

---

Soumis le : 07 Novembre 2012  
 Forme révisée acceptée le : 20 Mars 2013  
 Email de l'auteur correspondant :  
 biomeriem@hotmail.com

---

## Pouvoir antioxydant des extraits de *Myrtus communis* L. obtenus *in situ* et *in vitro*

Meriem TOUAIBIA<sup>a</sup>, Fatma Zohra CHAOUCH<sup>b</sup>

*a* Département de biologie. Université SAAD DAHLEB, Algérie.

*b* Département d'Agronomie. Université SAAD DAHLEB, Algérie.

---

### Résumé

Nous présentons dans cet article, les résultats obtenus à partir d'analyses, effectuées sur des extraits méthanoliques de l'espèce *Myrtus communis* L, récoltée *in situ*, ainsi que des extraits méthanoliques préparés à partir des calcs de cette même plante, multipliée *in vitro*, pour lesquels plusieurs dosages spectrophotométriques ont été effectués. L'extrait de la plante obtenu *in situ* s'est avéré plus riche en polyphénols par rapport à son homologue obtenu à partir des calcs. Il a exprimé, également, un bon pouvoir de capture des radicaux libres avec une EC50=0,69mg/ml, et un très bon pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique estimé à 87,45%, qui s'est avéré largement supérieur à celui de l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif (50,57%). Cependant, les extraits méthanoliques préparés à partir des calcs ont exprimés le meilleur pouvoir chélateur des ions Fe<sup>2+</sup> estimé à 73,13%.

Mots clés : *Myrtus communis* L.; *in situ*, *in vitro*; extraits méthanoliques; polyphénols.

### Abstract

We present in this paper, the results obtained from analyzes, performed on methanolic extracts of *Myrtus communis* L, collected *in situ*, and methanolic extracts prepared from a callus tissue culture of this plant, propagated *in vitro*. Several spectrophotometric assays were performed on these extracts. The plant extract obtained *in situ* was richer in polyphenols than the extract prepared from calli. It expressed also good free radical scavenging activity with EC50=0,69mg/ml, and a very good inhibitory potency of linoleic acid peroxidation estimated at 87,45%, which is much higher than the ascorbic acid used as positive control (50,57%). However, methanolic extracts prepared from calli expressed the best chelating Fe<sup>2+</sup> ions estimated at 73,13%.

Keywords: *Myrtus communis* L.; *in situ*; *in vitro*; methanolic extracts; polyphenols.

### 1. Introduction

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit en industrie agroalimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés bioactifs on retrouve les métabolites secondaires.

Ces substances font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in situ* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique [1].

En se basant sur la méthodologie mise en place pour l'obtention, l'analyse et l'optimisation des composés polyphénoliques dans des cultures de *Myrtus communis* L, espèce méditerranéenne, inscrite à la *Pharmacopée européenne* et couramment utilisée pour ses propriétés

digestives et anti-spasmodiques [2,3], anti-septiques et antimicrobiennes [4], astringentes et tonifiantes [5], ainsi que ses propriétés anti-parasitaires [6]. Le myrte est très connu aussi pour ses propriétés anti-génotoxiques [7, 8], en plus de son pouvoir hemagglutinant [9], anti-hyperglycémiant [10], hypo-cholesterolemiant [11,12] et anti-inflammatoire [13].

L'intégration du métabolisme phénolique dans le programme de développement d'une plante, pose la question d'un rôle éventuel de ces substances. Plusieurs travaux ont montré qu'ils seraient associés à de nombreux processus physiologiques, ils interviennent également dans les qualités organoleptiques des fruits [14].

Les composés phénoliques sont impliqués aussi dans la résistance à l'attaque des insectes et des micro-organismes [15]. En effet, de nombreux travaux ont démontré que les propriétés anti-oxydantes de ces composés sont supérieures

à celles des anti-oxydants de synthèse utilisés en industrie pharmaceutique.

Dans cet article, nous ferons le point sur la composition en polyphénols des extraits de l'espèce *Myrtus Communis* L. de la région de Zaccar, ainsi que ses éventuels effets anti-oxydants. Des résultats antérieurs sur l'analyse de la plante entière du myrte [16] ont montré que les rameaux feuillés sont très riches en polyphénols.

