

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE
N°:



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE
OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique**

Par: Amroune Nour El Houda
et Belouadah Imane

Intitulé

**Etude de l'activité antioxydante
et antibactérienne des extraits des tubercules de
*Bryonia dioica***

Soutenu devant le jury composé de :

M ^{me} . GUESMIA Khawkha	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Mr. HARRAR Abdenassar	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur
M ^{lle} . DEHIMI Khadidja	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Encadreur

Année universitaire: 2021/2022



Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier notre Dieu d'avoir nous donné le courage et la force d'aller au bout afin de terminer ce travail.

No vifs remerciements

A notre encadreur M^{elle} **Dehimi Khadidja**, pour ces précieux conseils, ses orientations, pour son aide et pour la confiance qu'elle nous a accordé.

Nous remercions infiniment les membres de jury d'avoir accepté de juger et évaluer notre travail.

Grand merci pour Pr. Laouar Houcine (université Sétif-1) qui nous a aidés pour identifier la plante, ainsi que l'équipe du laboratoire de recherche de la phytothérapie appliquée aux maladies chroniques (université Sétif-1).

J'exprime mes profonds remerciements et mes sentiments de gratitude à **Mes parents** pour les conseils, le courage et leur soutien tout le long de mes études



ملخص

Bryonia dioica هو نبات طبي من عائلة *Cucurbitaceae*. يوجد في الجزائر في مناطق التل ويسمى محليا "برستم". يستخدم هذا النبات في الطب التقليدي لعلاج السرطان والأمراض الالتهابية. تم انجاز هذا العمل بهدف تقدير كمية بعض المركبات الكيميائية في النبات وكذا تقييم النشاطية المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا للمستخلصات المحضرة من درنات النبات. 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 0.57%، على التوالي). أظهر مستخلص الأستون الكميات الأعلى من عديدات الفينول (45.72 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك / مغ مستخلص)، من الفلافونويدات (12.36 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/مغ مستخلص) وكذلك من الدباغ (71.41 ميكروغرام مكافئ حمض التانيك / مغ مستخلص). أعطى نفس المستخلص أعلى قدرة على إرجاع الحديد بتقنية (FRAP) بقيمة امتصاص قصوى قدرت بـ $A=0.67$ عند تركيز 6 مغ/مل. في اختبار بيتا كاروتين / حمض اللينوليك، أظهرت جميع المستخلصات نشاطا ضعيفا مضادا للأكسدة، علما أن أعلى نسبة تثبيط كانت لمستخلص الهكسان بنسبة 45.74%. تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا على ثلاث سلالات بكتيرية (جرام + وجرام-)، مستخلص الأسيتون كان المستخلص الوحيد الذي أظهر نشاطية ضد البكتيريا *Staphylococcus aureus* بمنطقة تثبيط قدرت بـ 15 مم عند تركيز 200 مغ/مل.

الكلمات المفتاحية: *Bryonia dioica*، مستخلص، عديدات الفينول، FRAP، بيتا كاروتين، نشاطية مضادة للبكتيريا، *Staphylococcus aureus*.

Résumé

Bryonia dioica est une plante médicinale de la famille des *Cucurbitaceae*. En Algérie, on la trouve dans les régions du Tell et est appelée localement « Berestom ». Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des cancers et des maladies inflammatoires. On a fait ce travail dans le but de quantifier certains composés phytochimiques et d'évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits préparés à partir des tubercules de la plante. L'extraction des substances actives a été effectuée par quatre solvants à polarités différentes, en utilisant la technique de macération. Le rendement d'extraction le plus élevé a été 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 0.57%, respectivement). L'extrait d'acétone a montré les teneurs les plus élevées en polyphénols (45.72 µg équivalent d'acide gallique /mg d'extrait), en flavonoïdes (12.36 µg équivalent quercétine/mg d'extrait) et aussi en tannins (71.41 µg équivalent d'acide tannique /mg d'extrait). Le même extrait a donné le meilleur pouvoir réducteur de fer dans la méthode FRAP avec une valeur d'absorbance maximale de $A = 0.67$ à une concentration de 6 mg/ml. Dans le test de β -carotène/acide linoléique, tous les extraits ont montré une faible activité antioxydante, sachant que le pourcentage d'inhibition le plus élevé est celui de l'extrait d'hexane (45.74%). L'activité antibactérienne a été déterminée en utilisant trois souches bactériennes (Gram⁺ et Gram⁻), l'extrait acétonique était le seul extrait qui a montré une activité contre *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 15 mm à une concentration de 200 mg/ml.

Mots clés: *Bryonia dioica*, extrait, polyphénols, FRAP, β -carotène, activité antibactérienne, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Bryonia dioica is a medicinal plant from the *Cucurbitaceae* family. In Algeria, it is found in the Tell regions and it is locally called «Berestom». This plant is used in traditional medicine for the treatment of cancers and inflammatory diseases. This work was done to quantify some phytochemical compounds and to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from the plant tubers. The extraction of active substances was carried out by four solvents with different polarities, using the technique of maceration. The highest extraction yield was obtained for aqueous extract (32.75%) then methanolic extract (3.8%), while acetonic and hexanic extracts showed the lowest yields (1.2% and 0.57%, respectively). Acetone extract showed the highest amounts in polyphenols (45.72 µg equivalent of gallic acid/mg extract), in flavonoids (12.36 µg equivalent of quercetin/mg of extract) and also in tannins (71.41 µg equivalent of tannic acid/mg of extract). The same extract showed the best iron-reducing power in FRAP method with a maximum absorbance value of $A = 0.67$ at a concentration of 6 mg/ml. In the β -carotene/linoleic acid test, all extracts showed low antioxidant activity, knowing that the highest percentage inhibition was obtained by hexane extract (45.74%). The antibacterial activity was determined using three bacterial strains (Gram⁺ and Gram⁻), acetone extract was the only extract which showed an activity against *Staphylococcus aureus*, with an inhibition zone of 15 mm at a concentration of 200 mg/ml.

Key words: *Bryonia dioica*, extract, polyphenols, FRAP, β -carotene, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Structure du noyau phénol	6
2	Structure chimique des acides hydroxy-benzoïques	8
3	Structure de dérivés de l'acide hydroxycinnamiques	8
4	Structure des tannins hydrolysables (A) et condensés (B)	9
5	Structure de base des flavonoïdes	9
6	Cellule bactérienne et modes d'action des antibiotiques	15
7	La plante <i>Bryonia dioica</i>	17
8	Extraction aqueuse à partir des tubercules de <i>Bryonia dioica</i>	19
9	Extractions organiques à partir des tubercules de <i>Bryonia dioica</i>	20
10	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	22
11	Courbe d'étalonnage de la quercétine	23
12	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique	24
13	Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique	31
14	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Bryonia dioica</i> par la méthode de FRAP	32
15	Cinétique de blanchissement de β -carotène en présence des extraits aqueux et organiques de <i>Bryonia dioica</i> , de BHT (contrôle positif) et de DMSO (contrôle négatif).	33
16	Pourcentages d'inhibition des extraits aqueux et organiques de <i>B. dioica</i> et des témoins (BHT et DMSO) par le test de carotène/acide linoléique après 24h.	34
17	Activité antibactérienne de l'extrait acétonique de <i>B. dioica</i> (100 mg/ml) vis-à-vis de <i>S. aureus</i> (A) et de la gentamicine contre <i>S. aureus</i> (B), <i>E.coli</i> (C) et <i>P.aeruginosa</i> (D).	35

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Principaux composés chimiques de <i>Bryonia dioica</i>	5
2	Classes des composés phénoliques d'origine naturelle	7
3	Espèces réactives radicalaires et non radicalaires	10
4	Souches bactériennes utilisées dans l'étude de l'activité antimicrobienne	17
5	Rendements des extractions aqueuse et organique à partir les tubercules de <i>Bryonia dioica</i> .	28
6	Analyse phytochimique des différents extraits de <i>Bryonia dioica</i>	29
7	Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins totaux des extraits de <i>Bryonia dioica</i> .	30
8	Zones d'inhibition des extraits aqueux et organiques vis-à-vis des souches microbiennes	35

Liste des abréviations

1O₂: L'oxygène singulet

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ATB: Antibiotique

BHT: Butylated hydroxytoluene.

CAT: Catalase.

DMSO: Diméthyle sulfoxyde.

EAG: Equivalant d'acide gallique.

EAT: Equivalant d'acide tannique.

EQ : Equivalant de quercétine.

ERO: Espèce Réactives de l'oxygène

ROS : Reactive oxygen species

FRAP: Ferric reducing / antioxidant power

GPX: Glutathion peroxydase.

GM: Gentamicine

H₂O₂: Peroxyde D'hydrogène.

IC₅₀: Concentration inhibitrice de 50%.

NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide hydrogéné.

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NO: Monoxyde d'azote.

O^{•-} : Anion Superoxyde.

OH[•]: Radical hydroxyle.

ONOO[•]: Peroxynitrite.

SOD: Superoxyde Dismutase.

XO: Xanthine oxydase.

Sommaire

Remerciements

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction	1
---------------------------	----------

Chapiter 1:Revue bibliographique

1. La plante <i>Bryonia dioica</i>	3
1.1. La famille des <i>Cucurbitaceae</i>	3
1.2. Le genre <i>Bryonia</i> (Bryone)	3
1.2.1. Morphologie	3
1.2.2. Les espèces Algériennes du genre <i>Bryonia</i>	4
1.3. L'espèce <i>Bryonia dioica</i>	4
1.3.1. Description botanique	4
1.3.2. Classification.....	4
1.3.3. Synonymes et noms vernaculaires	4
1.3.4. Composition chimique.....	5
1.3.5. Utilisations thérapeutiques de la plante	5
2. Les polyphénols	6
2.1. Définition	6
2.2. Classification des polyphénols	6
2.2.1. Les acides phénoliques	7
2.2.2. Les tannins.....	8
2.2.3. Les flavonoïdes.....	9
3. Les radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants	10
3.1. Les radicaux libres	10
3.1.1. Définition	10
3.1.2. Les types des radicaux libres	10
3.1.3. Les sources des ROS.....	11
3.2. Le stress oxydant	12
3.2.1. Définition.....	12

3.2.2. Conséquences biochimiques du stress oxydant	12
3.2.4. Les maladies liées au stress oxydatif.....	13
3.3. Les antioxydants	13
3.3.2. Les types d'antioxydants	13
4. Les antimicrobiens et l'antibiorésistance	14

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

1. Matériel	17
1.1. Matériel végétal.....	17
1.2. Souches bactériennes	17
1.3. Produits chimiques.....	18
2. Méthodes	18
2.1. Préparation des extraits.....	18
2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux.....	18
2.1.2. Préparation des extraits organiques	18
2.2. Etude phytochimique	21
2.2.1. Les flavonoïdes	21
2.2.2. Les tannins.....	21
2.2.3. Les quinones	21
2.2.4. Les terpénoïdes	21
2.2.5. Les saponines.....	21
2.3. Dosages de quelques métabolites secondaires.....	22
2.3.1. Dosage des polyphénols totaux	22
2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	23
2.3.3. Dosages des tannins totaux	23
2.4. Etude de l'activité antioxydante des extraits de <i>Bryonia dioica</i>	24
2.4.1. Test de réduction du fer (FRAP)	24
2.4.2. Test du β - carotène/acide linoléique	25
2.5. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de <i>Bryonia dioica</i>	26
2.5.1. Préparation de l'inoculum.....	26
2.5.2. Méthode des puits de diffusion.....	26
2.6-Etude statistique	26

Chapitre 3: Résultats et discussion

1.Extraction.....	28
2. Etude phytochimique	29

3. Dosage des composés phénoliques de la plante	29
4. Activité antioxydante des extraits de <i>Bryonia dioica</i>	31
4.1. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)	31
4.2. Test de β -carotène/acide linoléique	33
5. Activité antibactérienne des extraits de <i>B. dioica</i>	35
Conclusion	38
Références bibliographiques.....	40

Introduction

Aujourd'hui, les plantes médicinales jouent un rôle très important et possèdent des propriétés pharmacologiques très intéressantes. Cette matière végétale contient un nombre considérable de propriétés thérapeutiques grâce à un énorme réservoir de composés bioactifs. Les composés phénoliques sont l'une des principales classes des métabolites secondaires des végétaux et de leurs produits. Ces composés ont suscité un grand intérêt en raison de leurs nombreux effets bénéfiques (biologiques et pharmacologiques) sur la santé humaine (Benslama et *al.*, 2020).

