

EVALUATION DE L'EFFET ANTI-OXYDANT DES EXTRAITS DE *Myrtus communis* L. OBTENUS *IN SITU* ET *IN VITRO*

Meriem Touaibia¹⁾, Fatma
Zohra Chaouch²⁾

1) Département de
Biologie. Université Saad
Dahleb, Algérie.

Email:
biomeriem@hotmail.com

2) Département
d'agronomie. Université
Saad Dahleb, Algérie.

email:
chaouchfz@hotmail.com

RESUME

Notre étude est fondée sur l'évaluation du pouvoir anti-oxydant des extraits méthanoliques de l'espèce *Myrtus communis* L. récoltée *in situ* ainsi que des cals multipliés *in vitro* de cette même plante, pour lesquels une série de test phytochimiques et 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 cals. Il a éventuellement exprimé un bon pouvoir de capture des radicaux libres avec une $EC_{50}=0,69$ mg/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 exprimé par l'acide ascorbique (50,57%). Néanmoins les extraits méthanoliques préparés à partir des cals ont exprimé le meilleur pouvoir chélateur des ions Fe^{2+} estimé à 73,13%.

Mots clés : *Myrtus communis* L., *in situ*, *in vitro*, extraits méthanoliques, anti-oxydant.

1. INTRODUCTION

Les molécules bioactives issues des végétaux ont des applications multiples dans l'industrie agroalimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Elles 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].

Myrtus communis L. (Myrtaceae), est une espèce méditerranéenne inscrite à la *Pharmacopée européenne* et couramment utilisée pour ses propriétés digestives et anti-spasmodiques [2, 3], anti-septiques et anti-microbiennes [4], astringentes et tonifiantes [5], ainsi que ses propriétés anti-parasitaires [6]. Cette plante est très connue aussi pour ses effets anti-génotoxiques [7], hemagglutinant du sang [8], anti-hyperglycémiant [9], hypo-cholesterolemiant [10] et anti-inflammatoire [11].

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 [12]. Ils contrôlent également les qualités organoleptiques des fruits [13] et semblent être impliqués dans la résistance à l'attaque des insectes et des micro-organismes [14].

Dans ce papier, nous ferons le point sur la composition en polyphénols des extraits de cette espèce ainsi que leurs éventuels effets anti-oxydants. Des résultats antérieurs sur l'analyse de la plante entière du myrte [15] 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 antioxydantes.

2. MATERIELS ET METHODES

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 2.1). Les spécimens ont été identifiés au laboratoire de botanique de l'Institut National d'Agronomie-El Harrach.

le séchage est effectué dans une étuve réglée à 75°C durant 48h. La masse végétale séchée est ensuite réduite en poudre fine et bien conservée jusqu'à son utilisation.

Tableau 2.1: Coordonnées géographiques du site de récolte de *M communis* L.

| Région | 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 [16], contenant une combinaison hormonale équilibrée (Kinetine/ANA ou Kinetine/2,4-D: 0,5/0,5 mg/l) et additionné de saccharose (30g/l), de gélose (8g/l) et des vitamines de Morel. On a noté la formation des cals primaires après 6 semaines, les cultures ont été entretenues par repiquages successifs chaque 21 jours. Les cals sont récupérés après 12 semaines, séchés 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, l'extrait brut obtenu est soumis à une double filtration, puis concentré à l'évaporateur rotatif [17]. Le résidu sec récupéré est pesé pour déterminer son rendement et conservé au frais, dans un flacon

sombre bien fermé, pour effectuer 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 [18], en flavonoïdes totaux [19], en flavonols [20], en tanins [21] et en anthocyanes [22].

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

Le pouvoir antioxydant des extraits a été évalué par le test DPPH [23]. Le pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique est déterminé par la méthode thiocyanate [24]. Cependant, le pouvoir chélateur des ions Fe^{2+} est mesuré selon le protocole rapporté par Decker et Welch [25].

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 sont considérées significatives à $p < 0,05$.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Caractérisation physico-chimiques des extraits obtenus

Les extraits méthanoliques (MeOH) issus de la plante obtenue *in situ*, présentent une couleur marron très foncé avec un rendement de 41,30%, alors que les extraits des cals ont plutôt une couleur vert foncé associée à un rendement de l'ordre de 35,56% (tableau 3.1).