Il nous paraissait alors intéressant de développer des cultures cellulaires de cette plante dans la perspective d'obtenir in vitro, de meilleurs rendements et/ou une production sélective de polyphénols à propriétés bioactives.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériel végétal in situ

Les rameaux feuillés ont été récoltés sur des pieds adultes de *M communis* L., dans la région de Zaccar (tableau 1). Les spécimens ont été identifiés au niveau du laboratoire de botanique de l'Institut National d'Agronomie-El Harrach (Alger). Le séchage est effectué dans une étuve réglée à 75°C durant 24h. La masse végétale séchée est ensuite réduite en poudre fine et bien conservée jusqu'à son utilisation.

Tableau 1

Coordonnées géographiques du site de récolte

Localisation	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Zaccar Wilaya de Ain Defla	522 m	36°18' Nord	2°16' Est	Semi-aride à hiver tempéré (Atlas tellien)

### 2.2. Mise en place et suivi des cultures in vitro

Des cals ont été initiés à partir de limbes foliaires issus de vitro-semis, sur un milieu MS [17], supplémenté avec une combinaison hormonale équilibrée (Kin/ANA ou Kin/2,4-D: 0,5/0,5 mg/l) et additionné de saccharose (30g/l), d'agar-agar (8g/l) et des vitamines de Morel et Wetmore [18]. Le pH est ajusté à 5,8. On a noté la formation des cals primaires après 6 semaines, les cultures ont été entretenues par repiquages successifs tous les 21 jours. Les cals sont récupérés après 7 semaines, séchés à l'étuve (à 25°C jusqu'à stabilité du poids sec) ensuite broyés en poudre fine et bien conservés pour la suite des travaux.

### 2.3. Extraction

Elle est réalisée par épuisements de la poudre végétale à chaud par Soxhlet dans le méthanol [19]. L'extrait brut obtenu est soumis à une double filtration, puis concentré à

l'évaporateur rotatif et enfin séché à température ambiante. Le résidu sec récupéré est pesé pour déterminer son rendement et conservé au frais, dans un flacon sombre bien fermé, pour effectuer ultérieurement les tests phytochimiques.

### 2.4. Dosage

Les extraits obtenus ont été soumis à une série de dosages spectrophotométriques afin de quantifier leur teneur en polyphénols totaux [20], en flavonoïdes totaux [21], en flavonols [22], en tanins [23] et en anthocyanes [24]

### 2.5. Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits

L'effet anti-oxydant des extraits a été évalué par le test DPPH [25]. Le pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique est déterminé par la méthode thiocyanate [26]. Cependant, le pouvoir chélateur des ions  $Fe^{2+}$  est mesuré selon le protocole rapporté par Decker et Welch [27].

### 2.6. Analyse statistique

Tous les essais ont été répétés six fois et réalisés dans les mêmes conditions. De même, des corrélations ont été établies entre les différentes variables et les comparaisons statistiques ont été faites au moyen du test de *Student*. Les différences ont été considérées significatives à  $p < 0,05$ .

## 3. Résultats et discussions

### 3.1. Caractérisation des extraits obtenus

Les extraits méthanoliques (MeOH) issus de la plante obtenue in situ, présentent une couleur marron très foncé, un aspect légèrement gras avec un rendement de 41,30%, alors que les extraits des cals ont plutôt un aspect collant de couleur vert foncée, associé à un rendement de l'ordre de 35,56% (tableau 2).

Le rendement de l'extrait méthanolique de *M communis* L. poussant spontanément en Grèce est compris entre 43,4 et 59,5%, il atteint son maximum lorsque la plante est récoltée en pleine floraison [16].

Tableau 2

Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.

	Nature de l'extrait	Rendement de l'extrait (%)	Aspect et couleur de l'extrait
<i>In vitro</i>	Extrait MeOH	35,56	Collant pâteux Vert foncé
	Extrait	41,30	Collant pâteux

MeOH

Marron foncé

Dans ce même contexte, le rendement moyen du myrte Iranien est égal à 28,66%, signalant qu'il est très riche en flavonoïdes [28]. Il paraît ainsi que la localisation géographique, la durée de stockage, le degré de maturité, la génétique, le climat, ainsi que la période de récolte semblent avoir un impact direct sur le rendement.