Le concept de stress oxydatif en tant que déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants. Le stress oxydatif est caractérisé par une production excessive d'espèces d'oxygène réactives (ROS). Ces événements moléculaires induisent l'oxydation des protéines et des lipides, conduisant à l'inflammation, et plusieurs maladies telles que les maladies cardiovasculaires (Touyz et *al.*, 2020).

Les propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (Yano et *al.*, 2006).

Bryonia dioica, connue localement par Berestom, est une plante qui appartient à la famille des Cucurbitacées, elle est considérée comme une source très riche en cucurbitacines. Cette plante peut être proposée comme une nouvelle source potentielle d'antioxydants naturels. Les racines ont été utilisées comme antiphlogistique, détoxifiant et antalgique, tandis que la plante entière était utilisée pour le traitement des scléroses, cancer du nez et tumeurs de l'utérus; elle peut être aussi une source efficace de composés actifs contre les bactéries (Wu et *al.*, 2005).

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

- La préparation des extraits aqueux et organiques à partir de la plante étudiée.
- L'investigation de la présence ou l'absence des principaux groupes des composés chimiques végétaux dans les extraits.
- L'étude quantitative des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins des extraits préparés.
- L'étude du pouvoir antioxydant des extraits de la plante par le test du pouvoir réducteur de fer et le test de blanchissement de β -carotène
- L'évaluation de la capacité antibactérienne des différents extraits de la plante par la méthode des puits de diffusion.

Chapitre 1

Revue bibliographique

1. La plante *Bryonia dioica*

1.1. La famille des *Cucurbitaceae*

Les cucurbitacées sont la plus grande famille de cultures fruitières et maraîchères, dont la plupart sont des vignes annuelles ou vivaces, mais certaines sont des arbustes ou des arbres ligneux et épineux, avec environ 960 espèces réparties dans près de 125 genres. Leur distribution a une prédominance tropicale, avec 90 % des espèces dans trois zones principales; Afrique et Madagascar, centre et Sud de l'Amérique, Asie du Sud-Est (Mukherje et *al.*, 2022). Les cucurbitacées sont une source importante de nutrition humaine (concombres, courges, courgettes, cornichons, melons, pastèques ...), mais un nombre non négligeable de ces espèces sont à l'origine d'intoxications, leur toxicité est en effet liée à la présence du principe toxique cucurbitacine, il a montré de nombreux symptômes indésirables tels que des vomissements, des diarrhées sanglantes, des lésions rénales, des spasmes, des arrêts respiratoires et aussi la mort (Ndhlala et *al.*, 2013).

1.2. Le genre *Bryonia* (Bryone)

1.2.1. Morphologie

Bryonia (du grec *bryein*, grandir ou s'étaler), le plus petit genre de la famille des Cucurbitacées qui fait partie des groupes relativement peu nombreux de plante à fleurs, comprend environ 12 espèces réparties dans toute l'Europe et l'Asie occidentale. Les espèces utilisées en médecine traditionnelle sont *Bryonia alba* et *Bryonia dioica*. À l'exception de *B. alba*, toutes les autres espèces de *Bryonia* sont dioïques (Kumar et *al.*, 2008).

Les espèces de *Bryonia* sont des herbes vivaces à racines tubéreuses ressemblant à un très gros navet. Ces plantes poussent dans des sites extrêmement secs et riches en nutriments où elles grimpent et recouvrent d'autres végétaux à l'aide de longues vrilles simples sur leurs tiges. Les fleurs de la plupart des espèces sont petites, blanc verdâtre et ont cinq étamines partiellement fusionnées ou, chez les fleurs femelles des staminodes. Les fruits sont des baies noires ou rouges, jusqu'à un centimètre de diamètre (Volz, 2008).

1.2.2. Les espèces Algériennes du genre *Bryonia*

Le genre *Bryonia* est représenté en Algérie par deux espèces qui sont : *B. acuta* et *B. dioica* (Quezel et Santa, 1963).

1.3. L'espèce *Bryonia dioica*

1.3.1. Description botanique

Bryonia dioica est une plante dioïque vivace. Les tiges contiennent de longues vrilles qui étendent entre les arbustes de nombreux mètres pendant la saison estivale. Les feuilles sont palmatilobées et cordiformes. Les fleurs fertiles avec de nombreux pétales hérissées, blanc-jaunâtres en général sans pédoncule, environ 2 à 5 fleurs fertiles réunies lorsque la tige et les feuilles sont fanées ; les fleurs mâles d'environ 12 à 18 mm tandis que les fleurs femelles mesurent environ 10 à 12 mm. Les fruits pendent autour des buissons, de la grosseur d'un pois, dressés, globuleux, lisses, avec une couleur écarlate pâle à la maturité, contenant six graines elliptiques. Les racines sont des tubercules vaguement cylindriques qui peuvent adopter des formes variées, leur odeur est forte, leur goût est très amer et leur couleur est jaune sale (Quezel et Santa, 1963 ; Jasiem et *al.*, 2020).

1.3.2. Classification

Bryonia dioica est présente en Algérie dans les régions du tell (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. Synonymes et noms vernaculaires

1.3.3.1. Synonymes

Bryonia sicula Guss, *Bryonia digyna* Pomel, *Bryonia ruderalis* Salisb, *Bryonia cretica* subsp. *Dioica* (Jacq) Tutin (Bock, 2011).

1.3.3.2. Noms vernaculaires

Bryonia dioica est localement nommée en Algérie « Fachira » et « Queriou'âa » (Benarba et al., 2019) et sous le nom de « Berestom » dans d'autres régions telle que M'sila. D'autres noms sont aussi utilisés comme : Aneb el dib, Dalia beida, TaYlouloula, Tara bouchechen, Tiferdoudi, Zenzou (Hammiche et al., 2013).

1.3.4. Composition chimique

Les parties aériennes de *bryonia dioica* contiennent des flavones C- glycosides, caroténoïdes et une protéine toxique dite la bryodifine est trouvée dans les fruits de la plante (Munoz et al., 1992 ; Krauze-Baranowska et Cisowski, 1994). Les racines renferment des composés tétra-terpènes cycliques oxygénés appelés cucurbitacines, des tri-terpènes glycosidiques tels que les bryonasides A à G, le cabenoside D et le bryoamaride (Ukiya et al., 2002). Les racines contiennent aussi l'acide bryonolique, des lipides contenant l'acide stéarique, palmitique, oléique, linoléique et myristique ; ainsi que des alcools (bryonol, alcool cérylique) et un alcaloïde amorphe et amer dit bryonicine (Tableau 1) (Barker et al., 2010).

Tableau 1 : Principaux composés chimiques de *Bryonia dioica* (Jasiem et al., 2020).

Partie de la plante	composés chimiques
Feuilles	Flavonoïdes (lutéoline, kaempferol), alcaloïdes, glycosides, stéroïdes phénoliques, glucides, anthraquinones, terpénoïdes
Fleurs	Acides phénoliques, flavonoïdes
Fruits	glucosidetri-terpéniques et cristaux d'oxalate de calcium
Racines	Kempférol 3,7-di-O-rhamnoside, polyphénols, stérols, triterpènes, alcaloïdes, hétérosides-c, glucides, saponines, terpénoïdes, flavonoïdes, tannins, quinones, sucres réducteurs, coumarines

1.3.5. Utilisations thérapeutiques de la plante

Bryonia dioica a des applications thérapeutiques internes et externes. Elle est prise oralement en petites quantités pour traiter diverses maladies inflammatoires, douleurs bronchiques, ulcères intestinaux, hypertension et asthme. Pour les applications externes, elle

est utilisée pour soulager les douleurs rhumatismales, les arthrites, les blessures et les lésions cutanées (González et *al.*, 2010). La plante aurait également de puissantes propriétés purgatives, émétiques, toniques et antidiabétiques (Matsuda et *al.*, 2010). Cette espèce est aussi traditionnellement utilisée comme médicament anticancéreux (Gonz'alez-Tejero et *al.*, 2008).

2. Les polyphénols

2.1. Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes ayant des propriétés biologiques différentes. C'est un groupe très large de substances dont l'élément structurel commun est un noyau aromatique attaché à un groupe hydroxyle libre ou lié (Figure 1) Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs fruits (Zillich et *al.*, 2015)..

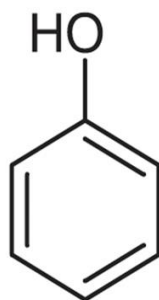


Figure 1 : Structure du noyau phénol (Sobiesiak, 2017).

2.2. Classification des polyphénols

Les polyphénols sont subdivisés en plusieurs groupes (Tableau 2). Les principales classes des composants phénoliques sont: les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins.

Tableau 2 : Classes des composés phénoliques d'origine naturelle (Ajila et al., 2011).

Classes	Structure
Phenols simples, benzoquinones	C6
Acides hydroxybenzoïques	C6 –C1
Acides hydroxycinnamiques, phenylpropanoïdes	C6 –C3
Naphthoquinones	C6 –C4
Xanthones	C6 –C1 -C6
Flavonoïdes, isoflavonoïdes	C6 –C3 -C6
Lignanes, neolignanes	(C6 –C3)2
Bioflavonoïdes	(C6 –C3 -C6)2
Lignine	(C6 –C3)n
Tannins condensés	(C6 –C3 -C6)n

2.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés organiques qui contiennent de l'acide carboxylique dans la composition chimique. Ils existent sous deux formes: les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique les deux principaux piliers des acides phénoliques (Altemimi et al., 2017).

2.2.1.1. Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque ont une formule de base de type (C6-C1) (Figure 2). Les dérivés substitués des acides hydroxybenzoïques sont les acides phénoliques prédominants dans les plantes. Parmi ces composés qui sont fréquemment trouvés dans les aliments : l'acide protocatéchique, vanillique, ellagique, gallique, salicylique, syringique et l'acide gentisique (Călinoiu et Vodnar, 2018).

2.2.1.2. Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques possèdent un noyau aromatique attaché à trois carbones C6-C3 (Figure 3). Comme exemples de ces composés : l'acide caféique, férulique, p-coumarique et sinapique. Ces acides existent rarement à l'état libre, généralement sous forme d'esters ou de glycosides) (Călinoiu et Vodnar, 2018).

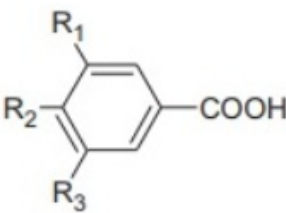
Benzoic Acid Derivatives	Substitutions		
	R1	R2	R3
			
Benzoic acid	H	H	H
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	H	OH	H
Protocatechuic acid	H	OH	OH
Vanillic acid	CH ₃ O	OH	H
Syringic acid	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallic acid	OH	OH	OH

Figure 2 : Structure chimique des acides hydroxy-benzoïques (Călinoiu et Vodnar, 2018).

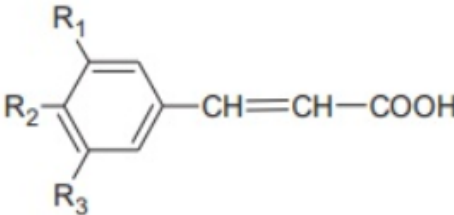
Cinnamic Acid Derivatives	Substitutions		
	R1	R2	R3
			
Cinnamic acid	H	H	H
<i>p</i> -Coumaric acid	H	OH	H
Caffeic acid	OH	OH	H
Ferulic acid	CH ₃ O	OH	H
Sinapic acid	CH ₃ O	OH	CH ₃ O

Figure 3 : Structure de dérivés de l'acide hydroxycinnamiques (Călinoiu et Vodnar, 2018).

2.2.2. Les tannins

Les tannins sont des biomolécules aux propriétés polyphénoliques, avec suffisamment d'hydroxyle et d'autres groupes appropriés (tels que le carboxyle) pour former des complexes insolubles avec diverses macromolécules. Les tannins sont principalement classés en deux groupes, les tannins hydrolysables ou tannins pyrogalliques, et les tannins condensés ou proanthocyanidines (Das et *al.*, 2020).