Tableau 3.1: Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.

| | Nature de l'extrait | Rendement de l'extrait (%) | Aspect de l'extrait | Couleur de l'extrait |
|-----------------|---------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|
| <i>In vitro</i> | Extrait MeOH | 35,56 | Collant pâteux | Vert foncé |
| <i>In situ</i> | Extrait MeOH | 41,30 | Collant pâteux | Marron foncé |

Selon Gardeli et al [15], le rendement de l'extrait méthanolique de l'espèce *M communis* L. poussant spontanément en Grèce va de 43,4 à 59,5 % et atteint son maximum lorsque la plante est récoltée en pleine floraison. Dans ce même contexte, Hayder et al [26], ont rapporté que le rendement moyen du myrte *Iranien* est égal à 28,66%, signalant qu'il est très riche en flavonoïdes. Il paraît ainsi que la localisation géographique, le climat, ainsi que la période de

récolte semblent avoir un impact direct sur le rendement.

3.2. Résultats des analyses spectrophotométriques

Les extraits ont été soumis à une série de dosages spectrophotométriques, afin de déterminer la teneur de quelques composés phénoliques (tableau 3.2). Les teneurs moyennes des flavonoïdes, des anthocyanes et des flavonols dans l'extrait méthanolique de la plante obtenue *in situ* se sont montrés nettement plus

élevés que leurs homologues obtenus à partir des calcs. Par ailleurs, on constate que la teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique de *M communis* L. obtenues en *in situ* est remarquablement plus importante par rapport à celle des calcs. 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.

Tableau 3.2:

Dosage des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique.

| Paramètre | Etalon sélectionné | Longueur d'onde (nm) | Teneur (µeq/mg ES)* | |
|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| | | | <i>In situ</i> | <i>In vitro</i> |
| Polyphénols totaux | Acide gallique | 760 | 487,00 | 189,00 |
| Flavonoïdes totaux | Quercetine | 415 | 125,25 | 64,10 |
| Flavonols | Rutine | 440 | 378,00 | 111,00 |
| Tanins | Acide tannique | 760 | 135,02 | 22,78 |
| Anthocyanes | Cyanidine | 520 | 19,80 | 05,09 |

*microgramme équivalent/milligramme d'extrait sec

Dans ce même contexte, une série de travaux portant sur l'optimisation des conditions de culture 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 [27]. Bahorun et al [28] ont 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 [29], qui ont amélioré la production de *Crotalaria* en introduisant différents acides phénoliques dans le milieu de culture.

Selon Gardeli et al [15], la teneur de l'extrait méthanolique en polyphénols chez *M communis* varie entre 352 et 373 µg eq/mg ES, et atteint son maximum en période de pleine floraison. Cependant, Ammar et al [30] rapportent que sa teneur égale 227 µg eq/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/mg ES. Quant aux extraits préparés à partir de la plante obtenue *in situ*, elle est nettement plus élevée

(135,02 µg eq/mg ES), nous pensons que l'état juvénile des cals en est la cause principale.

Les travaux de Gasmi Boubaker et al [31] rapportent que la concentration des tanins dans l'extrait méthanolique de *M communis L.*, avoisine 104 µg eq/mg ES. Alors que Ammar et al [30] ont confirmé sa présence à un taux égale à 282 µg eq/mg ES chez cette même espèce.

Le taux des anthocyanes s'est avéré nettement plus important dans l'extrait méthanolique *in situ* (19,8 µg eq/mg ES). 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 [32], la diminution du taux des anthocyanes peut être générée suite à des réactions de condensation avec d'autres molécules inférieures comme l'acide puracique, ainsi que par la combinaison des anthocyanes avec les tanins pour donner des polymères ayant des propriétés et des couleurs différentes de celles des anthocyanes, empêchant ainsi leur révélation quantitative.

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 antioxydants standards (figure 3.1 et figure 3.2). 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 contrôles positifs. Les valeurs EC_{50} 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 mises en dissolution dans le méthanol (Tableau 3.3). Un autre paramètre exprimant la puissance anti-radicalaire a été calculé nommé "ARP" qui est égale à $1/EC_{50}$.