### 3.2. Résultats des analyses spectrophotométriques

L'analyse quantitative des extraits par des dosages spectrophotométriques, avaient pour objectif la détermination de la teneur de quelques composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes, flavonols, tanins, anthocyanes). Pour chaque dosage, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'étalon. Les teneurs moyennes des flavonoïdes, des anthocyanes et des flavonols dans l'extrait méthanolique de la plante obtenue in situ sont nettement plus élevés que ceux détectés dans l'extrait préparé à partir des cals.

Par ailleurs, si nous comparons la teneur en polyphénols de l'extrait de *M communis* L. obtenues in situ, à celle de son homologue préparés à partir des cals, on peut dire que les cals ne sont pas très riches en composés phénoliques.

Il conviendrait probablement de jouer sur certaines conditions de culture (l'intensité et/ou la durée d'éclairage) afin d'optimiser la synthèse de ces métabolites. Dans ce même contexte, une série de travaux portant sur l'optimisation des conditions de culture de colonies tissulaires de *Fagopyrum esculentum* ont permis d'obtenir des quantités intéressantes en polyphénols, mais qui suggèrent l'exposition des cals à un éclairage permanent 24h/24h [29]. Baborun [30] a rapporté que l'introduction

de l'acide shikimique au milieu de culture augmente le rendement en polyphénols. Ces résultats rejoignent aussi les observations faites par Shah et Mehta [31], qui ont amélioré la production des colonies tissulaires de *Crotalaria* en introduisant différents acides phénoliques dans le milieu de culture.

Selon les travaux dirigés par Gardeli [16], la teneur des extraits méthanoliques en polyphénols chez *M communis* L. varie entre 352 et 373 µg eq ac gal/mg ES et atteint un maximum durant la période de pleine floraison. Cependant, Ammar et al. [32] rapportent que sa teneur avoisine 227µg eq ac gal/mg ES.

Nous avons constaté une faible présence de tanins dans les extraits méthanoliques des cals avec une concentration moyenne de 22,78 µg eq ac tan/mg ES. Quant aux extraits préparés à partir de la plante obtenue in situ, elle est nettement plus élevée, nous pensons que l'état juvénile de ces tissus en est la cause principale. Les travaux de Gasmi [33] rapportent que la concentration des tanins dans l'extrait méthanolique de *M communis* L, poussant spontanément en Tunisie, avoisine 104 µg eq Ac tan/mg ES. Alors que les résultats fournis par Ammar [32] ont confirmé la présence d'un taux de tanins qui avoisine 282 µg eq ac tan/mg ES chez cette même espèce.

Il est important de signaler que les anthocyanes, sur le plan théorique augmentent avec la maturation des fruits. Par ailleurs, d'après Bakker et al. [34], les différentes réactions provoquant la diminution des anthocyanes sont les réactions de condensation avec d'autres molécules inférieures comme l'acide puracique, ainsi que la combinaison des anthocyanes avec les tanins pour donner des polymères ayant des propriétés et des couleurs différentes de celles des anthocyanes.

Tableau 3

Teneurs en composés phénoliques des extraits

Paramètre	Etalon sélectionné	Longueur d'onde (nm)	Teneur (µg eq/mg ES)*	
			In situ	In vitro
Polyphénols totaux	Acide gallique (Ac Gal)	760	487,00±0,24	189,00±0,05
Flavonoïdes totaux	Quercetine (Quer)	415	125,25±0,11	64,10±0,66
Flavonols	Rutine (Rut)	440	378,00±0,64	111,00±0,32
Tanins	Acide tannique (Ac tan)	760	135,02±0,33	22,78±0,43
Anthocyanes	Cyanidine (Cyan)	520	19,80±0,08	05,09±0,42

\*microgramme équivalent/milligramme d'extrait sec

### 3.3. Résultats du test DPPH

Une réduction de l'absorbance du DPPH en solution est observée avec l'augmentation de la dose des extraits et les anti-oxydants standards (figure 1 et figure 2). Les extraits ont manifesté un pouvoir anti-oxydant en piégeant les molécules du radical libre DPPH mais cette capacité est d'une puissance accrue avec l'acide ascorbique, alors que

l'extrait des cals a présenté une capacité faible en comparaison avec les standards. Les valeurs EC50 déterminées en mg/ml expriment la concentration efficace de l'extrait anti-oxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de molécules de DPPH en dissolution dans du méthanol (Tableau 4). Un autre paramètre exprimant la puissance anti-radicalaire à été calculé nommé "ARP" qui est égale à 1/EC50.