2.2.2.1. Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables (Figure 4A) sont le type le plus simple, ils se trouvent dans la gousse, l'écorce, le bois, les feuilles et les fruits. Ils résultent du métabolisme de l'acide gallique dérivé du Shikimate. Les tanins hydrolysables les plus courants sont : les esters

d'acides phénoliques, de sucres ou de leurs dérivés. Le sucre présent est principalement du glucose (Sharma *et al.*, 2021).

2.2.2.1. Les tannins condensés

Aussi connus sous le nom de proanthocyanidines, qui sont des oligopolymères non hydrolysables formées par la liaison C-4 d'une catéchine avec la liaison C-6 ou C-8 d'une catéchine monomère adjacente (Figure 4B). Les tannins condensés se trouvent généralement dans les tiges des légumineuses et des fourrages (Sharma *et al.*, 2021).

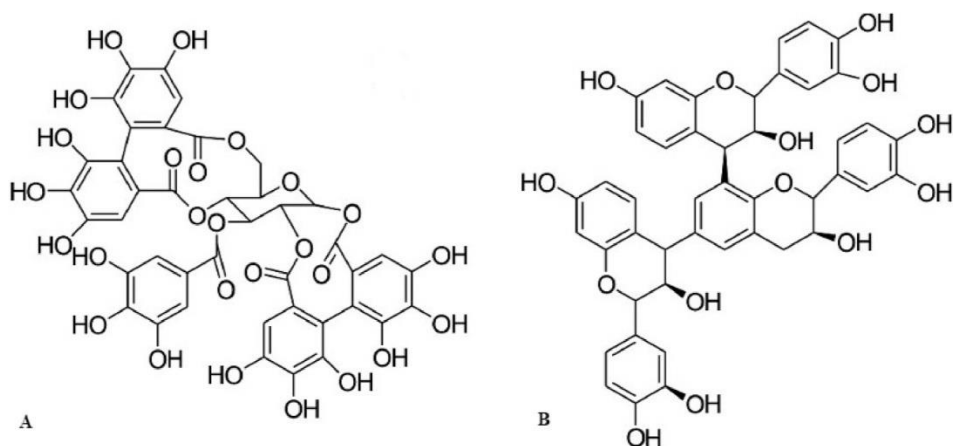


Figure 4 : Structure des tannins hydrolysables (A) et condensés (B) (Raja *et al.*, 2014).

2.2.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques typiques riches dans les plantes. Ils possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 (Figure 5) (Singh et Vidyasagar, 2018). Les flavonoïdes sont les pigments responsables des couleurs des fleurs et fruits.

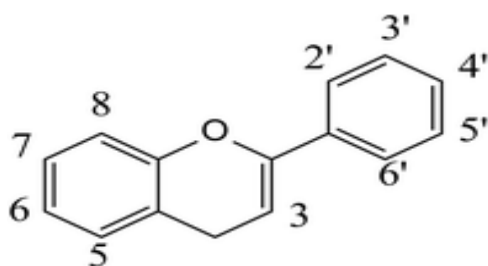


Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes (Fraga *et al.*, 2019).

3. Les radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants

3.1. Les radicaux libres

3.1.1. Définition

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état confère à la molécule une énergie instable. Lorsque cet électron libre est situé sur un atome d'oxygène, on parle alors « d'espèces réactives de l'oxygène » (ERO ou ROS) (Losada-Barreiro et Bravo-Diaz, 2017).

3.1.2. Les types des radicaux libres

Les ERO sont généralement divisées en espèces radicalaires et non-radicalaires (Tableau 3) (Munteanu et Apetrei, 2021).

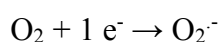
Tableau 3: Espèces réactives radicalaires et non radicalaires (Munteanu et Apetrei, 2021).

Espèces réactives de l'oxygène	Espèces non radicalaires
Le radical hydroxyle (HO•)	Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)
L'anion superoxyde (O ₂ •-)	L'oxygène singulet (1O ₂)
Le radical hydroperoxyde (HO ₂ •)	Ozone (O ₃)
Radical lipidique L•	Hydroperoxyde lipidique LOOH
radicalperoxyde (LOO•)	Acide hypochloreux HClO
Radical peroxy ROO•	Trioxyde de diazote N ₂ O ₃
Radical lipide alcoxyle LO•	Acide nitreux HNO ₂
dioxyde de nitrogène (NO ₂ •)	Chlorure de nitryle NO ₂ Cl
Monoxyde d'azote NO•	Anion nitroxyle NO ⁻
Radicaux protéiques P•	Cation nitrosyle NO ⁺

Parmi les espèces réactives citées ci-dessus, on va détailler seulement les espèces les plus communes :

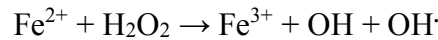
3.1.2.1. L'anion superoxyde (O₂•-)

L'oxygène subit une réduction monoélectrique conduisant à la formation du radical superoxyde au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) (Djenidi, 2020).

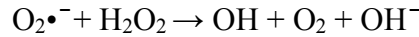


3.1.2.2. Le radical hydroxyle (HO•)

Les radicaux hydroxyles sont les radicaux libres les plus réactifs. Ils se forment in vivo soit en présence de cations métalliques (réaction de Fenton) (Zaho et *al.*, 2019) :

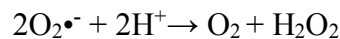


Soit au cours de la réaction non enzymatique de Haber et Weiss :



3.1.2.3. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le H₂O₂ est un oxydant très puissant, potentiellement toxique pour la cellule. C'est une ROS plus stable que les radicaux superoxydes en l'absence de métaux de transition mais hautement diffusible à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Le H₂O₂ est essentiellement produit à partir du radical superoxyde en présence de superoxyde dismutase qui catalyse la réaction suivante (Patterson et *al.*, 2019):



3.1.3. Les sources des ROS

3.1.3.1. ROS externes

Les sources exogènes comprennent O₃ et NO, principalement les gaz d'échappement automobiles, les médicaments (en particulier les anticancéreux), les rayonnements ionisants, les polluants chimiques (pesticides), les virus, les bactéries, les parasites et le tabagisme (actif et passif). L'alcool excessif et les conditions stressantes peuvent également conduire à la formation de radicaux libres (Favier, 2003).

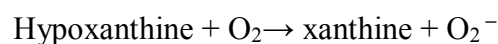
3.1.3.2. ROS internes

A. Origine mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle essentiel dans certaines fonctions biologiques telle la phagocytose. La mitochondrie forme le lieu principal de la consommation de l'oxygène, ce dernier transformé en ROS tel que l'anion superoxyde (kedache, 2018).

B. La Xanthine oxydase

Cette enzyme produit l'anion superoxyde par la réduction de l'hypoxanthine en xanthine (Battelli et *al.*, 2018)



C. La NADPH oxydase

Elle utilise l'oxygène pour produire l'anion superoxyde selon la réaction suivante (Migdal et Serres, 2011) :



3.2. Le stress oxydant

3.2.1. Définition

Le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre entre la production d'espèces oxydantes et leur neutralisation par les antioxydants (Surai et *al.*, 2019).

3.2.2. Conséquences biochimiques du stress oxydant

3.2.2.1. Oxydation de l'ADN

Les radicaux libres attaquent directement l'ADN et peuvent causer des dommages aux acides nucléiques comme l'oxydation des bases, des sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures des brins et des pontages ADN-protéines (Favier, 2003).

3.2.2.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont les éléments cellulaires les plus abondants et sont par conséquent des cibles importantes aux attaques radicalaires surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) qui contribuent aux altérations de la fonction des protéines et les modifications de leur conformation. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent plus sensibles à l'action des protéases (Ott et *al.*, 2007).

3.2.2.3. Peroxydation des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque pour le radical hydroxyle qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux double liaisons des acides gras, il résulte une altération de la fluidité membranaires qui conduit inévitablement à la mort cellulaire (Atkim et *al.*, 2005).

3.2.2.4. Oxydation des glucides :

Le glucose peut être oxydé dans les conditions physiologiques en présence des traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes. Ces phénomènes de glucoxydation contribuent à la fragilité de paroi vasculaires et la rétine chez les diabétiques (Favier, 2006).

3.2.4. Les maladies liées au stress oxydatif

Bien que les ROS à faibles concentrations jouent des rôles importants dans plusieurs fonctions dans le corps comme la signalisation intracellulaire et la défense contre les agents pathogènes, elles sont impliquées dans le développement de plusieurs maladies à concentrations plus élevées ; telles que l'arthrite, le cancer, le diabète, l'athérosclérose, l'ischémie et les maladies neurodégénératives (Rajendran et *al.*, 2014).

3.3. Les antioxydants

3.3.1. Définition

Un antioxydant est une molécule stable naturelle ou synthétique qui inhibe ou ralentit l'oxydation d'autre molécule en intervenant à différents stades du processus d'oxydation , pour donner un électron à un radical libre et réduisant sa capacité d'endommager les molécules biologiques. Les antioxydants jouent alors un rôle important dans la prévention des maladies chroniques (Nimse et Pal, 2015).

3.3.2. Les types d'antioxydants

3.3.2.1. Les antioxydants enzymatiques

A. La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme cellulaire qui joue un rôle particulier dans la neutralisation des effets du stress oxydatif associé à la présence de radicaux libres. Cette enzyme catalyse la réaction de recombinaison des radicaux oxygène. Elle empêche la formation de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène triplet (Munteanu et Apetrei, 2021).

B. La glutathion peroxydase (GPX)

C'est une enzyme de cinq isoformes, dépend de son substrat spécifique le glutathion réduit (GSH) et son rôle consiste à réduire les peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Benhar, 2018)

C. La catalase

C'est une hémoprotéine ubiquitaire située à l'intérieur des globules rouges, elle élimine le H₂O₂ standard dismutation qui se fait en deux étapes (Bensakhria, 2018) :

- Catalase (Fe III) + H₂O₂ → Catalase (Fe V) H₂O₂
- Catalase (Fe V) H₂O₂ + H₂O₂ → Catalase (Fe III) + H₂O + O₂

3.3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

A. La vitamine C

La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule hydrophile que l'on retrouve dans plusieurs fruits comme les citrons, les oranges et les fraises. Elle réagit directement sur les radicaux libres et élimine le H₂O₂ (Fabre et *al.*, 2015).

B. La vitamine E

Appelée aussi α -tocophérol, elle possède un pouvoir antioxydant très intéressant. La nature lipidique de l' α -tocophérol lui donne la capacité d'agir sur le site de la peroxydation lipidique membranaire. La vitamine E agit conjointement avec la vitamine C pour donner lieu à une chaîne de détoxications des radicaux libres (Annaházi et *al.*, 2007).

C. Les polyphénols

Les composés phénoliques ont des capacités anti-radicalaires, ils peuvent exercer un effet antioxydant direct en piégeant les ROS, ou indirect en protégeant les enzymes antioxydantes endogènes du corps humain (Oroian et Escriche, 2015).

D. Les oligoéléments

Tels que le cuivre, le zinc, le sélénium, le manganèse et le fer sont des minéraux nécessaires au corps humain, ils jouent le rôle de cofacteurs importants pour l'activité des enzymes antioxydants endogènes impliquées dans la détoxification des ERO générées lors du stress oxydatif (Mates, 2000).

4. Les antimicrobiens et l'antibiorésistance

Les plantes médicinales, notamment celles utilisées de façon traditionnelles constituent une source potentielle de composés antimicrobiens. La résistance des bactéries aux antibiotiques soulève de sérieuses inquiétudes à l'échelle mondiale. Les plantes médicinales pourraient améliorer les stratégies de traitement actuelles des infections bactériennes (Md Shahadat et *al.*, 2018).

Les agents antibactériens ont la propriété de tuer les bactéries ou d'en limiter la multiplication. Elles peuvent agir en inhibant la synthèse de la paroi ou de la membrane bactérienne, la synthèse protéique ou la synthèse de l'ADN (Figure 6) (Lesseur, 2014).

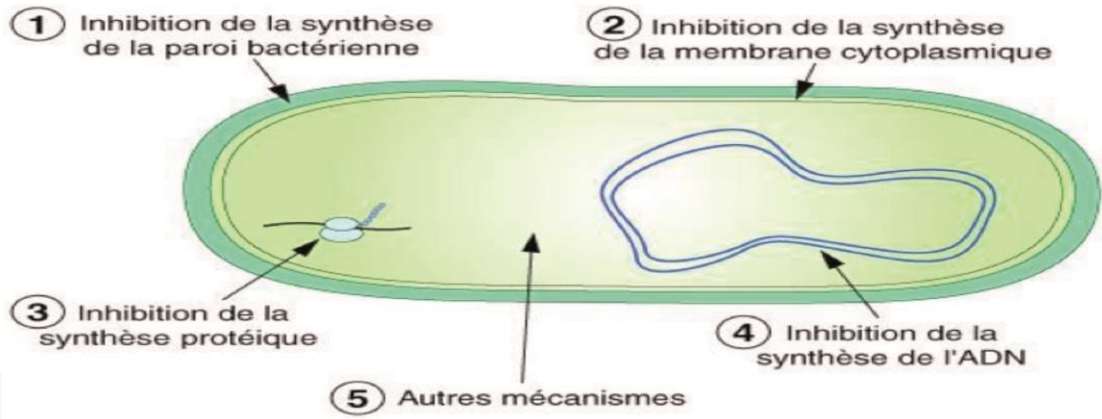


Figure 6 : Cellule bactérienne et modes d'action des antibiotiques (Lesseur, 2014).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

La plante *Bryonia dioica* (Figure 7) a été récoltée en mars 2021 de la région de Beni Yalmane à M'sila. Le matériel végétal a été identifié par Pr. Laouar Hocine (Université Ferhat Abbas-Sétif 1). Les tubercules ont été séparés, bien lavés, écaillés et coupés en couches fines. Après séchage à l'obscurité pendant 7 jours, les tubercules ont été broyés et la poudre obtenue a été ultérieurement utilisée pour la préparation des extraits.



Figure 7: La plante *Bryonia dioica*. A : Partie aérienne et tubercules, B : Fleurs de la plante, C : Plante poussant sous Jujubier.

1.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont des souches de références (Tableau 4), ce sont fournies par le laboratoire de microbiologie du département de Microbiologie et Biochimie.

Tableau 4 : Souches bactériennes utilisées dans l'étude de l'activité antimicrobienne.

SOUCHE	Gram	Référence
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC22922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC22923

ATCC: American type culture collection.

1.3. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans cette étude sont : Le méthanol pur (CH₃OH), hexane, acétone, quercétine, Chlorure d'aluminium (AlCl₃), carbonate de sodium (Na₂CO₃), Folin-Ciocalteu, acide gallique, acide trichloracétique (TCA), Ferricyanide de potassium (K₃FeCN₆), chlorure ferreux (FeCl₃), l'acide ascorbique et l'hydroxytoluène butylé (BHT). Ils proviennent de Sigma, Fluka, Biochem et pro lab. Les solvants utilisés proviennent de Sigma-Aldrich, Honeywell et AnalaR NORMAPUR.

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits

Différents types d'extraits ont été préparés à partir de la poudre de la plante *Bryonia dioica*, par l'utilisation de quatre solvants de différentes polarités : l'eau distillée, le méthanol, l'acétone et l'hexane, et en suivant différentes méthodes d'extractions (décoction, macération)

2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux a été obtenu par la macération de 50 g de poudre de l'échantillon dans un volume de 500ml d'eau distillée à 70°C durant une heure avec agitation. Après macération durant 48h avec agitation occasionnelle, la filtration du mélange a été réalisée par du coton puis par du papier whatman. Le filtrat est ensuite soumis à une évaporation par un rotavapor pour éliminer l'eau. L'extrait obtenu est séché à l'étuve et conservé à 4°C jusqu'à utilisation (Figure 8) (Gnanaprakash et al., 2010).

2.1.2. Préparation des extraits organiques

L'extraction organique a été effectuée par la macération successive par trois solvants à polarité croissante (hexane, acétone et méthanol) selon la méthode décrite par Siracusa et ses collaborateurs en 2011, avec quelques modifications. 50g de poudre de la plante ont été extraits avec 500 ml d'hexane et placés sous agitation occasionnelle durant 2 jours à température ambiante et à l'abri de la lumière. La filtration du mélange est réalisée par du coton puis par du papier whatman, le filtrat est soumis à une évaporation et l'extrait obtenu est ensuite séché à l'étuve et conservé dans des eppendorfs à 4°C jusqu'à utilisation. Les résidus de la plante issus de l'extraction précédente ont été repris et macérés dans 500 ml d'acétone et laissés sous agitation occasionnelle durant 2 jours, les résidus sont à nouveau extraits par 500 ml de méthanol pendant 2 jours, en suivant la même méthode utilisée pour l'hexane (Figure 9).

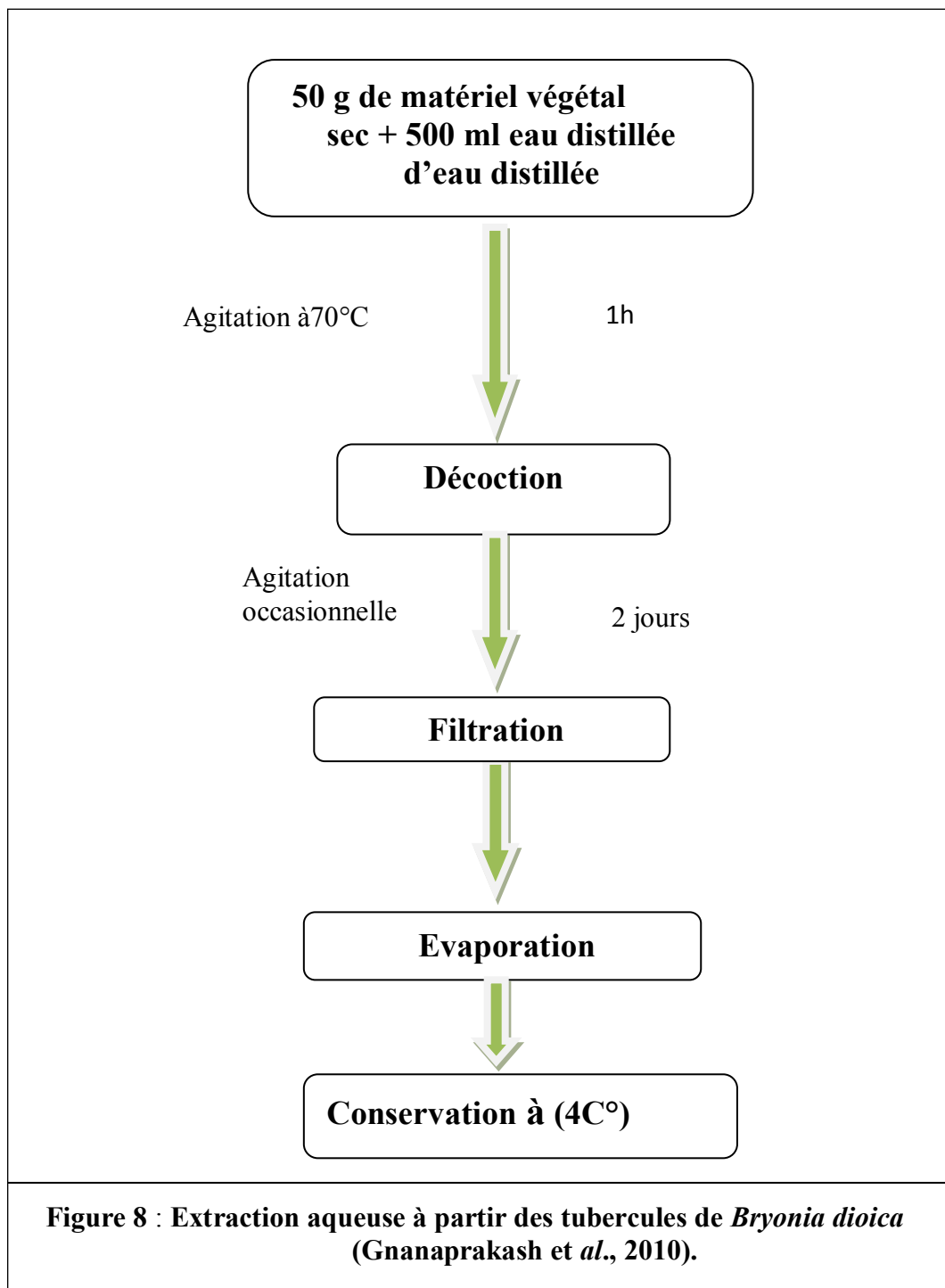


Figure 8 : Extraction aqueuse à partir des tubercules de *Bryonia dioica* (Gnanaprakash et al., 2010).

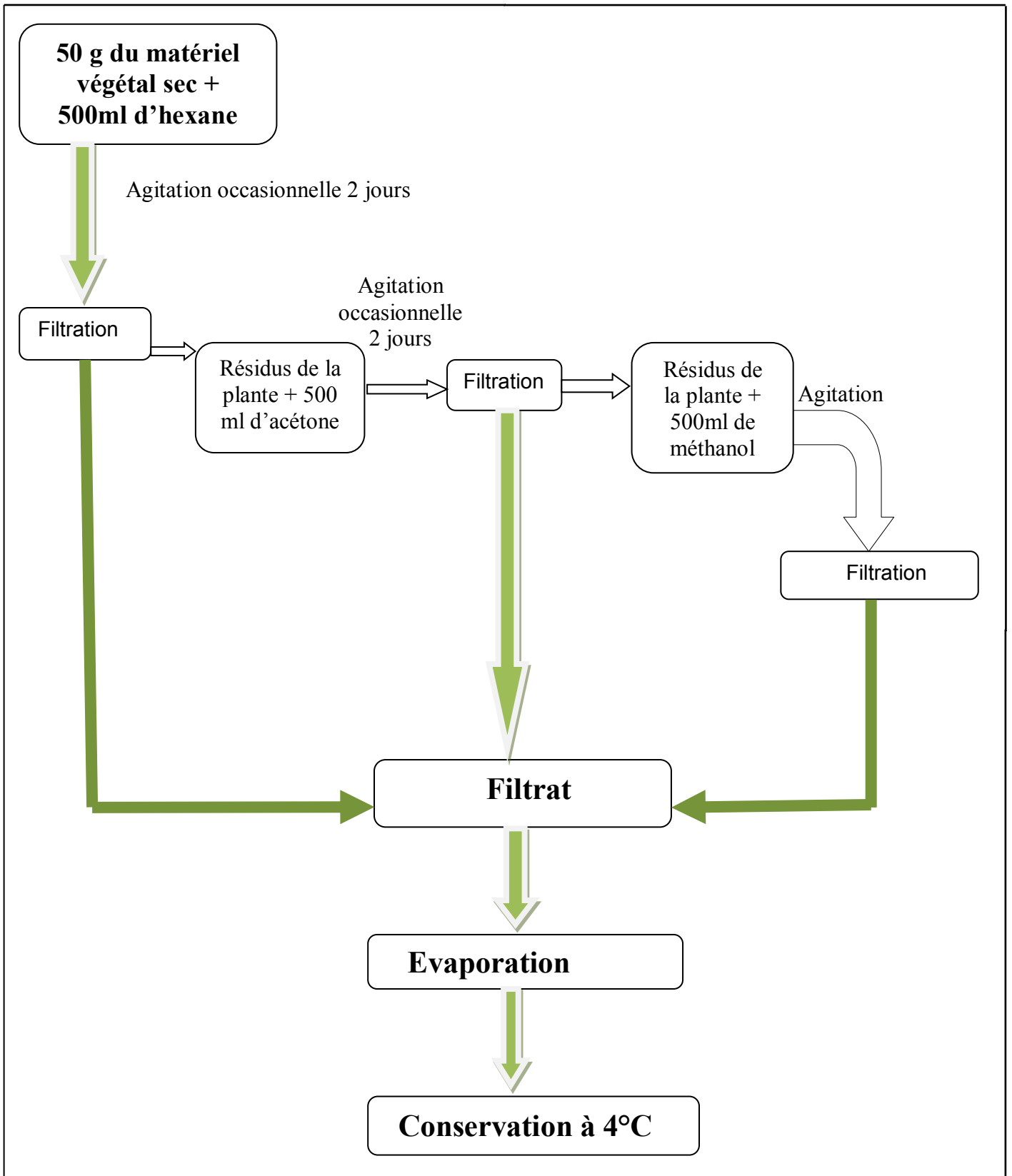


Figure 9 : Extractions organiques à partir des tubercules de *Bryonia dioica* (Siracusa et al., 2011).

2.2. Etude phytochimique

Pour vérifier la présence ou l'absence de certaines familles chimiques dans les extraits de la plante *Bryonia dioica*, un ensemble de tests qualitatifs qui se basent sur des méthodes standards décrites par Ganatra et ses collaborateurs (2012) ont été utilisés.

2.2.1. Les flavonoïdes

La présence de flavonoïdes dans les différents extraits a été mise en évidence par la réaction suivant : quelques gouttes d'hydroxyde de sodium (NaOH) dilué sont ajoutées à 1 ml d'extrait étudié a une concentration 4 mg/ml. L'apparition d'une couleur jaune intense puis sa disparition à l'addition de quelques gouttes d'acide dilué indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait.

2.2.2. Les tannins

La détection des tannins est réalisée par l'ajout de quelques gouttes de la solution de FeCl_3 (0.1%) à 1 ml de chaque extrait à une concentration de 4 mg/ml. Après agitation et au bout de quelques minutes, la réaction avec le chlorure ferrique développe une coloration noir verdâtre ou noir bleuâtre qui indique la présence des tannins.

2.2.3. Les quinones

La recherche des quinones est effectuée par la procédure suivante: 0.5 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) sont ajoutées a 0.5 ml de chaque extrait (4 mg/ml). L'apparition d'une coloration rouge confirme la présence des quinones.

2.2.4. Les terpénoïdes

La réalisation de la réaction s'effectue par l'ajout de 0.5 ml de chloroforme à 1 ml de chaque extrait (4mg/ml), puis de 0.75 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4). La formation d'anneau brun rougeâtre à l'interface indique que le test est positif.

2.2.5. Les saponines

Dans un tube à essai, 0.5 ml d'extrait à une concentration de 4 mg/ml sont dilués par 3 ml d'eau distillée et agités vigoureusement pendant 15 minutes. Laisser reposer et on remarque la présence de la mousse produite dans le tube qui indique la présence des saponines.

2.3. Dosages de quelques métabolites secondaires

2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits de la plante est déterminée par la méthode colorimétrique de Folin–Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Elle est basée sur la réduction en milieu alcalin d'un mélange de phosphotungstène (WO_4^{2-}) et phosphomolybdène (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un produit de réduction de couleur bleue.

Dans un tube essais un aliquote de 200 μl de chaque extrait à une concentration de 2 mg/ml ou 200 μl de DMSO utilisé pour dissoudre les extraits (blanc) sont mélangés avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10 %). Après agitation et incubation durant 4 min, on ajoute 800 μl de carbonate de Sodium (Na_2CO_3) à une concentration de 75 g/l, le tout est agité puis incubé pendant 2 h à l'obscurité et à température ambiante. La lecture est effectuée au spectrophotomètre UV-VIS à une longueur d'onde (λ) de 765 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisé, en parallèle, dans les mêmes conditions opératoires à l'aide de l'acide gallique qui est utilisé comme étalon (dissout dans le méthanol) préparé à des concentrations différentes (10, 20, 40 et 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Figure 10). Les concentrations de polyphénols dans les extraits sont calculées et exprimées en μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait sec (μg EAG/mg E).

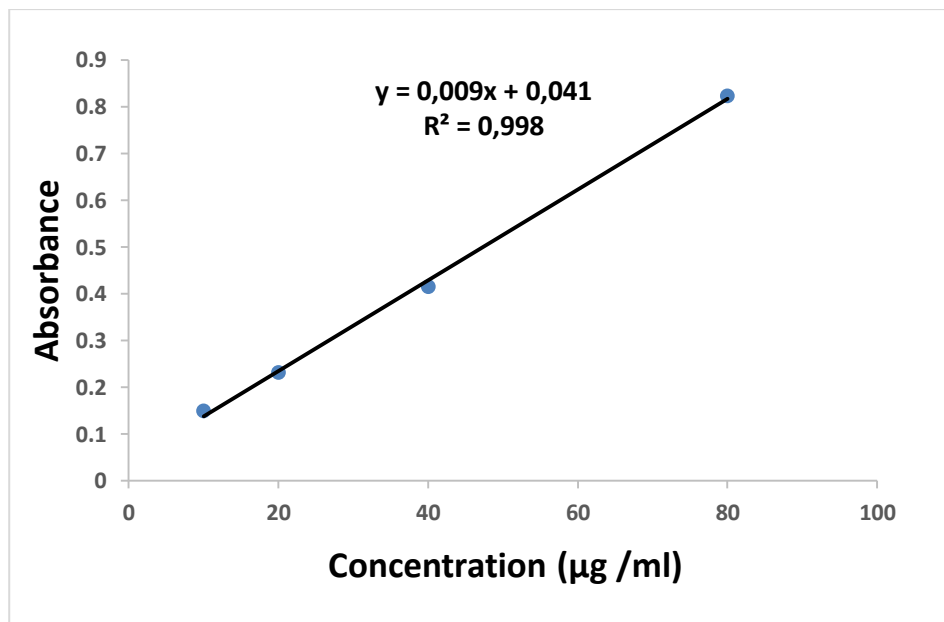


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.3.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits de plantes est estimé par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Bahorun et *al.*, 1996). Le principe est basé sur l'oxydation des flavonoïdes qui possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, par le réactif (AlCl_3) qui est susceptible de donner avec le groupement CO un complexe coloré ; les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium).

Un volume de 1 ml des extraits préparés à des concentrations différentes (2 et 4 mg/ml) est mélangé avec 1 ml d' AlCl_3 (2%). Après incubation à l'obscurité durant 10 min, l'absorbance est mesurée à $\lambda = 430$ nm. Une courbe d'étalonnage réalisée par la quercétine (dissoute dans le méthanol) à différentes concentrations (5, 10, 20 et 40 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 11). La concentration des flavonoïdes est exprimée en μg d'équivalent de la quercétine par mg d'extrait sec ($\mu\text{g EQ/mg E}$).

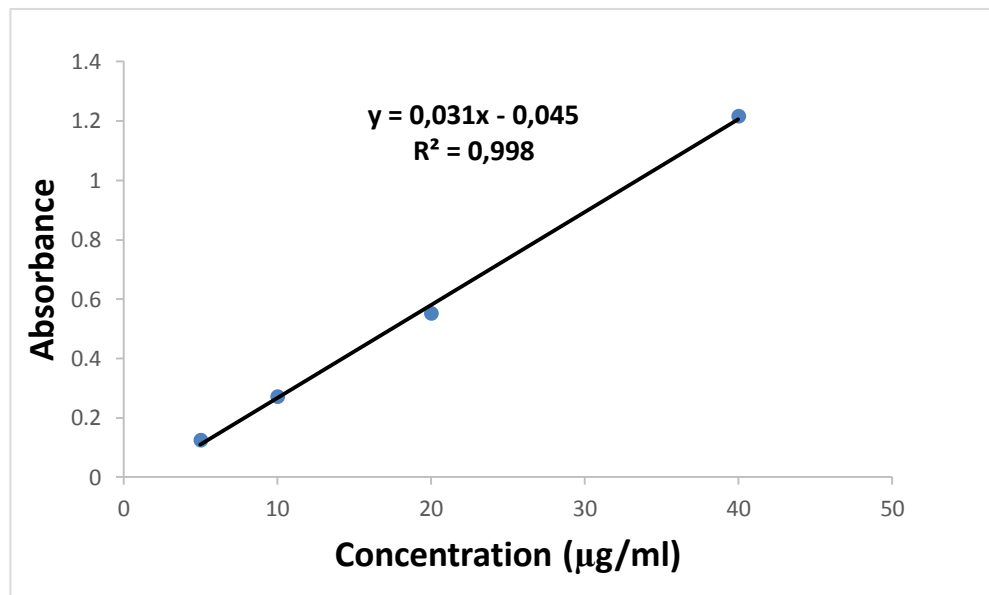


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

2.3.3. Dosages des tannins totaux

Le contenu en tannins dans les extraits de la plante étudiée a été estimé selon la méthode décrite par Prasanth et ses collaborateurs en 2017.

Dans cet essai, 350 μl de chaque extrait (3 mg/ml dans le DMSO) sont mélangés avec 1.5 ml de Folin-Ciocalteu (10%). Après agitation, 1.5 ml de Na_2CO_3 (7.5%) sont ajoutés et le

mélange final a été incubé pendant 45 min à 45°C. L'absorbance est déterminée à $\lambda = 765$ nm. L'acide tannique est utilisé comme standard à différentes concentrations (37.5, 75, 150, 300 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 12). Les teneurs en tannins totaux sont exprimées en μg d'équivalent d'acide tannique par mg d'extrait sec.

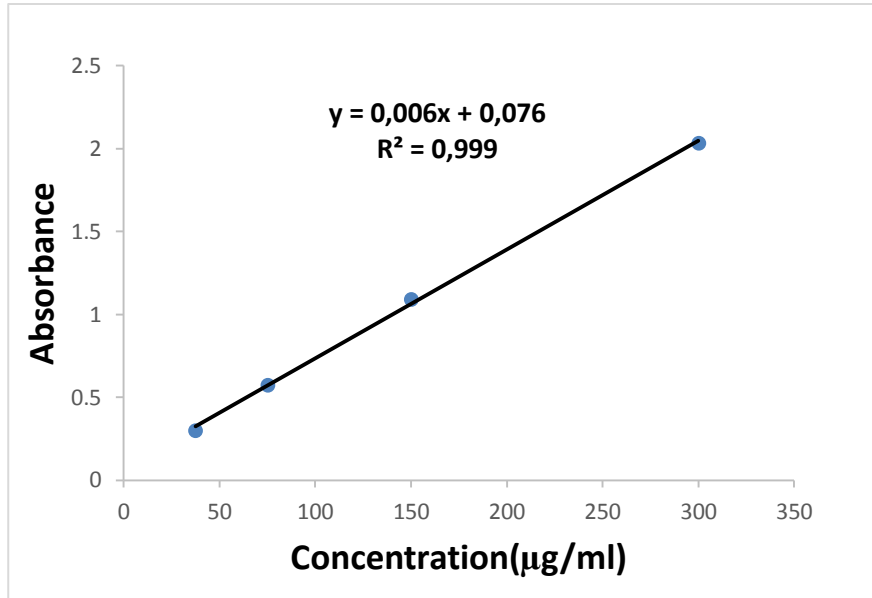


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.
Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

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 réduction du fer (FRAP)

L'activité antioxydante totale des extraits peut être estimée par l'évaluation du pouvoir antioxydant réducteur ferrique. Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). Ce test est effectué selon la méthode décrite par Maruthamuthu et Kandasamy (2016).

2.4.1.1. Préparation du tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6)

On dissout 8 g de chlorure de sodium (NaCl), 0.2 g chlorure de potassium (KCl), 1.44 g de sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4), 0.24 g de dihydrogénophosphate de potassium

(KH₂PO₄) dans 800 ml d'eau distillée ensuite, on ajuste le pH à 6.6 par l'acide chlorhydrique et on complète le volume par l'eau distillée à 1 litre.

2.4.1.2 - Réalisation du test

0.5 ml de chaque extrait (dissouts dans le DMSO) à différentes concentrations sont ajoutés à 1250 µl de tampon phosphate (0.2 M, pH 6,6) et 1250 µL de ferricyanure de potassium à 1 %. Le mélange réactionnel est bien agité et ensuite incubé à 50°C pendant 20 minutes dans un bain marie. A la fin de l'incubation, 1250 µl d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés au mélange et centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 minutes. Ensuite 1250 µl du surnageant sont mélangés avec 1250 µl d'eau distillé et 250 µl de chlorure ferrique à 0,1%. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif préparé à différentes concentrations. Chaque solution a été répétée trois fois. Enfin, la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer.

2.4.2. Test du β- carotène/acide linoléique

La capacité antioxydante des extraits est estimée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydro-péroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique. Le test est réalisé selon la méthode décrite par Dapkevicius et ses collaborateurs (1998).

La préparation de la solution de β- carotène consiste à dissoudre 0.5 mg de β- carotène dans 1 ml de chloroforme, à laquelle on ajoute 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation de chloroforme par Rotavapor (40°C), 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation vigoureuse. A partir de la nouvelle solution, on met 2.5 ml dans des tubes à essai et on ajoute 350 µl de chaque extrait à une concentration de 3 mg/ml ou de l'hydroxytoluène butylé (BHT) utilisé à même concentration comme contrôle positif, ou encore de DMSO utilisé comme contrôle négatif. Chaque solution est répétée trois fois. L'absorbance des solutions est mesurée à 490 nm au temps « 0 » puis à différents intervalles de temps : 1h, 2h, 3h, 4h, 24h et 48h. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la relation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_t / A_{t_0}) * 100$$

A_t: absorbance au temps (t).

A_{t₀}: absorbance initiale.

2.5. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de *Bryonia dioica*

2.5.1. Préparation de l'inoculum

On a préparé des suspensions pour chaque souche bactérienne ; les bactéries ont été activées dans un bouillon nutritif à 37°C pendant 24 heures puisensemencées en stries sur une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN) pour leur croissance pendant environ 24 heures à 37°C. Ensuite on prélève une colonie de chaque bactérie activée et on la met dans un tube en verre contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Après agitation, l'inoculum a été ajusté à une turbidité standard de 0,5 McFarland qui correspond à une densité optique de 0,08-0,12 pour atteindre une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml (Khribch et *al.*, 2018).

2.5.2. Méthode des puits de diffusion

Des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller Hinton sontensemencées aseptiquement par les suspensions bactériennes préalablement préparées. L'ensemencement se fait par écouvillonnage et la gélose est ensuite perforée pour former des puits de 7mm de diamètre. Les cavités ainsi formées sont remplies de l'extrait (30 μ l) à des concentrations de 100 et 200 mg/ml. Le solvant DMSO est utilisé comme contrôle négatif et la gentamycine comme contrôle positif. Les boites sont mises à 4°C pendant 2 h pour assurer la diffusion des extraits testés dans le milieuensemencé, les boites sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h. La lecture des résultats se fait après l'incubation par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits ; plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Bouyahya et *al.*, 2017).

2.6. Etude statistique

Les résultats des effectués sont exprimés en moyenne de trois répétitions \pm SD. La signification statistique entre le contrôle positif et les échantillons est déterminée par le test de Student et les différences sont considérées significatives au seuil de 5% ($p < 0.05$). Les courbes et les histogrammes ont été réalisés à l'aide de programme Microsoft Excel 2007, et les analyses statistiques ont été effectués par le logiciel GraphPad Prism 7.04.

Chapitre 3

Résultats et discussion

1. Extraction

La procédure de l'extraction à partir des tubercules de *Bryonia dioica* a été effectuée par quatre solvants de polarité croissante et a abouti à l'obtention des extraits : aqueux, méthanolique, acétonique et hexanique. Les rendements d'extraction sont exprimés en pourcentage (%) de masse d'extrait par rapport à la masse initiale du matériel végétal. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Rendements des extractions aqueuses et organiques à partir des tubercules de *Bryonia dioica*.

Extrait	Rendement (%)
Aqueux	32.75
Méthanol	03.80
Acétone	01.20
Hexane	00.57

Puisque chaque solvant est capable d'extraire des composés phytochimiques spécifiques, on a utilisé quatre solvants de polarités différentes afin d'extraire le maximum de constituants chimiques de la plante (Fleurentin et *al.*, 1991).

Selon le tableau ci-dessus, l'extrait aqueux représente le rendement le plus élevé (32.75%), suivie par l'extrait du méthanol (3.8%), puis l'extrait d'acétone (1.2%) et le rendement le plus faible est obtenu par l'extrait hexanique (0.57 %). On peut conclure que le rendement de la plante étudiée augmente avec la polarité des solvants d'extraction.

Le rendement de l'extraction peut varier selon plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction, la durée de macération du matériel végétal dans le solvant, la température, le solvant utilisé et la nature chimique de l'échantillon (Su et *al.*, 2006).

La récupération des composés phénoliques d'une plante se fait en utilisant des solvants polaires. Les extraits aqueux sont connus pour être riches en phénols polaires et en flavonoïdes hautement polaires (flavonoïdes di, tri et tétra-glycosylés). Le méthanol permet l'extraction des flavonoïdes, des aminoacides et quelques terpènes. L'acétone est également un solvant couramment utilisé dans l'extraction des plantes pour préparer les extraits riches en flavonoïdes, tandis que l'hexane peut généralement extraire les lipides et les flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés (Boussoualim, 2018).

2. Etude phytochimique

Les résultats des divers tests phytochimiques effectués sur les extraits de la plante étudiée sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Analyse phytochimique des différents extraits de *Bryonia dioica*.

Extrait	Aqueux	Méthanol	Acétone	Hexane
Les flavonoïdes	+	+	+	+
Les tannins	+	+	+	-
Les quinones	+	+	+	+
Les terpénoïdes	-	+	+	-
Les saponines	-	-	-	-

(+) : présence, (-) : absence.

Les résultats de l'analyse phytochimique des différents composés chimiques présents dans les extraits de *Bryonia dioica* permettent de confirmer la présence des flavonoïdes, et des quinones dans tous les extraits étudiés, alors que les tannins sont présents dans tous les extraits à l'exception de l'extrait d'hexane. Les terpénoïdes sont présents seulement dans les extraits méthanol et acétone ; les saponines sont absents dans tous les extraits.

Les flavonoïdes et les tannins sont les polyphénols les plus fréquents dans les plantes (fraga et Oteiza, 2011). Les quinones se distinguent par leur activité antimicrobienne, ils possèdent des cycles aromatiques avec deux substituants cétones. Les terpénoïdes sont des dérivés de terpènes et sont des précurseurs pour la synthèse des stéroïdes dans les plantes (Tiwari et al., 2011).

Une étude réalisée par Chekroun et al. (2015) a confirmé la présence des flavonoïdes, des tannins, des quinones, des terpénoïdes et des saponines dans les extraits aqueux et butanolique préparés à partir des racines de *B. dioica*. Ces résultats sont alors en accord avec ceux obtenus dans la présente étude, à l'exception de l'absence des saponines dans nos extraits. Une autre étude réalisée par Kadhim (2014) a montré la présence des flavonoïdes et des terpénoïdes, ainsi que l'absence des tannins et des saponines dans les feuilles de la plante.

3. Dosage des composés phénoliques de la plante

La détermination de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins totaux des extraits de *Bryonia dioica* a été réalisée par des tests spectrophotométriques. Les résultats

sont exprimés en termes d'équivalents d'un standard à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Tableau 7)

Tableau 7: 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	18.518 \pm 0.628	00.763 \pm 0.018	24.222 \pm 0.012
Méthanol	39.518 \pm 1.414	00.903 \pm 0.000	36.720 \pm 5.290
Acétone	45.722 \pm 0.925	12.362 \pm 0.558	71.416 \pm 0.036
Hexane	11.592 \pm 0.778	11.540 \pm 0.193	05.444 \pm 0.012

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

Selon les résultats obtenus, l'extrait d'acétone est le plus riche en polyphénols par rapport aux autres extraits (45.722 $\mu\text{g EAG/mgE}$), Suivi par l'extrait méthanolique (39.518 $\mu\text{g EAG/mgE}$), alors que les extraits aqueux et hexanique sont les plus pauvres en polyphénols avec des concentrations de 18.518 et 11.592 $\mu\text{g EAG/mgE}$, respectivement.

Dans le dosage des flavonoïdes, l'extrait acétonique semble le plus riche aussi en flavonoïdes avec une concentration de 12.362 $\mu\text{g EQ/mgE}$, suivi par l'extrait hexanique (11.540 $\mu\text{g EQ/mgE}$), puis l'extrait méthanolique (0.903 $\mu\text{g EQ/mgE}$) et enfin l'extrait aqueux (0.763 $\mu\text{g EQ/mgE}$) qui ont montré une quantité très faible de flavonoïdes. On peut remarquer que la teneur des flavonoïdes est plus élevée dans les extraits préparés par les solvants les moins polaires.

La détermination des teneurs en tannins totaux dans les extraits a révélé que l'extrait d'acétone contient aussi la teneur la plus élevée (71.416 $\mu\text{g EAT/mgE}$), suivi de l'extrait méthanolique (36.720 $\mu\text{g EAT/mgE}$) et l'extrait aqueux (24.222 $\mu\text{g EAT/mgE}$). L'extrait hexanique a donné une concentration faible égale à 5.444 $\mu\text{g EAT/mgE}$.

Les résultats obtenus sont loin de ceux décrits par Chekroun et ses collaborateurs (2015) qui ont trouvé que la teneur en polyphénols dans l'extrait aqueux est égale à 226.87 mg EAG/gE. Ils ont aussi mentionné que l'extrait butanolique des tubercules contient 541.78 mg EAG/gE de polyphénols. Alors que la teneur en flavonoïdes dans l'extrait aqueux et butanolique contiennent 53.67 et 120.6 mg d'équivalents de la catéchine par g d'extrait,

respectivement. Dans l'étude publiée par Bourhia et ses collaborateurs (2020), le méthanol a été utilisé comme solvant pour extraire les molécules actives des racines de la plante ; La teneur des polyphénols dans cet extrait était de 430.643 mg EAG/gE, alors que la teneur en flavonoïdes était de 7.216 mg EQ/gE. On peut expliquer cette différence par l'origine différente de la plante (endroit de la récolte), où les conditions climatiques et pédologiques sont différentes d'une zone à l'autre (Bentahar *et al.*, 2020).

4. Activité antioxydante des extraits de *Bryonia dioica*

Pour étudier l'activité antioxydante des extraits, on a utilisé deux tests différents : le test de réduction du fer et le test de blanchissement du β -carotène.

4.1. Pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP)

Les résultats obtenus dans cet essai sont résumés dans les figures 13 et 14.

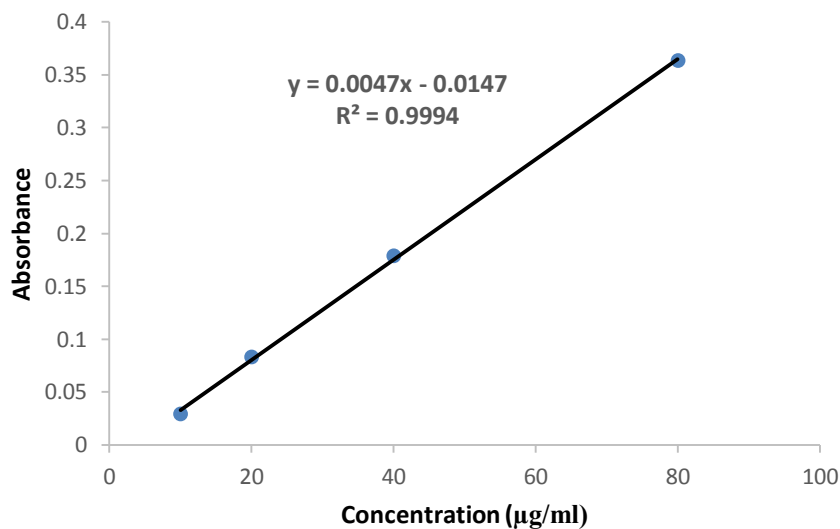


Figure 13 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

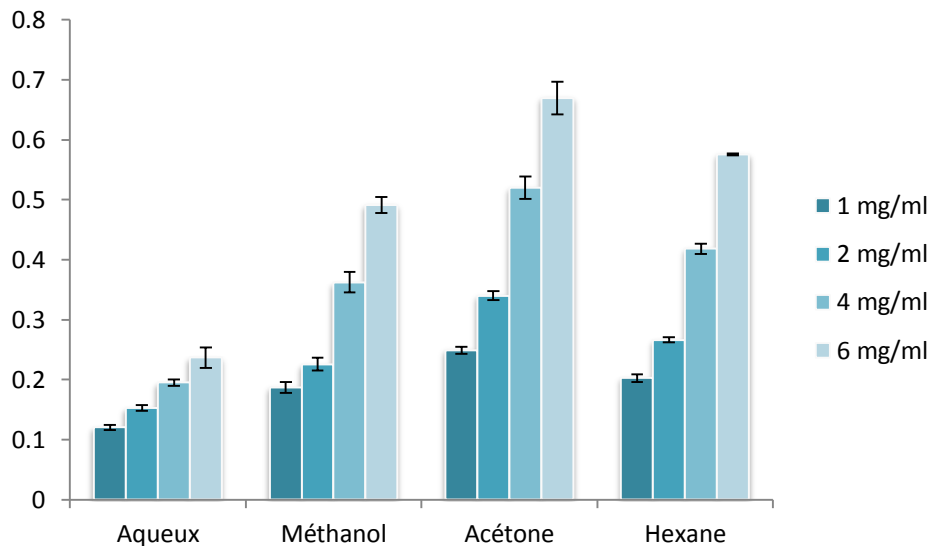


Figure 14 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Bryonia dioica* par la méthode de FRAP.

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

Dans ce test, les antioxydants des extraits ont la capacité de réduire les ions ferriques en donnant un électron, cette réaction se manifeste par le changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au bleu. Plus l'absorbance est élevée, plus l'extrait est actif (Apak et *al.*, 2016).

Les résultats obtenus dans la présente 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 0.36 pour la concentration (80 μ g/ml). Parmi les extraits étudiés, l'extrait acétonique a montré la meilleure capacité réductrice ($A = 0.67$) par rapport aux autres extraits pour la même concentration (6 mg/ml), suivi de l'extrait hexanique ($A = 0.57$), puis l'extrait méthanolique ($A = 0.49$) et enfin l'extrait aqueux ($A = 0.23$) qui a donné la plus faible capacité réductrice. L'extrait d'acétone qui a donné la meilleure activité dans ce test était aussi la fraction la plus riche en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. On remarque aussi que le pouvoir réducteur de fer des extraits de la plante est proportionnel à leur contenu en flavonoïdes.

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.

4.2. Test de β -carotène/acide linoléique

Un autre aspect a été visé pour mieux évaluer l'effet antioxydant in vitro des quatre extraits: la technique de blanchissement du β -carotène. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à l'absorbance initiale (Figure 14 et 15).

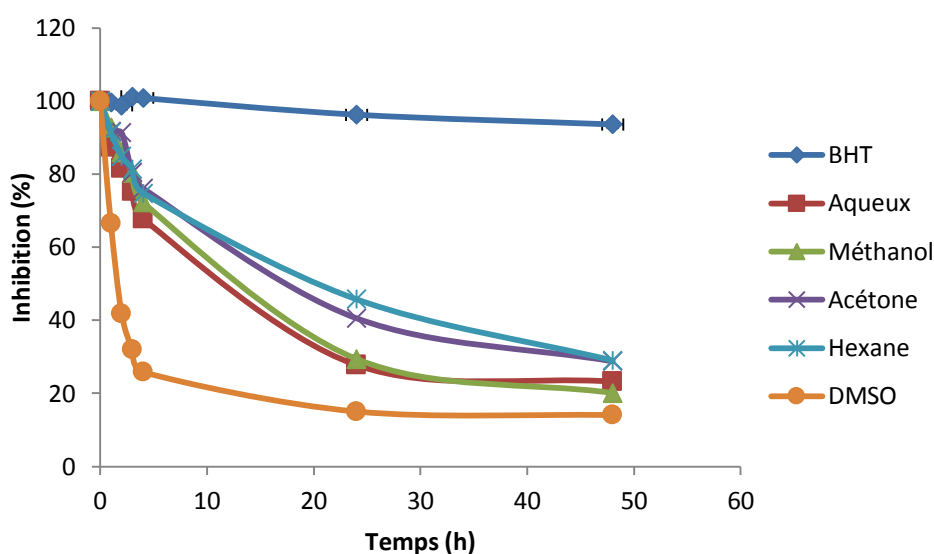


Figure 14 : Cinétique de blanchissement de β -carotène en présence des extraits aqueux et organiques de *Bryonia dioica*, de BHT (contrôle positif) et de DMSO (contrôle négatif). Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions.

L'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes, ces derniers vont oxyder le β carotène, ce qui cause la disparition de sa couleur orange, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. La présence d'un antioxydant permet de neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation du β -carotène (Manallah, 2012).

D'après les résultats, on observe que dans le milieu réactionnel en présence des extraits et le DMSO, les pourcentages d'inhibitions diminuent rapidement au cours du temps, alors qu'en présence du BHT la diminution est ralentie.

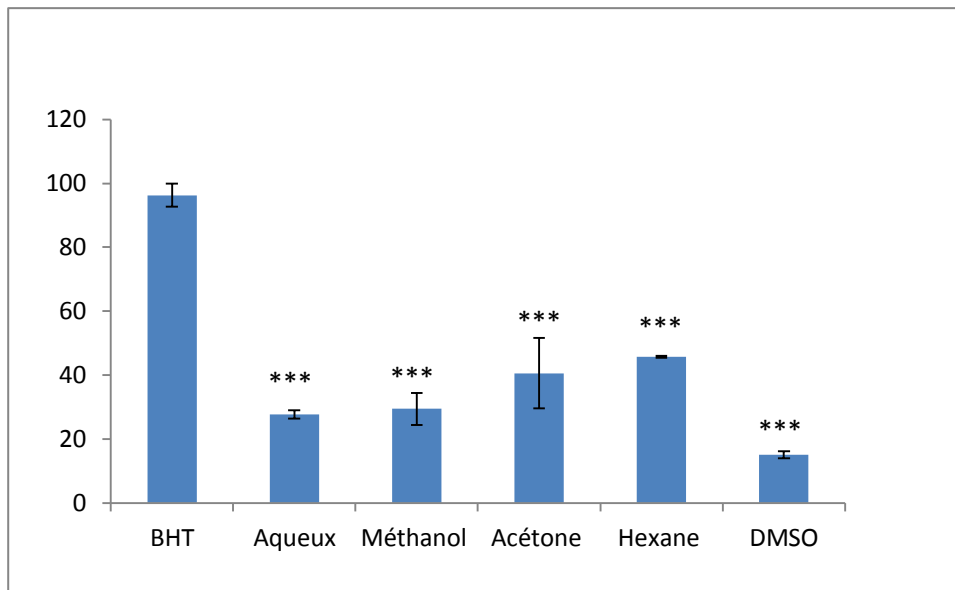


Figure 16 : Pourcentages d'inhibition des extraits aqueux et organiques de *B. dioica* et des témoins (BHT et DMSO) par le test de β -carotène/acide linoléique après 24h. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions \pm écart type. Comparaison par rapport au BHT, ($p < 0.05$)*, ($p < 0.01$)**, ($p < 0.001$)***.

Parmi les extraits, l'activité antioxydante (inhibition%) la plus élevée est présentée par l'extrait hexanique (45.74%), suivi de l'extrait acétonique et méthanolique qui ont donné des pourcentages d'inhibition de 40.54% et 29.40%, respectivement ; tandis que l'extrait aqueux a montré l'activité la plus faible par rapport aux autres extraits (27.63%). Le BHT utilisé comme contrôle positif a montré la plus forte activité antioxydante (96,23%). On conclue donc que les extraits des tubercules de *bryonia dioica* inhibent la peroxydation lipidique de manière faible en comparaison au BHT. En outre, Une corrélation a été bien observée entre l'activité antioxydante des extraits dans ce test et leur polarité, de sorte que l'activité diminue avec l'augmentation de la polarité.

Selon Haddadi (2005), plusieurs facteurs semblent moduler les résultats d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique à savoir la nature liposoluble ou hydrosoluble des antioxydants mais aussi leur concentration. Des études récentes ont mis en évidence que la polarité et l'hydrophobicité des agents antioxydants sont deux facteurs importants dans les systèmes de biomembranes, c'est la raison par laquelle beaucoup de chercheurs de l'activité antioxydante choisissent le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplés à celle du β - carotène comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria et al., 2006 ; Gachkar et al., 2007 ; Terpinc et al., 2009).

Dans une autre étude réalisée par Rafael et *al.*, (2011) qui ont travaillé sur l'extrait méthanolique des fruits de *Bryonia dioica*, l'IC₅₀ dans le test de blanchissement de β-carotène était égale à 0.58 mg/ml.

5. Activité antibactérienne des extraits de *B. dioica*

L'activité antibactérienne des extraits des tubercules de *B. dioica* a été évaluée sur trois souches bactériennes en utilisant le test des puits de diffusion. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8 et la figure 16.

Tableau 8 : Zones d'inhibition de l'extrait acétonique de *B. dioica* et de la gentamicine vis-à-vis des souches bactériennes.

Concentration	Extrait d'acétone		Gentamicine
	100 mg/ml	200 mg/ml	10 µg/disque
<i>Staphylococcus aureus</i>	12±1.41	15±0.00	35.33 ± 0.57
<i>Escherichia coli</i>	NA	NA	25.00 ± 1.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA	NA	20.50 ± 4.94

NA: non actif.

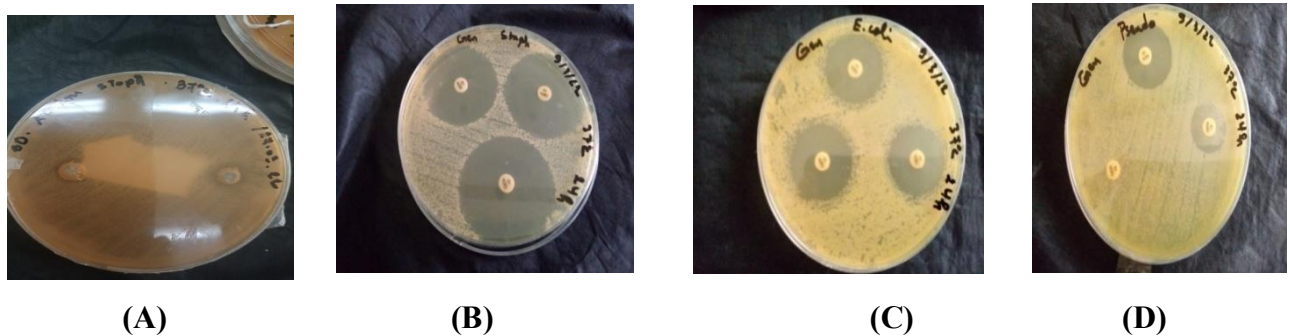


Figure 17 : Activité antibactérienne de l'extrait acétonique de *B. dioica* (100 mg/ml) vis-à-vis de *S. aureus* (A) et de la gentamicine contre *S. aureus* (B), *E. coli* (C) et *P. aeruginosa* (D).

D'après les résultats obtenus, les extraits aqueux, méthanolique et hexanique de la plante n'ont montré aucun effet antibactérien sur les souches testées. En revanche, l'extrait acétonique a montré une activité vis-à-vis de la bactérie *Staphylococcus aureus*, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des puits d'environ 15mm à une

concentration de 200 mg/ml et d'environ 12 mm à une concentration de 100 mg/ml, on peut dire alors que cette souche est sensible à l'extrait d'acétone de la plante. Cette activité de l'extrait est sans doute reliée à sa composition en molécules à effet antibactérien, c'était aussi l'extrait le plus riche en polyphénols, flavonoïdes et en tannins.

L'antibiotique utilisé comme contrôle positif pour l'évaluation de l'activité antibactérienne est la gentamicine (GM) (10µg/disque). Il appartient à la famille des aminosides (ou aminoglycosides) qui ont un large spectre d'activité contre les bactéries Gram positif et Gram négatif (Nauciel et Vildé, 2005). La gentamicine semble avoir une action inhibitrice sur la croissance de toutes les souches testées. Dans notre étude, l'activité maximale de cet antibiotique a été obtenue contre *S. aureus* avec une zone d'inhibition égale à 35.33 mm. D'autre part, le DMSO utilisé comme contrôle négatif n'a eu aucun effet inhibiteur sur toutes les souches étudiées.

Dans une étude réalisée par khamees et *al.* (2017) sur l'activité antibactérienne de l'extrait alcoolique brut préparé des feuilles de *B. dioica*, cet extrait était très actif contre *E.coli* avec une zone d'inhibition de 60.33 mm à une concentration de 200 mg/ml et 22.39 mm à une concentration de 100 mg/ml. Par contre, le même extrait n'a montré aucune efficacité contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes et représentent une source inépuisable de substances bioactives. Dans notre travail, on a étudié quelques propriétés phytochimiques, l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne des extraits préparés à partir des tubercules de *bryonia dioica*.

Les résultats montrent que le rendement d'extraction augmente avec la polarité des solvants utilisés. Une investigation phytochimique a confirmé la présence des flavonoïdes, des tannins, des quinones et des terpénoïdes dans les extraits de la plante. 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.

Dans l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de *bryonia dioica*, les résultats ont montré que le pouvoir réducteur le plus élevé dans la méthode de FRAP a été observé dans l'extrait acétonique et qu'il y a une proportionnalité avec le contenu des extraits en flavonoïdes et le pouvoir réducteur de ces extraits ; par contre pour le test de blanchissement de β -carotène, les résultats ont montré que l'extrait d'hexane avait le pourcentage d'inhibition le plus important.

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits de la plante par la méthode des puits de diffusion a révélé que seulement l'extrait d'acétone, qui a été trouvé le plus riche en métabolites secondaires, a présenté une activité contre la bactérie *Staphylococcus aureus*.

D'autres études plus avancées sont nécessaires pour la caractérisation des composés chimiques actifs de la plante étudiée par des méthodes de séparation plus performantes et qui sont responsables de ses activités antioxydantes et antibactériennes de la plante.

**Références
bibliographiques**

- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valéro, J. R. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: recent trends. *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 227-249.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4), 42.
- Annaházi, A., Mracskó, É., Süle, Z., Karg, E., Penke, B., Bari, F., & Farkas, E. (2007). Pre-treatment and post-treatment with α -tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *European journal of pharmacology*, 571(2-3), 120-128.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(5), 997-1027.
- Atkin, M. A., Gasper, A., Ullegaddi, R., & Powers, H. J. (2005). Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: response to antioxidants in vitro and to antioxidant supplementation. *Clinical Chemistry*, 51(11), 2138-2144.
- 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., Gattbonton-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.**
- Battelli, M. G., Bortolotti, M., Polito, L., & Bolognesi, A. (2018). The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864(8), 2557-2565.**
- Benarba, B., Elmallah, A., & Pandiella, A. (2019). Bryonia dioica aqueous extract induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Molecular medicine reports*, 20(1), 73-80.**
- Benhar M. (2018). Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radic Biol Med*. 127: 160-164.**
- Bensakhria, A. (2018). Le stress oxydatif. *Toxicologie générale*, 70-86.**
- Benslama, A., Bounerfeg, S., Aouachria, S., Guenez, T., Arrar, L., kennouf, S et Baghiani, A. (2020). Xanthine Oxidase Inhibition., In vitro Antioxidant Activity and Antibacterial Effects of Thymus pallidus Coss. *Current Nutrition & Food Science*, 16(4), 607-615.**

- Bentahar, A., Bouaziz, A., Djidel, S., & Khenouf, S. (2020). Phenolic content and antioxidant activity of ethanolic extracts from *Citrus sinensis* L. and *Citrus reticulata* L. fruits. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(5-s), 308-313.
- Bock, B., 2011. *Bryonia dioica*. Tela Botanica, Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France. BDNFF v4.02.
- 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. (2018). *Activités biologiques de plantes médicinales: anchusa azurea mill. et globularia alypum L* (Doctoral dissertation).
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.
- Călinoiu, L. F., & Vodnar, D. C. (2018). Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. *Nutrients*, 10(11), 1615.
- 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.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A., Linssen, P.H., 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci. Food. Agr.* 77, 140–146.
- Das, A. K., Islam, M. N., Faruk, M. O., Ashaduzzaman, M., & Dungani, R. (2020). Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*, 135, 58-70.
- Dias, M. C., Pinto, D. C., & Silva, A. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377.

Djenidi, H. (2020). Activité antioxydante et antiradicalaire des aliments d'origine végétale consommés dans les régions de Biskra et Setif (Doctoral dissertation).

Fabre, G., Bayach, I., Berka, K., Paloncýová, M., Starok, M., Rossi, C., ... & Trouillas, P. (2015). Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. *Chemical Communications*, 51(36), 7713-7716.

Favier, A. (2003). The oxidative stress : concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches. *Actualité Chimique*, (11-12), 108-115.

Favier, A. (2006, November). Oxidative stress in human diseases. In *Annales Pharmaceutiques Françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396).

Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araujo, M. E. M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108(1), 31-37.

Fleurentin J., Cabalion P., Mazars G., Dos Santos J. & Younos C., 1991 : Ethnopharmacologie: Sources, Méthodes et Objectifs 201.

Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & function*, 10(2), 514-528.

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.

Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food chemistry*, 102(3), 898-904.

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.

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.

González, J. A., García-Barriuso, M., & Amich, F. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2), 343-355.

González-Tejero, M. R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C. P., Ramiro-Gutiérrez, J. M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., ... & ElJohrig, S. (2008). Medicinal plants in the Mediterranean

area: synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 341-357.

Haddadi H., 2005 : Détermination de l'activité antioxydante de quelques fruits 76

Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M., & GOETZ, P. (2013). *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen* (pp. 160-08). Springer Paris.

Jasim, T. M., Eldalawy, R., &Alnaqqash, Z. A. E. (2020). Pharmacological Activities and Chemical Constituents and of Bryonia Dioica L.: A Review. *Indian Journal of Public Health*, 11(02), 2185.

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.

Khribch, J., Nassik, S., EL Houadfi, M., Zrira, S., & Oukessou, M. (2018). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6(3), 300-307.

Krauze-Baranowska, M., & Cisowski, W. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of flavone C-glycosides in some species of the Cucurbitaceae family. *Journal of Chromatography A*, 675(1-2), 240-243.

Kumar, S., Madaan, R., Gahlot, K., & Sharma, A. (2008). The genus Bryonia: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 2(4), 392.

Lesieur Pascale., (2014). Antibiotiques : modes d'action, mécanismes de la résistance, Site of Formation permanent ; développement & santé, Paris.

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.

Losada-Barreiro, S., & Bravo-Diaz, C. (2017). Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *European journal of medicinal chemistry*, 133, 379-402.

Manallah A ; 2012 : Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L, 62.

Maruthamuthu Vijayalakshmi & Kandasamy Ruckmani., 2016 : Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh J Pharmacol*.

Mates, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153(1-3): 83-104.

Matsuda, H., Nakashima, S., Abdel-Halim, O. B., Morikawa, T., & Yoshikawa, M. (2010). Cucurbitane-type triterpenes with anti-proliferative effects on U937 cells from an egyptian natural medicine, *Bryonia cretica*: structures of new triterpene glycosides, bryoniaosides A and B. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 58(5), 747-751.

Md Shahadat Hossan , Hassan Jindal , Sarah Maisha , Chandramathi Samudi Raju , Shamala Devi Sekaran , Veeranoot Nissapatorn , Fatima Kaharudin , Lim Su Yi , Teng Jin Khoo , Mohammed Rahmatullah , et Christophe Wiart., (2018). Effets antibactériens de 18 plantes médicinales utilisées par la tribu Khyang au Bangladesh *Journal of Pharmaceutical Biology*. (56) : 201-208.

Migdal, C., & Serres, M. (2011). Reactive oxygen species and oxidative stress. *Medecine Sciences: M/S*, 27(4), 405-412.

Mukherjee, P. K., Singha, S., Kar, A., Chanda, J., Banerjee, S., Dasgupta, B., ... & Sharma, N. (2022). Therapeutic importance of Cucurbitaceae: A medicinally important family. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114599.

Muñoz, S. M., Salvarelli, S. M., Saiz, M. I., & Conde, F. P. (1992). A toxic protein from *Bryonia dioica* Jacq. fruits: the brydiofin. *Biochemical and biophysical research communications*, 183(3), 1011-1018.

Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.

Nauciel, C., & Vildé, J. L. (2005). Bactériologie médicale. Elsevier Masson.

Ndhkala, A. R., Ncube, B., Okem, A., Mulaudzi, R. B., & Van Staden, J. (2013). Toxicology of some important medicinal plants in southern Africa. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 609–621.

Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35), 27986-28006.

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922.

Patterson J.C., Joughin B.A., van de Kooij B., Lim D.C., Lauffenburger D.A. & Yaffe M.B. (2019). ROS and oxidative stress are elevated in mitosis during asynchronous cell cycle progression and are exacerbated by mitotic arrest. *Cell Syst.* 8 (2):163-167.

Piotrowski, W. J., & Marczak, J. (2000). Cellular sources of oxidants in the lung. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 13(4), 369-385.

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).

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

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

Raja, P. B., Rahim, A. A., Qureshi, A. K., & Awang, K. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using tannins. *Materials Science-Poland*, 32(3), 408-413.

Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., ... & Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica chimica acta*, 436, 332-347.

- Sharma, K., Kumar, V., Kaur, J., Tanwar, B., Goyal, A., Sharma, R., ... & Kumar, A. (2021). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: A critical review. *Toxin Reviews*, 40(4), 432-444.
- Singh, P. S., & Vidyasagar, G. M. (2018). ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL STUDIES OF SIX THERAPEUTIC PLANTS WITH TOTAL PHENOLIC CONTENTS. *European Journal of Biomedical*, 5(3), 511-514.
- 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.
- Sobiesiak, M. (2017). Chemical structure of phenols and its consequence for sorption processes. In *Phenolic compounds-natural sources, importance and applications*. IntechOpen.
- Su, X., Duan, J., Jiang, Y., Shi, J., & Kakuda, Y. (2006). Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 348-353.
- Surai, P. F., Kochish, I. I., Fisinin, V. I., & Kidd, M. T. (2019). Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. *Antioxidants*, 8(7), 235.
- Terpinc, P., Bežjak, M., & Abramovič, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food chemistry*, 115(2), 740-744.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1(1), 98-106.
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., & Montezano, A. C. (2020). Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 36(5), 659-670.
- 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.
- Volz, S. M. (2008). Evolution of dioecy in the Cucurbitaceae genus *Bryonia*: a phylogenetic, phylogeographic, and SCAR-marker approach (Doctoral dissertation, München, Univ., Diss., 2009).

Wu, T., Damu, A. G., Su, C., & Kuo, P. (2005). Chemical constituents and pharmacology of Aristolochia species. *Studies in natural products chemistry*, 32, 855.

Yano, Y., Satomi, M., & Oikawa, H. (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International journal of food microbiology*, 111(1), 6-11.

Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International journal of molecular medicine*, 44(1), 3-15.

Zillich, O. V., Schweiggert- Weisz, U., Eisner, P., & Kersch, M. (2015). Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International journal of cosmetic science*, 37(5), 455-464.

19-22 MAY, 2022

Phenolic Profile, Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts From Algerian *Bryonia dioica*

Khadija DEHIMI^{1,2}, Habiba DJENIDI², Imane BELOUADAH¹, Nour El Houda AMROUNE¹, Aicha AZZOUG¹, Zohra ADJILA¹, Saliha DAHAMNA²

¹Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of M'sila, Algeria.

²Laboratory of Phytotherapy Applied to Chronic Diseases, University of Setif 1, Algeria.

khadija.dehimi@univ-msila.dz

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 and antibacterial activity by means Agar well diffusion method. The extraction of active substances is carried out by four solvents with different polarities (hexane, acetone, methanol and distilled water), using the technique of maceration. Among studied extracts, acetone fraction was the most rich in polyphenols (45.72 µg GAE/mg extract), in flavonoids (14.36 µg QE/mg E) and in tannins (71.41 µg TAE/mg E). In the FRAP assay, the same extract (acetone) showed the best capacity to reduce iron with a maximal absorbance value of $A = 0.67$ at a concentration of 6 mg/ml. The highest percentage inhibition in the β -carotene / linoleic acid test was obtained by hexane extract (45.74 % after 24h of incubation). Furthermore, acetone fraction was the only active extract against *S. aureus* with an inhibition zone of 15 mm at a concentration of 200 mg/ml.

Key words: *Bryonia dioica*, polyphenols, ferric reducing power, β -carotene bleaching, antibacterial activity.

REFERENCES

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

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certificate is proudly presented to

Khadija DEHIMI

We would like to thank you for your valuable contributions
as a participant with the online oral presentation entitled

Phenolic Profile, Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts From Algerian Bryonia dioica.

at the 5. International Conference on Life and Engineering Sciences
with the sponsorship of Anand International College of Engineering,
Antalya-TURKEY, May 19-22, 2022.



Assoc. Prof. Dr. Gökhan ÖMEROĞLU
Cochair of ICOLES 2022

22.05.2022