant).

Q

Quezel, P., & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (No. 581.965 Q8).

R

Rafael, M., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2011). Topical anti-inflammatory plant species: Bioactivity of *Bryonia dioica*, *Tamus communis* and *Lonicera periclymenum* fruits. *Industrial crops and products*, 34(3), 1447-1454.

Reimund, J. M. (2002). Stress oxydant au cours des syndromes inflammatoires chroniques. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 275-284.

ROUAKI, F. (2016). *Effets de l'ingestion de l'huile de Tournesol oxydée et de la supplémentation en alpha-tocopherol sur certains paramètres structuraux et fonctionnels du tissu cardiaque chez le rat en croissance* (Doctoral dissertation).

S

Sallam, A. A., Hitotsuyanagi, Y., Mansour, E. S. S., Ahmed, A. F., Gedara, S., Fukaya, H., & Takeya, K. (2010). Cucurbitacins from *Bryonia cretica*. *Phytochemistry Letters*, 3(3), 117-121.

Sekkoum, K., Belboukhari, N., & Cheriti, A. (2014). New flavonoids from bioactive extract of Algerian medicinal plant *Launea Arborescens*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(4), 267-271.

Siracusa, L., Saija, A., Cristani, M., Cimino, F., D'Arrigo, M., Trombetta, D., ... & Ruberto, G. (2011). Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves—Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*, 82(4), 546-556.

Sturm, S., & Stuppner, H. (2000). Analysis of cucurbitacins in medicinal plants by high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry.

T

Talbi, H., Boumaza, A., El-Mostafa, K., Talbi, J., & Hilali, A. (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *J Mater Environ Sci*, 6, 1111-1117.

Tanoh, S. K., N'Gaman-Kouassi, C., Boa, D., Mamyrbekova-Békro, J. A., & Békro, Y. A. (2019). Activité antioxydante des extraits bruts hydroéthanoliques et hydroacétoniques des organes de quatre plantes de Côte d'Ivoire médicinales. *Nature & Technology*, (21), 28-34.

Tissier, M. (2011). *Contribution à l'étude du stress oxydant chez le chien de cross canin* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard–Lyon I–(médecine–pharmacie)).

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1(1), 98-106.

U

Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Toriumi, M., Koike, K., ... & Takido, M. (2002). Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of cucurbitane glycosides from the roots of *Bryonia dioica*. *Journal of natural products*, 65(2), 179-183.

V

Vârban D.I., Duda M., Vârban R., et Muntean S., (2009). Research Concerning the Organic Technology for *Satureja Hortensis* L. *Culture. Bulletin UASVM Agriculture*. 66 (2) 225- 229.

W

Wachinger, M., Samtleben, R., Gerhäuser, C., Wagner, H., & Erfle, V. (1993). Bryodin, a single-chain ribosome-inactivating protein, selectively inhibits the growth of HIV-1-infected cells and reduces HIV-1 production. *Research in experimental medicine*, 193(1), 1-12.

Y

Yasir, M., Sultana, B., Nigam, P. S., & Owusu-Apenten, R. (2016). Antioxidant and genoprotective activity of selected cucurbitaceae seed extracts and LC–ESIMS/MS identification of phenolic components. *Food Chemistry*, 199, 307-313.

Z

Zeghad ep Bououden, N., Belkhiri, A., & Demeyer, K. (2018). *Evaluation des propriétés biopharmacologiques, standardisation chimique et valorisation des agroressources fonctionnelles cas de Vitis vinifera, Punica granatum, Citrus aurantium et Opuntia ficus indica* (Doctoral dissertation, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة).