

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Pharmacotoxicologie



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème

*Etude phytochimique et activité anti-hémolytique
d'une plante locale (Ecballium elaterium).*

Présenté par :

M^{elle} AMRANE Sylia & M^{elle} AOUARTILANE Samira.

Soutenu le : **25 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme Khettal B.

Professeur

Présidente

Mr Tacherfiout M.

MAA

Encadreur

Mme Bakdi H.

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018.



Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, de nous avoir éclairé le chemin de la réussite et nous avoir donné la force, le courage et la persistance à fin de réaliser ce travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promoteur M^r M. TACHERFIOUT, qui nous a encadré et dirigé avec ses conseils ainsi que la confiance qu'il nous a accordée.

Nos profonds remerciements s'adressent également à notre co-promotrice M^{me} T. MEZAHAM, pour son aide, ses encouragements et ses précieux conseils tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous adressons nos profonds remerciements à M^{me} B. KHETTAL d'avoir accepté de présider le jury.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à M^{me} H. BAKDI d'avoir acceptée d'examiner ce travail.

Nous tenons aussi à remercier les membres du laboratoire de la maternité de Targa Ouzemour de nous avoir fourni les échantillons de sang.

Nous remercions aussi toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin pour achever ce travail, ainsi que l'ensemble de nos enseignants qui nous ont suivis tout au long de notre cursus.

Amrane et Aouartilane

Dédicaces

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu
réaliser ce travail que je dédie*

*A la mémoire de mon cher père et mon frère Zinedine, Aucune dédicace ne
saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours
eu pour vous.*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère
qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice
et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

A mes très chères sœurs : Katia et Hanane

A mes chers frères : Aymen, Toufik, Idir et sa femme Siham.

A mon petit poussin Karim

A toute ma famille, proche ou loin

*A tout mes Amis : Meriem, Kayssa, Thiziri, Hanane, Chahra, Lili, Hassiba, Asma
, Dalila, Lynda, Sonia, Assia, Souhila, Hayat, Zahra, Nassima, Younes, Hemo
Hani et James.*

A toute la promo de pharmacotoxicologie.

SYLIA

Dédicace

A mes parents

Pour vos mains qui ont tant travaillées

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé

Pour vos yeux qui furent parfois mouillée

Pour vous qui m'avez tant aimé

A mes frères : Boujamâa, Fafim, Massinissa

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université : Massika , Chérifa , Lamia , Wardia , Zahra .

A tous qui me connaisse de près ou de loin

Samira

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction.....1

Chapitre I :

Partie bibliographique

I-1 Généralité sur le sang 2

I-1-1 Définition du sang 2

I-1-2 Les éléments figurés du sang périphériques : 2

I-1-2-1 Erythrocytes ou hématies ou globules rouges : 2

I-1-2-2 Les globules blancs ou leucocytes : 2

I-1-2-3 Les plaquettes ou thrombocytes 3

I-1-2-4 Le plasma 3

I-1-3 Composition de la membrane érythrocytaire 3

I-1-4 l'hémolyse **Erreur ! Signet non défini.**

I-1-4-1 Hémolyse physiologique..... **Erreur ! Signet non défini.**

I-1-4-2 Hémolyse pathologique 5

I-1-5 Les anti-hémolytiques 6

I-1-6 Phytothérapie anti-hémolytique 6

I-2 Généralités sur les métabolites secondaires..... **Erreur ! Signet non défini.**

I-2-1 Les composés phénoliques 8

I-2-3 Classification des polyphénols 8

I-2-3-1 Les acides phénoliques 10

I-2-3-2 Les flavonoïdes 10

I-2-3-3 Les Tanins 10

I-2-4 Rôle et intérêt des polyphénols	Erreur ! Signet non défini.
I-3 Présentation de la plante étudiée	Erreur ! Signet non défini.
I-3-1 <i>Ecballium elaterium</i>	Erreur ! Signet non défini.
I-3-2 La classification systématique :	Erreur ! Signet non défini.
I-3-3 Description botanique.....	Erreur ! Signet non défini.
I-3-4 Composition phytochimique	Erreur ! Signet non défini.
I-3-5 Utilisation dans la médecine traditionnelles	Erreur ! Signet non défini.

Chapitre II :

Matériels et méthodes

II-1 Préparation de la poudre végétale	Erreur ! Signet non défini.4
II- 2 Matériels et réactifs	Erreur ! Signet non défini.4
II-3 Préparation de l'extrait	15
II-4 Dosage des polyphénols	15
II-4-1 Dosage des polyphénols totaux.....	15
II-4-2 Dosage des flavonoïdes.....	16
II-4-3 Dosage des tanins.....	16
II-5- Mise au point des tests d'hémolyse <i>ex vivo</i>	17
II-5-1 Induction d'hémolyse par l'acide salicylique	17
II-5-2 Induction de l'hémolyse par chlorure de sodium (NaCl).....	18
II-5-3 Induction de l'hémolyse par le triton X100	18
II-6 Evaluation de l'effet anti hémolytique des extraits d' <i>ecballium elaterium</i>	19
II-6-1 Effet sur l'hémolyse induite par l'acide salicylique.....	19
II-6-2 Effet sur l'hémolyse induite par chlorure de sodium (NaCl).....	20
II-6-3 Effet sur l'hémolyse induite par le triton X-100	20

Chapitre III :

Résultats et discussion

III-1 Taux d'extraction	22
III-2 Dosage des composés phénolique	Erreur ! Signet non défini. 3
III-2-1 Teneur en polyphénols totaux.....	Erreur ! Signet non défini. 3
III-2-2 Teneur en flavonoïde	24
III-2-3 Teneur en tanins.....	25
III-3 Activité anti-hémolytique des extraits d' <i>Ecballium elaterium</i>	26
III-3-1 Variation des taux d'Hémolyse induite par l'acide salicylique	27
III-3-2 Effet des extraits sur l'hémolyse induite par l'acide salicylique	28
III-3-3 Variation des taux d'Hémolyse induite par le chlorure de sodium (NaCl)	30
III-3-4 Effet des extraits sur l'hémolyse induite par le chlorure de sodium.....	31
III-3-5 Effet de la concentration du triton X-100 sur l'hémolyse	34
III-3-6 Effet des extraits sur l'hémolyse induite par le triton X-100.....	34
Conclusion	36

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

AL⁺³ : Cation d'aluminium ;

ANOVA : Analyse de la variance ;

AS : Acide salicylique ;

BSA : Solution de protéine Albumine de Sérum Bovin ;

DMSO : Diméthyle sulfoxyde ;

ERO : Espèces réactives de l'oxygène ;

FeCl₃ : Chlorite de fer ;

g EAG/ 100 g de MS : Gramme équivalent l'acide gallique par 100 grammes de matière séché ;

g EAT/ 100 g de MS : Gramme équivalent l'acide tannique par 100 grammes de matière séché ;

g EQ/ 100 g de MS : Gramme équivalent la quercitine par 100 grammes de matière séché ;

G6PD : Glucose- 6- phosphate déshydrogénase ;

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène ;

IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50% d'hémolyse ;

MMS : May Grünwald Giemsa ;

PBS : Phosphat buffer salin = Tampon phosphate salin ;

SDS/TEA : Sulfate Dodecyl Sodium / Triéthanolamine.

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Structure de la membrane érythrocytaire.	3
02	Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine.	4
03	Photographie des feuilles et de la poudre <i>d'Ecballium</i> .	14
04	Taux d'extraction par macération dans l'éthanol à 70% des différentes parties d' <i>Ecballium elateruim</i> .	22
05	Teneur en polyphénols totaux des différentes parties d' <i>Ecballium elateruim</i> .	23
06	Teneur en flavonoïdes des différentes parties d' <i>Ecballium elateruim</i> .	25
07	Teneur en tanins des différentes parties d' <i>Ecballium elateruim</i> .	26
08	Courbe représentent l'effet de l'acide salicylique sur l'hémolyse des globules rouges incubées dans le milieu hypotonique.	27
09	Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par l'acide salicylique à différentes concentrations des extrais <i>d'Ecballium</i> .	29
10	Taux d'hémolyse induite par différentes concentrations de NaCl.	31
11	Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par le chlorure de sodium à différentes concentrations des extrais <i>d'Ecballium</i> .	32
12	Courbe représentent l'effet des concentrations du triton X-100 sur les érythrocytes.	34
13	Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par le triton X-100 à différentes concentrations des extrais <i>d'Ecballium</i> .	35

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Exemples des plantes médicinales douées d'activités anti-hémolytiques.	7
II	Les principales classes des composées phénoliques avec leur structure de base.	9
III	L'efficacité des différents extraits d' <i>Ecballium</i> et du standard qui est l'effet de l'acide salicylique sur les érythrocytes incubées dans le milieu isotonique..	30
IV	L'efficacité des différents extraits d' <i>Ecballium</i> et du standard contre l'hémolyse induite par le chlorure de sodium exprimé en IC50.	33

Liste des annexes

N°	Titre
I	Matériels et réactifs utilisés.
II	Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux utilisant l'acide gallique comme standard.
III	Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes utilisant la quercitine comme standard.
IV	Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins utilisant l'acide tannique comme standard.
V	Pourcentage d'inhibition du standard (l'effet de l'acide salicylique sur les érythrocytes incubée dans le milieu isotonique).
VI	Pourcentage d'inhibition de la quercitine sur l'hémolyse induite par le chlorure de sodium.
VII	Pourcentage d'inhibition de l'acide gallique sur l'hémolyse induite par le Triton X-.100.

Introduction

Malgré le développement remarquable des conditions de vie durant ces dernières années, l'anémie demeure un sujet complexe sur la santé publique qui affecte la performance humaine, ce qui nécessite des investigations spécialisées pour déterminer les traitements appropriés (Agrwal *et al.*, 1991).

L'hémolyse pathologique se présente le plus souvent comme une anémie, elle se définit comme l'élimination ou la destruction exagérée par éclatement des globules rouges. Elle peut être héréditaire ou acquise. Ces dernières ont principalement des causes immunologiques, infectieuses et même toxicologique comme l'effet des radicaux libres (Gurpreet *et al.*, 2004).

De nombreuses équipes de recherche se sont concentrées sur l'étude des effets des plantes médicinales pour contrecarrer les effets néfastes des anémies et de l'hémolyse, soit comme un produit fini à la consommation, soit comme une matière première dans le cas de la médecine traditionnelle. Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires qui constituent donc un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique et possédant un large éventail d'activités biologiques.

Ecballium elaterium est une plante appartenant à la famille des cucurbitacées trouvées dans le bassin méditerranéen. D'un point de vue phytochimique, elle est caractérisée par la présence des substances phénoliques, qui sont douées d'activité antioxydante, antibactérienne et anti-inflammatoire (Abbassi *et al.*, 2014).

Le but du présent travail était d'évaluer la composition phytochimique des différentes parties (tige, feuille, racine et fruit) d'*Ecballium elaterium* d'une part, et d'autre part, d'évaluer l'effet des extraits de ses différentes parties dans trois modèles d'hémolyse induite, à savoir : l'hémolyse induite par l'acide salicylique, celle induite par le chlorure de sodium, et enfin celle induite par un détergent synthétique qui est le triton X-100.

Le premier chapitre de ce manuscrit a été consacré à une synthèse bibliographique sur des généralités sur le sang, les composés phénoliques et *Ecballium elaterium*. Le deuxième explique et détaille la méthodologie expérimentale suivie. Enfin, le dernier chapitre rapporte les résultats obtenus accompagné d'un essai de leurs interprétations.

I-1 Généralité sur le sang**I-1-1 Définition du sang**

Le sang est un liquide vital biologique circulant dans les artères et les veines sous l'impulsion du cœur. Un individu normal contient 5 à 7 litres du sang dans son corps. Les valeurs normales du sang sont influencées par un grand nombre de facteurs comme l'âge, le sexe, l'activité physique ou l'alimentation (**Mohandas and Chasis, 1993**). Il est composé des globules rouges, globules blancs et des plaquettes qui baignent dans un liquide appelé plasma. Les cellules en suspension représentent 45% du volume total, ce qui correspond à l'hématocrite. Leur morphologie peut être étudiée sur un frottis coloré au May Grünwald Giemsa (MGG). Le sang irrigue tous les organes et transporte l'oxygène, les nutriments, les hormones et les anticorps pour défendre l'organisme contre les infections (**Dudley et al., 1983**)

I-1-2 Les éléments figurés du sang périphériques :

Les éléments figurés du sang ont des durées de vie limitées ; il existe un équilibre dynamique entre leur production (l'hématopoïèse et la lymphopoïèse) et leur destruction. L'hématopoïèse est la production des précurseurs sanguins (prolifération, différenciation et maturation) et se déroule dans les organes hématopoïétiques (moelle osseuse chez l'adulte, foie et rate chez l'embryon). La lymphopoïèse comprend la production des précurseurs lymphoïdes qui se passe au niveau de la moelle osseuse. Elle se termine par la maturation des lymphocytes dans le thymus pour les lymphocytes T et par la prolifération des cellules dans les organes lymphoïdes secondaires (**Denis, 1830**), Il existe plusieurs types cellulaires :

I-1-2-1 Erythrocytes ou hématies ou globules rouges : Sont des cellules matures de la lignée érythrocytaire et ont la forme d'une lentille biconcave. Son diamètre est de 7µm. La forme particulière du globule rouge lui permet d'avoir une plus grande surface par rapport à son volume que la forme sphérique, ce qui favorise les échanges d'oxygène. La durée de vie moyenne des globules rouges est de 120 jours (**Kozlova et al., 2013**).

I-1-2-2 Les globules blancs ou leucocytes : Correspondent à des cellules du système immunitaire. Elles jouent un rôle essentiel dans la lutte contre les infections et les cancers. Il existe 3 classes des globules blancs : Les granulocytes, les monocytes et les lymphocytes (**Jondal et al., 1972**)

I-1-2-3 Les plaquettes ou thrombocytes : Sont des éléments retrouvés dans la circulation sanguine. Elles sont surtout connues pour leur rôle dans la coagulation du sang, et s'activent en cas de lésion vasculaire afin de stopper une hémorragie, leurs durées de vie est de 8 à 12 jours (**Borochov et al., 1977**).

I-1-2-4 Le plasma : Est la partie liquide du sang, constitué d'eau, de sels minéraux, de protéines et de molécules organiques. Après coagulation, le plasma dépourvu de fibrinogènes constitue le sérum (**Gadri et al., 2000**)

I-1-3 Composition de la membrane érythrocytaire

Les globules rouges sont formés d'une membrane érythrocytaire et de l'hémoglobine. La membrane permet l'intégrité du milieu intérieur qui contient les principales enzymes des métabolismes. Elle comporte des protéines et des lipides intriqués dans une structure complexe. Les lipides avec 65 % de phospholipides, 25 % de cholestérol non estérifié et 10 % de glycolipides. Dans la bicouche phospholipidique baignent de volumineuses molécules protéiques enchâssées plus ou moins profondément dans les deux feuillets lipidiques (**Borochov et al ., 1977**).. Le cytosquelette érythrocytaire est composé de plusieurs protéines qui forment un réseau filamenteux sous la bicouche lipidique. Le réseau est composé de spectrine, d'ankyrine et d'actine. Les protéines de cytosquelette interagissent avec les protéines intégrales et les lipides de la bicouche pour maintenir l'intégrité de la membrane (**Lux, 1983**), il existe trois protéines transmembranaires permettant la stabilité de la forme du globule rouge en se fixant sur les protéines intrinsèques du cytosquelette : ce sont la protéine 3, la glycophorine A et la glycophorine C (**Figure 01**).

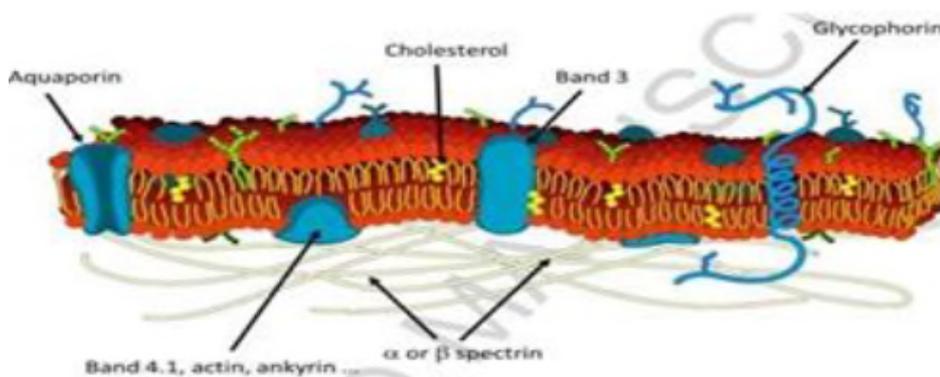


Figure 01 : Structure de la membrane érythrocytaire (**Dodge et al., 1963**).

- **L'hémoglobine**

C'est l'une des protéines humaines qui a fait l'objet de très nombreuses études, c'est le constituant essentiel de l'hématie (33% du poids du GR). Cette molécule est constituée de 4 sous-unités. Chaque sous-unité est composée d'une partie protéique : la globine, et d'une partie non protéique protoporphyriniques qui est l'hème (**Labie and Elion, 2005**).

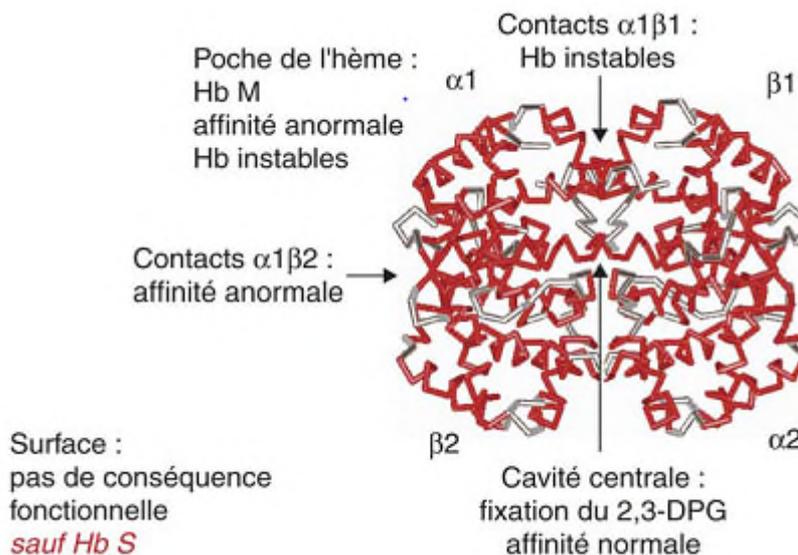


Figure 02 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine
(**Labie et Elion, 2005**)

I-1-4 l'hémolyse

L'hémolyse (hemo: sang, lyse: perturbation) est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges. On (**Lippi et al., 2011**) distingue deux types d'hémolyse : l'hémolyse physiologique et l'hémolyse pathologique.

I-1-4-1 Hémolyse physiologique

Elle est caractérisée par la destruction prématurée par éclatement des globules rouges et la libération de l'hémoglobine dans le plasma. C'est un phénomène qui touche les hématies à la fin de leur vie. La voie de destruction des globules rouges dépend de différents facteurs parmi lesquels : le degré de l'activation du système phagocytaire ou on peut déterminer 2 types : (**Rother et al., 2005**)

➤ **Hémolyse intra-vasculaire**

Elle résulte de l'activation complète du complément à la surface des hématies, ce qui aboutit à la formation du « complexe d'attaque membranaire », d'où une hémolyse intra vasculaire aiguë. Elle est caractérisée par la libération des divers constituants de l'hématie, notamment l'hémoglobine dans la circulation sanguine (**Bernard et al., 1966**).

➤ **Hémolyse extra-vasculaire**

Elle est induite par la fixation de l'anticorps sur l'hématie sans activation (ou activation limitée) du complément. Les immunoglobines G (IgG) fixées sur les antigènes de groupes sanguins présents sur la membrane des hématies, interagissent avec les récepteurs de leur fragment présents sur les cellules du système des phagocytes, entraînant ainsi la phagocytose des hématies et leur lyse (**Rother et al., 2005**)

I-1-4-2 Hémolyse pathologique

C'est la destruction précoce et exagérée des globules rouges sous l'effet d'un processus hémolytique. Elle peut être due à deux mécanismes principaux :

➤ **Les anémies hémolytiques corpusculaires (hémolyse corpusculaire)**

Elles sont essentiellement congénitales et dues à différentes anomalies :

- **Anomalie de la membrane** : comme la maladie de Minkowski chauffard ou microsphérocytose (anomalie de la spectrine).
- **Une anomalie constitutionnelle de l'hémoglobine** comme les anomalies de structure (hémoglobinopathies), anomalies quantitative de la synthèse des chaînes de globine (thalassémies) ou (drépanocytose) (**Morton et al., 1962**)
- **Déficit enzymatique** : il peut être un déficit en PK (pyruvate kinase) de la voie anaérobie, ou déficit en G6PD (glucose 6 phosphate déshydrogénase) de la voie aérobie (**Wajcman, 2006**)

➤ **anémies hémolytiques extra-corpusculaires**

L'hémolyse d'origine extra corpusculaire peut être d'origine immunologique ; allo immune caractérisée par la présence des agglutinines irrégulières et des anticorps naturels, ou anticorps d'hétéro-immunisation préexistants à toute exposition à des GR hétérologues, auto immunes qui est caractérisé par une hémolyse liée à la présence d'auto-anticorps dirigés

contre les antigènes de la membrane érythrocytaire (**Valent and Lechner, 2008**) ou bien d'origine toxique tels que les toxiques industriels, médicamenteux, animaux, végétaux et physiques (**Streichman and Gescheidt, 1998**).

I-1-5 Les anti-hémolytiques

Le traitement des anémies hémolytiques passe inexorablement par le traitement des causes de cette anémie. Il y a presque autant de traitements qu'il y a de causes. Un certain nombre de médicaments anti-hémolytiques, substances qui présentent la capacité à retarder ou à inhiber la lyse des globules rouges, sont disponibles. L'acide folique, un complément de fer, des suppléments de vitamine B et des corticoïdes (Solupred, Céléstasone, Huppomedrol...). Sous forme des comprimés Lorsque la prise en charge débute et en cas d'anémie particulièrement marquée, des corticoïdes à plus forte dose peuvent être administrés par injection (voie intraveineuse) (**Bachhy et al., 2015**).

I-1-6 Phytothérapie anti-hémolytique

Plusieurs extraits des plantes ont montré des effets anti-hémolytiques. Le tableau I résume quelques plantes à activité anti-hémolytique.

Tableau I : Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti hémolytiques.

Source végétal	partie	Teste utilisé	Effets	Référence
<i>Pandanous odorus</i> pandanus	Feuille	Hémolyse induite par l'ion Ferreux	activité anti - hémolytique 83.25 ± 3.66 % pour 3.125 µg/ml.	(Thephinlap et al., 2013)
<i>Acalypha indica</i> Acalyphes	Feuille	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Activité anti-hémolytique 54% pour 20 mg/ml	(Kadali et al., 2016)
<i>Mentha Longifolia</i> Menthe	Partie aérienne	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Effet anti-hémolytique IC ₅₀ = 951.4 ± 36 µg/ml.	(Magalhães et al., 2009)
<i>Piber betel</i> Bétel	feuille	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Anti -hémolytique 40.6% pour de 5mg/ml	(Chakraborty, and Shah, 2011)
<i>Gymnema sylvestre</i> Gymnéma	Fleur	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	anti -hémolytique IC ₅₀ = 140±29.83µg/ml	(James and Alewo, 2014)
<i>Brun</i>	Grain	Hémolyse induit par un puissant oxydant l'AAPH (2,2'-Azobis 2-amidinopropane dihydrochloride)	Activité anti-hémolytique 91.7% à 4mg/ml	(Yuan et al., 2005)

I-2 Généralités sur les métabolites secondaires

La vie humaine sur terre est liée à l'exploitation des plantes. Ces dernières ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. A côté des métabolites primaires, elles accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisable par l'homme, en particulier dans des domaines

thérapeutiques (**Macheix *et al.*, 2005**). Ces composés sont synthétisés dans des différentes parties de la plante (racines, tige, feuilles), mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles, et cette distribution varie d'une plante à l'autre (**Manach *et al.*, 2004**).

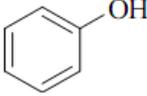
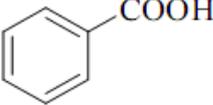
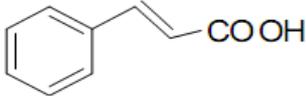
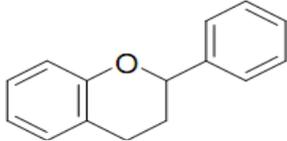
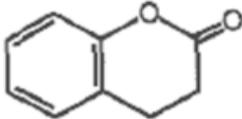
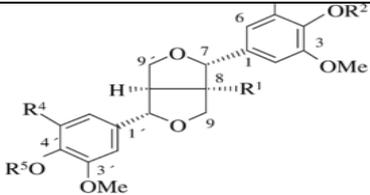
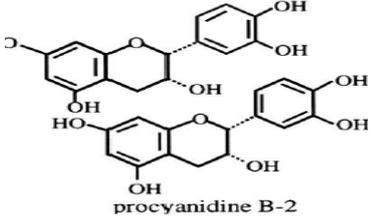
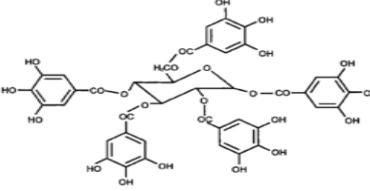
I-2-1 Les composés phénoliques

Sont considérés comme des composés quasi-universels des végétaux. Structurellement, ils se répartissent en plusieurs classes, allant de composés présentant un simple noyau phénolique à des composés polymériques complexes comme les tanins. Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. On les trouve d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes (**Collin and Crouzet, 2011**).

I-2-3 Classification des polyphénols

Les différentes classes des polyphénols sont regroupées dans le tableau II:

Tableau II : Les principales classes des composés phénoliques avec leur structure de base (Bravo, 1998 ; Freitas1995).

Squelette carbonée	Classe	Structure de base
C6	Phénol simple	
C6-C1	Acide hydroxy-benzoïque	
C6-C3	Acide hydroxy-cinnamique	
C6-C3-C6	Flavonoïdes	
C6-C3	Coumarines	
(C6-C2) ₂	Lignanes	
C15	Tanins hydrolysables	
C15	Tanins condensés	

I-2-3-1 Les acides phénoliques

Se sont des dérivées deux sous-groupes distingués : les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide chlorogénique, et les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique (**Tableau II**). Ils sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (**Shahidi et al., 1992**).

I-2-3-2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits quasi universels des végétaux, souvent responsable de certaines coloration de nombreux végétaux. Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (**Tableau II**), le noyau flavane constituée de 15 atomes de carbone qui sont assemblée en 3 cycles : A, B et C (A et B sont des noyaux aromatiques, et C est un hétérocycle oxygéné central). Les flavonoïdes sont souvent rencontrés dans les fruits et les légumes (**Bravo, 1998**). Selon le degré d'oxydation de l'hétérocycle central, les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes : les flavones, les flavonols, les flavonones, les anthocyanes et les isoflavones (**Li and Jiang, 2007**).

I-2-3-3 Les Tanins

Ce sont des métabolites phénoliques avec un poids moléculaire supérieur à 500 Daltons, caractérisés par leur capacité de précipiter la gélatine et d'autres protéines, (**Bennick, 2002**). Selon leur structure biochimique, il est usuel de distinguer deux classes : les tannins hydrolysables et tannins condensés (**Tableau II**).

➤ Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des esters de glucose, c'est à dire un noyau central de glucose sur lequel se fixe, au moyen d'une liaison ester, des acides (acide gallique pour le groupe des gallotanins, et acide ellagique pour le groupe des ellagitanins). Leur hydrolyse, par des acides, des bases ou certaines enzymes, libère le glucose ainsi que les acides gallique ou phénolique liés (**Chung et al., 1998**).

➤ Les tannins condensés

De structure plus complexe, les tannins condensés (proanthocyanidines) sont de loin les tanins les plus largement rencontrés dans les plantes vasculaires, des dicotylédones aux

plantes plus primitives, fougères et gymnospermes. Les proanthocyanidines sont des polymères de flavan3-oles (Catéchine) et de flavan-3,4-dioles (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux (**Chung et al., 1998**).

I-2-4 Rôle et intérêt des polyphénols

Les composés phénoliques jouent d'importants rôles chez les plantes. Ils ont souvent un rôle dans la protection contre les ultraviolets et la défense des plantes contre les microorganismes pathogènes et assurent la fertilité Ils protègent aussi les plantes contre les prédateurs (**Bennick, 2002**). Ils jouent aussi le rôle de pigments de colorations des différents tissus des végétaux (**Bravo, 1998**).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire .Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et ses composés en particulier sont très poussées, en raison de leurs divers propriétés physiologiques, comme les activités anti-inflammatoire, antimicrobienne, hépato-protective, antivirale, antibactérienne, cardioprotective...etc (**Middleton et al., 2000**).

I-3 Présentation de la plante étudiée

I-3-1 *Ecballium elaterium*

Le concombre d'âne, squirting cucumber ou fagoues lehmir, tire son nom scientifique du grec «*ekbalein*» qui signifie «je lance dehors» en raison de la particularité de son fruit qui projette ses graines. C'est une plante herbacée, vivace et rampante appartenant à la famille des cucurbitacées, trouvée abondamment dans le Sud-ouest de l'Europe et en Afrique du Nord, en terrain de caillouteux, dans les décombres et sur des talus (**Greige-Gerges et al., 2007**)Elle a une tige couchée .Elle se distingue des autres cucurbitacées par l'absence de vrille Elle est pérenne grâce à son caractère Hémicryptophytes. En effet, elle a une partie souterraine très développée, ce qui lui permet de survivre pendant les mauvaises saisons, alors que la partie aérienne est desséchée (**Fahn and Shimony, 2001**).

I-3-2 La classification systématique :

La systématique de cette espèce est présentée comme suit : (**Agil et al., 1999**)

Espèce *Ecballium eleterium* fait partie de règne Plantae, Embranchement des Tracheophyta, elle est caractérisée par une Division Magnoliophyta de la Classe

Magnoliopsida, le Genre *Ecballium* est de l'Ordre cucurbitale de la Famille des Cucurbitacées.

I-3-3 Description botanique

Le concombre d'âne est une plante vivace, d'allure grasse, velue de poils raides, à tige couchée de 20 à 60 centimètres. Ses feuilles sont triangulaires. C'est une plante monoïque. De mai à septembre, les fleurs jaunâtres, veinées, en court entonnoir à marge lobée, sont à l'origine d'un fruit curieux par sa biologie. En effet, à maturité, sous la pression de son contenu, il se détache assez soudainement de son pédoncule et projeté alors, par l'orifice ainsi créé, ses graines ténues à plusieurs décimètres (*Bizid et al., 2015*). Les fruits sont de formes oblongues de 4 à 5 cm de long, verdâtres et hérissés de poils rudes (*Agil et al., 1999*).

I-3-4 Composition phytochimique

Les plantes de la famille des cucurbitacées, sont connues par leurs production des triterpénoïdes de type cucurbitane. Le concombre d'âne a été la première famille dans laquelle une cucurbitacine fut isolée, un composé appelé (α -elaterine), identifié plus tard comme étant la cucurbitacine E (*Attard and Cuschieri, 2004*) les cucurbitacines sont des triterpénoïdes principalement tétracyclique, très oxygénés au goût amer, ces substances dérivent du squelette cucurbitane (*Miro, 1995*)

Les cucurbitacine E, B, D et I peuvent être retrouvés dans tous les tissus végétaux de la plante (racines, tiges, feuilles, fruits et fleurs). Deux cucurbitacine glycosidiques ont été isolées et caractérisées à partir de jus de fruit de la plante, il s'agit des cucurbitacines B et D avec le glucose comme partie glycosidique (*Krätzner et al., 2005*)

En plus des triterpénoïdes, *Ecballium elaterium* produit un certain nombre de métabolites secondaires, représentés par les caroténoïdes (carotène) et des composées phénoliques à des concentrations moindres (*Attard and Cuschieri, 2004*)

I-3-5 Utilisation dans la médecine traditionnelles

La plante est connue comme herbe officinale d'une longue tradition et d'une grande variété d'utilisations en bassin méditerranéen. Elle est employée souvent dans l'hydropisie (œdème), particulièrement l'œdème pulmonaire et aussi en tant que révulsif dans les affections cérébrales, et partout où lorsque un effet hydragogue est indiqué (*Agil et al., 1999*)

En médecine populaire géorgienne, *Ecballium* est utilisée comme remède de la fièvre paludéenne. En homéopathie, elle est utilisée contre la diarrhée ou le cholera infantiles (**Fahn and Shimony, 2001**)

Les effets bénéfiques du jus frais ont été rapportés comprenant l'analgésique, l'antipyrétique et l'anti-inflammatoire). Le jus brut frais est employé fréquemment dans le traitement de la sinusite et de l'ictère par des aspirations nasales (**Kloutsos et al., 2001**).

II-Matériel et méthodes**II-1 Préparation de la poudre végétale**

La plante *Ecballium elaterium* a été récoltée au mois de décembre 2017 dans la région d'Ain Lahlou, Daira d'El Kseur, Wilaya de Béjaia. L'identification de la plante a été confirmée par la doctorante M^{me} Mezahem au niveau de laboratoire d'enzymologie de la FSNV de l'université de Bejaia. La plante a été nettoyée et bien lavée à l'eau du robinet pour éliminer les impuretés, puis séchée à l'étuve à 40 °C pendant 48h. Les quatre parties de la plante, à savoir ; les racines, la tige, les feuilles et les fruits ont été séparés les un des autres. Chaque partie a été broyée par un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine de chaque partie. La poudre a ensuite été tamisée sur un tamis d'un diamètre de 125 µm. les poudres des différentes partie ont été mise dans des récipients en verre bien fermé et stockées à l'abri de la lumière et de l'humidité.



Figure 03 : Photographie des feuilles et de la poudre d'*Ecballium elaterium*.

II- 2 Matériels et réactifs

Le matériel et les réactifs utilisés pour l'extraction, les dosages et l'étude de l'activité anti-hémolytique sont reportés en annexe (tableau I).

II-3 Préparation de l'extrait

L'extraction de la poudre végétale issue des différentes parties de la plante a été réalisée par macération dans une solution d'éthanol à 70%. Une quantité de 50 g de la poudre de chaque partie a été macérée dans 500 ml d'éthanol à 70%, puis laissé sous agitation pendant 48 heures à température ambiante. Le mélange a été filtré sur papier Wataman et le filtrat 1 a été récupéré. La même opération a été renouvelée deux fois avec 400 ml et 300 ml d'éthanol à 70% respectivement, et les filtrats 2 et 3 ont été récupérés. Les trois filtrats ont été ensuite mélangés et l'éthanol a été complètement évaporé dans l'étuve à une température de 40 °C (**Benhammo et al., 2008**). L'extrait sec obtenu a été pesé pour calculer le rendement d'extraction selon la formule suivante :

$$\text{Rendement} = (P0 - P1 / PE) \times 100.$$

P0 : poids de la boîte de pétrie contenant l'extrait en mg

P1 : poids de la boîte de pétrie vide en mg

PE : poids de l'échantillon (poudre végétale en mg)

II-4 Dosage des polyphénols

II-4-1 Dosage des polyphénols totaux

Principe

Le contenu en polyphénols totaux des extraits a été réalisé par la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. C'est un réactif jaune d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en oxyde bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration bleue des échantillons est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents (**Lapornik et al., 2005**).