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

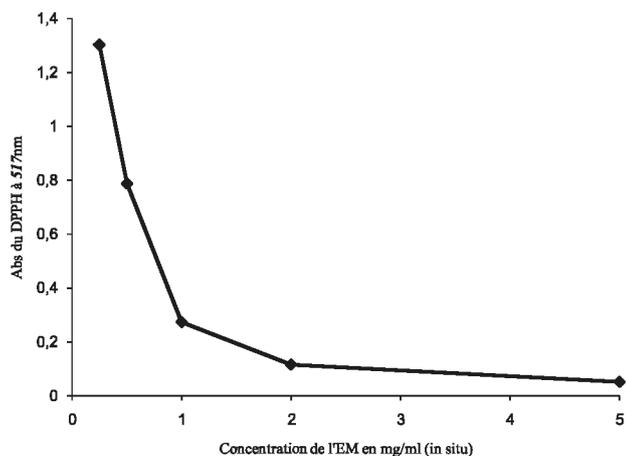


Figure 3.1: Réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'extrait de *M communis L* (*in situ*)

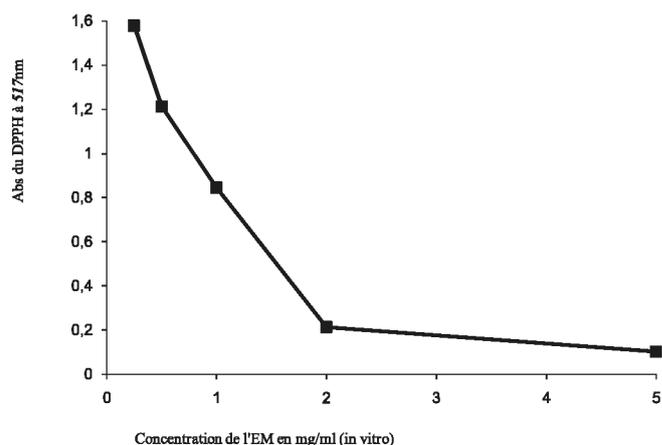


Figure 3.2: Réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'extrait de *M communis L* (*in vitro*)

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 peut classer l'activité et la puissance anti-

oxydante selon l'ordre suivant:

Acide ascorbique > quercétine > extrait de la plante (*in situ*) > α -tocophérol > extrait des cals (*in vitro*)

Tableau 3.3: Effet anti-oxydant des extraits de *M communis* L.

| Substance chimique testée | % d'inhibition | EC ₅₀ (mg/ml) | PAR |
|---|----------------|--------------------------|------|
| <i>M communis</i> L (<i>in situ</i>) | 77,52 | 0,69 | 1,45 |
| <i>M communis</i> L (<i>in vitro</i>) | 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 de polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante [33]. La EC₅₀ de *M communis* L., rapportée par les travaux de Gardeli et al [15] est incluse entre 0,17 et 0,95mg/ml, ils ont aussi démontré que les extraits de *M communis* L. récoltés en

période estivale étaient les plus anti-oxydants.

3.3. Résultats de l'activité anti-peroxydasique 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). Les extraits obtenus *in situ* et à partir des cals ont respectivement montré, des pourcentage d'inhibition de la lipo-peroxydation qui se sont avérés largement supérieurs au contrôle positif (tableau 3.4).

Tableau 3.4 : Pourcentages d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique.

| | Acide ascorbique (Cp) | Extraits de <i>M communis</i> L. | |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------|
| | | <i>In situ</i> | <i>In vitro</i> |
| Pourcentage d'inhibition (%) | 50,57 | 87,45 | 66,81 |

Les travaux de Banerjee et al [34], sur l'extrait méthanolique de *Syzygium cumini* (appartenant à la famille des myrtaceae) ont rapporté qu'elle présente un pouvoir inhibiteur de la lipo-peroxydation estimé à 0,71% avec une EC₅₀=222µg/ml.

Quant à l'aspect biochimique des cals, Thorpe et Gasper [35] 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 indiquer une réduction du niveau auxinique endogène [36].

3.4. Résultats du pouvoir chélateur du fer

Le pourcentage de chélation des ions Fe^{2+} exercé par l'acide ascorbique est égale à 43,22%, il

paraît être dix fois plus important, que celui de la quercétine n'ayant exprimé que 4,98% (fig 3.3). 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).

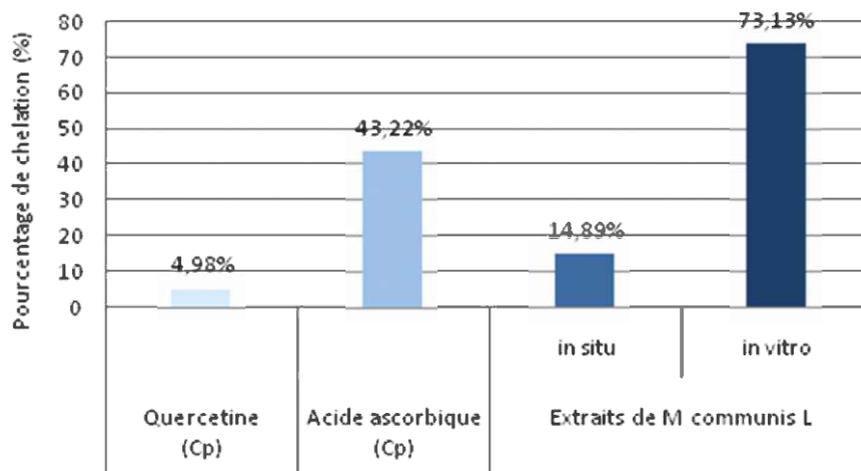


Figure 3.3: Pouvoir chélateur du fer exercé par les extraits de *M. communis* L. obtenus *in situ* et *in vitro*

4. CONCLUSION

Les extraits méthanoliques de *Myrtus communis* L. obtenus *in situ* et *in vitro* sont potentiellement riches en composés polyphénoliques et peuvent être considérés comme une source naturelle très importante de

constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer les radicaux libres responsables de nombreuses pathologies. Les résultats obtenus sont très prometteurs, surtout qu'ils ont dépassé largement le seuil marqué par la quercétine, l' α 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Bahorun, T. "Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle". Edition Mauritius. (1997). 133p

[2] Beloued, A. "Les plantes médicinales d'Algérie". Edition OPU. Alger. (2001). 277p

[3] Oulmouhoub, S. "Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier: Cas des subéraies du parc national d'El kala Algérie". Thèse de magister en ecologie. Institut agronomique

méditerranéen de Montpellier. (2005). 137p.

[4] Bharate, S.B. et al. "Antiprotozoal and antimicrobial activities of O-alkylated and formylated acylphloroglucinols". Bioorg. Med. Chemistry. Vol 15. (2007). pp:87-96

[5] Sallé, J.L. "Les huiles essentielles". Edition Frison Roche. Paris. (1991). 167p

[6] Azadbakht, M., Ziai, H., Adbollahi, F. et Shabankhani, B. "Effect of essential oils of *Artemisia aucheri* Boiss., *Zataria multiflora* Boiss. and *Myrtus communis* L. on

Trichomonas vaginalis". J. Med. plant. Vol 8. (2003). pp:35-40.

[7] Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C. et Vincieri, F. "Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L.". Free radiance research. Vol 38. (2004). pp:97-103.

[8] Gonzalez, A.G., Darias, V. et Munguia, O. "Contribution to the chemotherapeutic study of the seed of *Myrtus communis* L.". Fitoterapia. Vol 52. (1981). pp:171-174