Selon les résultats enregistrés, l'extrait de la plante obtenue in situ est doté d'un bon pouvoir anti-oxydant ( $EC_{50}=0,69\text{mg/ml}$ ), meilleur que celui exprimé par l' $\alpha$  tocophérol, mais reste d'une efficacité moindre par rapport à celle exprimée par l'acide ascorbique et la quercétine respectivement.

Pour les contrôles positifs, la réaction de réduction du DPPH en solution est rapide et instantanée, le changement de couleur, exprimant le passage du radical DPPH de la forme oxydée (DPPH•) à la forme réduite stable (DPPH-H), se fait dans un temps extrêmement court où l'état d'équilibre est atteint immédiatement et la réduction est presque complète. En comparant les résultats obtenus avec les extraits de la plante et les standards, on classe l'activité et la puissance anti-oxydante suivant l'ordre :

Acide ascorbique > quercétine > extrait de la plante (in situ) >  $\alpha$  tocophérol > extrait des cals (in vitro)

Tableau 4

Effet anti-oxydant des extraits de *M communis* L.

Substance chimique testée	% d'inhibition	$EC_{50}$ (mg/ml)	PAR
<i>M communis</i> L (in situ)	77.52	0.69	1.45
<i>M communis</i> L (in vitro)	47.90	1.01	0.99
Quercétine (Cp)	85.56	0.43	2.33
Alpha tocophérol (Cp)	51.27	0.99	1.01
Acide ascorbique (Cp)	86.62	0.39	2.56

L'activité anti-oxydante des extraits dépend essentiellement du taux des polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante [35]. La  $EC_{50}$  de *M communis* L., rapportée par les travaux de Gardeli et al. [16], est comprise entre 0,0095 et 0,017mg/ml, ces mêmes auteurs ont également démontré que les extraits de *M communis* L. récoltés en période estivale sont les plus anti-oxydants.

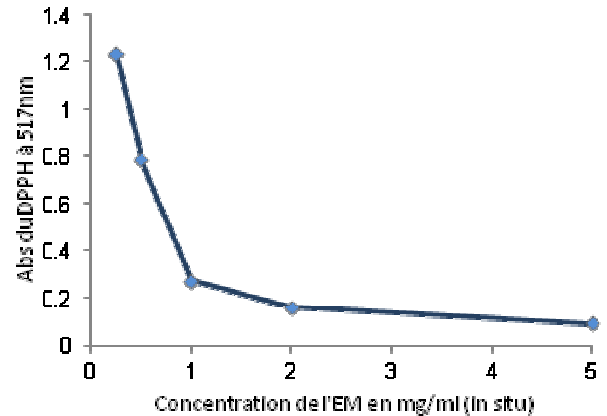
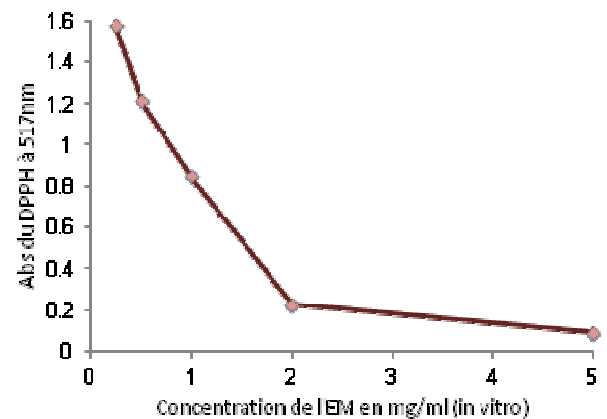
### 3.3. Résultats de l'activité anti-péroxydasique de l'acide linoléique

Afin d'évaluer l'action des extraits sur l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, nous avons effectué un test sur une période d'une semaine (168h). L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif (Cp). Le pourcentage d'inhibition de la lipo-péroxydation est calculé, après 120 heures (tableau 5). Les extraits de *M communis* L. obtenus in situ et à partir des cals ont respectivement montré, un pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique estimé à 87,45% et 66,81% qui se sont avérés largement supérieurs à ceux du contrôle positif.