- [9] Onal, S., Timur, S., Okutuku, B., Zihnioglu, F. "Inhibition of α -glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs". *Prep.biochem.biotech.* Vol 35. (2005). pp: 29-36.
- [10] Sepici, A.D., Gurbuz, I., Cevik, C., Yesilada, E. "Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits". *J. Ethnopharmacology.* Vol 93. (2004). pp:311-318.
- [11] Al hindawi, M.K., Al Deen, I.H.S., Nabi, M.H., Ismail, M.A. "Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats". *J. Ethnopharmacol.* Vol 26. (1989). pp:163-168.
- [12] Alibert, G., Ranjeva, R. et Boudet, M.A. "Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques". *J. Physiologie végétale.* Vol 15. (1977). pp: 279-301.
- [13] Dubois, G.E., Grosby, G.A. et Saffron, P. "Non nutritive sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones". *J. Science.* Vol 195. (1977). pp:397-399.
- [14] Rees, S.B. et Harborne, J.B. "The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant". *J. Phytochemistry.* Vol 24. (1985). pp:2225-2231.
- [15] Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T. et Komaltis, M. "Essential oil composition of *Pistacia lentiscus L.* et *Myrtus communis L.*: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts". *Food chemistry.* Vol 107. (2008). pp:1120-1130.
- [16] Murashige, T., Skoog, F. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiology of plants.* Vol 15. (1962). pp:473-497.
- [17] William, B. J. "The original of the soxhlet extractor". *J. chemical education.* Vol 84. (2007). pp:1913-1915
- [18] Slinkard, K. et Singleton, V.L. "Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods". *American journal of viticulture.* Vol 28. (1977). pp:49-55.
- [19] Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M. et Contado, J.L. "Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil". *Brazilian archives of biology and technology.* Vol 40. (1997). pp:97-106.
- [20] Yermakov, A.I., Arasimov, V.V. et Yarosh, N.P. "Methods of biochemical analysis of plants". *Agropromizdat. Leningrad.* (1987). In: Miliuskasa, G., Venskutonis, P.R. et Van Beek, T.A. "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts". *Food chemistry.* Vol 85. (2004). pp:231-237.
- [21] Joslyn, M. A. "A serie of monography". *Food. Sci. techn.* Second Edition Board. (1970). In: Bessas, A., Benmoussa, L. et Kerarma, M. "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). 137p
- [22] Jur. (1967). In: Bessas, A., Benmoussa, L. et Kerarma, M. "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). 137p
- [23] Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O. "Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*". *Helvetica. Chimica. act.* Vol 80. (1997). pp:1144-1152.
- [24] Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. "Antioxidant activity of *Vitis vinefera* extracts on peroxidation modes in vitro". *Food chemistry.* Vol 73. (2001). pp:285-290.
- [25] Decker, E.A., Welch, B. "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food". *J. Agricultural and food chemistry.* Vol 38. (1990). pp:674-677.
- [26] Hayder, N. et al. "Antimutagenic activity of *Myrtus communis L.* using the *Salmonella* microsome assay". *South african journal of botany.* Vol 74. (2008). pp: 121-125
- [27] Moumou, Y., Trotin, F., Vasseur, J., Vermeersch, G., Guyon, R., Dubois, J. et Pinkas, M. "Procyanidin production by *Fagopyrum esculentum* callus tissue cultures". *J. Plant physiol.* Vol 15. (1992). pp:516-519.
- [28] Bahorun, T. "Les polyphénols de *Crataegus monogyna* Jacq. in vivo et in vitro : Analyses et activités antioxydantes". *Thèse de doctorat.* Université de Lille. France. (1995). 150p
- [29] Shah, R.R. et Mehta, A.R. "Influence of phenolic acids on growth and production of phenolic compounds in *Crotalaria* callus cultures". *Bangladesh journal of botany.* Vol 7. (1978). pp:51-57.

- [30] Ammar, H., Lopez, S. et Gonzalez, J.S. "Assessment of the digestibility of some mediterranean shrubs by in vitro techniques". *Animal feed science and technology*. Vol 119. (2005).pp: 323-331
- [31] Guasmi Boubaker, A., Kayouli, C., Buldgen, A., Boukary, A., Ammar, H. et Lopez, S. "Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia". *Animal feed science and technology*. Vol 127. (2006).pp:1-12.
- [32] Bakker, J., Bridle, P., Honda, T., Kuwano, H., Saito, N., Terahara, N., Timberlake, C.F., "Identification of anthocyanin occurring in some red wines". *Phytochemistry*. Vol 4. (1997).pp:145-148
- [33] Burda, S. et Oleszek, W. "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids". *J.Food chemistry*. Vol 49.(2001). pp:2774-2779.
- [34] Banerjee, A., Dasgupta, N., De, B. "In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit". *Food chemistry*. Vol 90. (2005). pp:727-733
- [35] Thorpe, T.A. et Gasper, T.H. "Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus in vitro". *J.Physiol*.Vol 14. (1978). pp.522-526.
- [36] Gaspar, T, Kevers, C. et Debergh, R. "Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects". In: "Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology". Edition Bonga. (1987). 316p.