Tableau 5

Pourcentage d'inhibition (PI) de la peroxydation de l'acide linoléique.

PI%	Acide ascorbique (Cp)	Extraits de l'espèce <i>M communis</i> L.	
		In situ	In vitro
	50,57	87,45	66,81

Figure 1: Réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'extrait de *M communis* L (in situ)Figure 2: Réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'extrait de *M communis* L (in vitro)

Des travaux similaires sur l'extrait méthanolique de *Syzygium cumini* ont rapporté qu'elle présente un pouvoir inhibiteur de la lipo-péroxydation avec une  $EC_{50}$  égale à  $222\mu\text{g/ml}$  [36]. Quant à l'aspect biochimique des cals, Thorpe et Gasper [37] ont montré une augmentation de l'activité peroxydasique au cours de la formation de cals issus de différents explants, et ont constaté que la perte de l'activité caulogène d'un cal correspond à une perte graduelle de l'activité peroxydasique. Cet accroissement de l'activité peroxydasique préalable à l'initiation des bourgeons végétatifs pourrait être l'indication d'une réduction du niveau auxinique endogène [38].

### 3.4. Résultats du pouvoir chélateur du fer

Le pourcentage de chélation des ions  $Fe^{2+}$  exercé par l'acide ascorbique est égal à 43,22%, il est dix fois plus important, que celui de la quercétine n'ayant exprimé que 4,98% (figure 3).

Quant aux extraits testés, nous pouvons déduire que l'extrait de *M communis* L. obtenu in vitro, présente un pouvoir chélateur de 73,13%, largement supérieur à son

homologue in situ ainsi qu'à celui des standards (Cp).

D'après les travaux de Gardeli [16], l'extrait méthanolique de *M communis* L. exerce un important effet chélateur en pourcentage de réduction des ions  $Fe^{2+}$  estimé entre  $63,4 \pm 0,4$  et  $70,2 \pm 2,3$  mmol  $Fe^{2+}/l$ , il a aussi confirmé qu'il varie significativement selon les saisons.

Les variations de l'activité réductrice des radicaux libres, sont, en général, directement liées aux taux des composés phénoliques présents dans la plante récoltée [39].

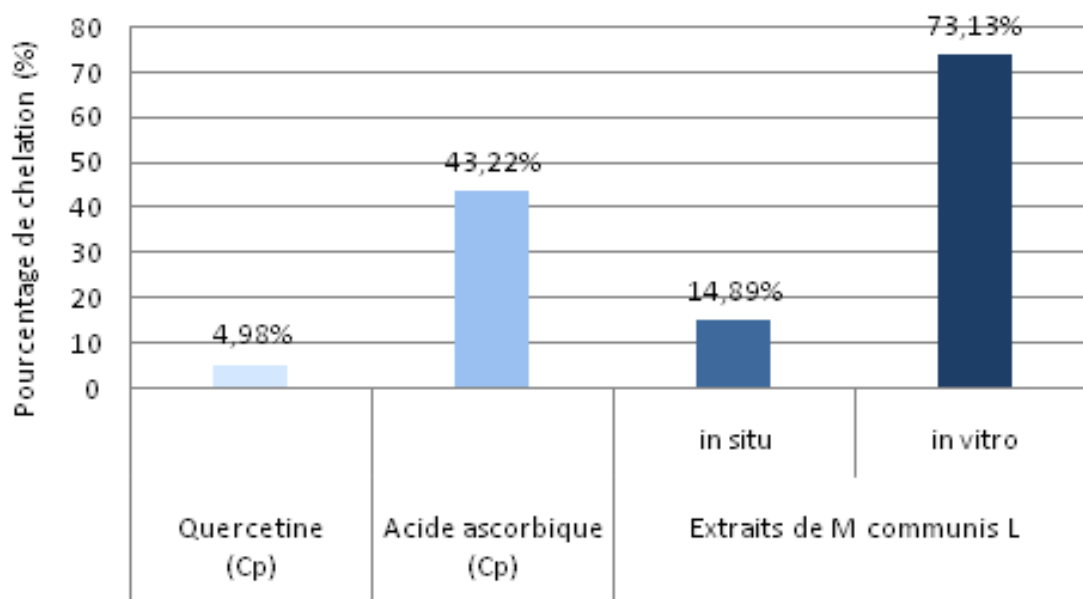


Figure 3: Pouvoir chélateur du fer exercé par les extraits de *M communis* L. obtenus in situ et in vitro

## 4. Conclusion

Les extraits de *M communis* L. obtenus in situ et in vitro sont riches en polyphénols, et peuvent être considérés comme une source naturelle très importante de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer les radicaux libres responsables de nombreuses pathologies.

Ces extraits ont montré un excellent pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique et chélateur des ions  $Fe^{2+}$ . Ces résultats sont très prometteurs, surtout qu'ils ont dépassé largement le seuil marqué par la quercétine, l' $\alpha$  tocophérol ou l'acide ascorbique.

De même, il serait intéressant d'envisager l'utilisation de ces ressources naturelles pour remplacer les anti-oxydants de synthèses largement utilisés en industrie agro-alimentaire et pharmaceutique.

## Références bibliographiques

- [1] T. Bahorun. Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentiel. Edition Mauritius. (1997).133.
- [2] A. Beloued. Les plantes médicinales d'Algérie. Edition OPU. Alger. (2001). 277.
- [3] S. Oulmouhoub. Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier: Cas des subéraies du parc national d'El kala Algérie. Thèse de magister en écologie. Institut agronomique méditerranéen de Montpellier. (2005). 137.
- [4] S.B. Bharate. Antiprotozoal and antimicrobial activities of O-alkylated and formylated acylphloroglucinols. Bioorg.Med. Chemistry. 15(2007):87-96.
- [5] J.L. Sallé. Les huiles essentielles. Edition Frison Roche. Paris. (1991). 167.

- [6] M. Azadbakht, H. Ziai, F. Adbollahi et B. Shabankhani. Effect of essential oils of *Artemisia aucheri* Boiss., *Zataria multiflora* Boiss. and *Myrtus communis* L. on *Trichomonas vaginalis*. Med. plant. 8(2003):35-40.
- [7] N. Hayder, S. Kilani, A. Abdelwahed, A. Mahmoud, K. Meftahi, J. Benchibani, K. Ghedira et L. Chekir-Ghediral. Antimutagenic activities of aqueous extracts and essential oil isolated from *Myrtus communis* L. Pharmazie. 58(2003):523-524.
- [8] A. Romani, R. Coinu, S. Carta, P. Pinelli, C. Galardi, et F. Vincieri. Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. Free radianse research. 38(2004):97-103.
- [9] A.G. Gonzalez, V. Darias et O. Munguia. Contribution to the chemotherapeutic study of the seed of *Myrtus communis* L. Fitoterapia. 52(1981):171-174.
- [10] S. Onal, S. Timur, B. Okutuku et F. Zihnioglu. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. Prep.biochem.biotech. 35(2005): 29-36.
- [11] A.D. Sepici, I. Gurbuz, C. Cevik, E. Yesilada. Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits". Ethnopharmacology. 93(2004):311-318.
- [12] A. Rosa, M. Deiana, V. Casu, G. Corona, G. Appendino, F. Bianchi, M. Ballero et M.A. Desi. Antioxidant activity of oligomeric acylphloroglucinols from *Myrtus communis* L. Free.rad.res. 37(2003):1013-1019.
- [13] M.K. Al hindawi, I.H.S. Al Deen, M.H.A. Nabi et M.A. Ismail. Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats". Ethnopharmacology. 26(1989):163-168.
- [14] G.E. Dubois, G.A. Grosby, et P. Saffron. Non nutritive sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. Science. 195(1977):397-399.
- [15] S.B. Rees et J.B. Harborne. The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. Phytochemistry. 24(1985):2225-2231.
- [16] C. Gardeli, P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris et M. Komalitis. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food chemistry. 107(2008):1120-1130.
- [17] T. Murashige et F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol plant. 15(1962):473-497.
- [18] G. Morel et R.H. Wetmore. Fern callus tissue culture. American Journal of Botany. 38(1951):141-143.
- [19] B.J. William. The original of the Soxhlet extractor. Chemical education. 84(2007):1913-1915.
- [20] K. Slinkard et V.L. Singleton. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. American journal of viticulture. 28(1977):49-55.
- [21] Y.K. Park, M.H. Koo, M. Ikegaki et J.L. Contado. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera propolis* from various regions of Brazil. Brazilian archives of biology and technology. 40(1997):97-106.
- [22] A.I. Yermakov, V.V. Arasimov et N.P. Yarosh. Methods of biochemical analysis of plants. Agropromizdat. Leningrad. (1987). In: G. Miliauskasa, P.R. Venskutonis, et T.A. Van Beek. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food chemistry. 85(2004):231-237.
- [23] M. A. Joslyn. A serie of monography. Food. Sci. techn. Second Edition Board. (1970). In: A. Bessas, L. Benmoussa et M. Kerarma. Dosage biochimique des polyphenols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes. Sidi belabbas. (2008). 137.
- [24] A. Jur. (1967). In: A. Bessas, L. Benmoussa et M. Kerarma. Dosage biochimique des polyphenols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire d'ingénieur en biologie. Université Djillali Liabes.Sidi belabbas. (2008). 137.
- [25] M. Cuendet., K. Hostettmann et O. Potterat. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. Helvetica. Chimica. act. 80(1997):1144-1152.
- [26] G.K. Jayaprakasha, R.P. Singh et K.K. Sakariah. Antioxidant activity of *Vitis vinefera* extracts on peroxidation modes in vitro. Food chemistry. 73(2001):285-290.
- [27] E.A. Decker et B. Welch. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Agricultural and food chemistry. 38(1990):674-677.
- [28] N. Hayder, I. Skandrani, S. Kilani, I. Bouhleb, A. Abdelwahed, R. Ben Ammar, A. Mahmoud, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira. Antimutagenic activity of *Myrtus communis* using the *Salmonella* microsome assay. South african journal of botany. 74(2008):121-125
- [29] Y. Moumou, F. Trotin, J. Vasseur, G. Vermeersch, R. Guyon, J. Dubois et M. Pinkas. Procyanidin production by *Fagopyrum esculentum* callus tissue cultures. Plant physiol. 15(1992):516-519.
- [30] T. Bajorun. Les polyphénols de *Crataegus monogyna* Jacq. in vivo et in vitro : Analyses et activités antioxydantes. Thèse de doctorat. Université de Lille. France. (1995).150.
- [31] R.R. Shah et A.R. Mehta. Influence of phenolic acids on growth and production of phenolic compounds in *Crotalaria* callus cultures. Bangladesh journal of botany. 7(1978):51-57.
- [32] H. Ammar, S. Lopez et J.S. Gonzalez. Assessment of the digestibility of some mediterranean shrubs by in vitro techniques. Animal feed science and technology. 119(2005): 323-331.
- [33] B.A.Guasmí, C. Kayouli, A. Buldgen, A. Boukary, H. Ammar et S. Lopez. Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia. Animal feed science and technology. 127(2006):1-12.
- [34] J. Bakker, P. Bridle, T. Honda, H. Kuwano, N. Saito, N. Terahara et C.F. Timberlake. Identification of anthocyanin occurring in some red wines. Phytochemistry. 4(1997):145-148.
- [35] S. Burda et W. Oleszek. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Food chemistry. 49(2001):2774-2779.
- [36] A. Banerjee, N. Dasgupta et B. De. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. Food chemistry. 90(2005):727-733
- [37] T.A. Thorpe et T.H. Gasper. Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus in vitro. Physiology. 14(1978):522-526.
- [38] T. Gaspar, C. Kevers et R. Debergh. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology. Edition Bonga. (1987). 316.
- [39] V. Yeşilyurt, B. Halfon, M. Öwtürk et G. Topçu. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. Food chemistry. 108(2008):31-39.