Mode opératoire

Un volume de 1,5 ml du réactif Folin-ciocalteu (10% dans de l'eau distillé) est ajouté à 200 µl de l'extrait. Le mélange est ensuite incubé pendant 5 min, puis 0,8 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7,5 % sont additionnées. Le mélange est agité, puis incubé pendant 2h à température ambiante à l'abri de la lumière et l'absorbance est lue à 765 nm, contre un blanc préparé dans les mêmes conditions mais ne contenant pas d'extrait végétale (**Wang et al., 2006**).

La concentration des polyphénols totaux est calculée, en se référant à une courbe d'étalonnage réalisé dans les mêmes conditions utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en gramme équivalent d'acide gallique/ 100 gramme de matière sèche (g EAG/ 100 g de MS)

II-4-2 Dosage des flavonoïdes

Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyles OH libre en position 5, la réaction de ces derniers avec le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ entraînant la formation d'un complexe jaune par chélation de l'ion Al^{3+} . La quantité de flavonoïdes présente dans les extraits liée proportionnelle à la coloration produite.

Mode opératoire

Un volume de 1 ml de la solution d'extrait végétale a été mélangé avec 1 ml d'une solution de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 448nm (**Lamaison et carnet, 1990**).

Une courbe d'étalonnage établie avec la quercitine dans les mêmes conditions est utilisée pour calculer les concentrations en flavonoïdes. Les résultats sont exprimés en gramme équivalent de quercitine par 100 gramme de matière sèche (g EQ/ 100g de MS).

II-4-3 Dosage des tanins

Principe

Les teneurs en tanins dans les extraits ont été déterminées selon la méthode de (**Hagerman et Butler, 1978**), qui est basée sur la précipitation de la BSA par les tannins présents dans l'extrait, et la quantité du précipité en complexe tannins-BSA sera déterminée par spectrométrie.

Mode opératoire

Le dosage des tanins totaux a été réalisé en utilisant la méthode de **Hagerman and Butler, (1978)**, qui est basée sur la précipitation de la protéine albumine de sérum (BSA) par les tanins présents dans chaque extrait.

Un volume de 0,5 ml d'extrait ou du standard (acide tannique) est mélangé à 1 ml d'une solution de BSA dissoute dans un tampon acétate (0,02 M acide acétique, 0,17 M de NaCl pH 4,9) à raison de 1mg/ml. Le mélange à été incubé à 4 °C pendant 24 heures, puis centrifugé à une vitesse de 3000 tour/min pendant 15min. Le surnageant à été éliminé, et un volume de 2 ml d'une solution SDS/TEA (1% p/v et / 5% v/v dans de l'eau distillé) a été

ajouté au culot. Ensuite 0,5 ml d'une solution de FeCl_3 à une concentration de 0,01 M dans HCl à 0,01 N. le mélange a été incubé pendant 15 min et l'absorbance a été lue à 510 nm.

La teneur en tannins a été estimée en se référant à une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions expérimentales avec l'acide tannique comme référence et exprimés en gramme équivalent d'acide tannique par 100 gramme de matière sèche (g EQ/100 g de MS).

II-5-2 Mise au point des tests d'hémolyse *ex vivo*

Principe

Les érythrocytes constituent un bon modèle pour étudier le mécanisme de la stabilisation membranaire. Les globules rouges sont formés d'une part d'une membrane qui a une composition très varié et d'autre part d'organelles intracellulaire ; l'hémoglobine. Donc tout effet d'une substance sur l'hémolyse pourrait être interprété comme effet sur la fragilité de la membrane elle-même (Seeman et Weinstein, 1966).

Préparation de la suspension des érythrocytes

Les échantillons de sang ont été fournis par le laboratoire de la clinique de maternité de Targua-Ouzemour dans la wilaya de Béjaia. Ils ont été obtenus auprès des personnes saines n'ayant pas pris d'anti-inflammatoires non stéroïdiens dans les 48 heures précédents le prélèvement. Le sang a été recueilli dans des tubes à héparines et centrifugé à une vitesse de 3000 rpm durant 10 minutes. Le plasma séparé des érythrocytes est éliminé (le surnageant). Ces érythrocytes sont ensuite lavés trois fois par une solution de tampon phosphate saline « PBS » (10 mM, pH 7,4) qui contient 125 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 et 10 mM Na_2HPO_4 . Les globules rouges sont ensuite reconstituée sous forme de suspension à 10% toujours dans le PBS, et la solution est conservée à 4 °C et utilisée au maximum dans les 6h suivant sa préparation (Yuan *et al.*, 2005).

II-5-2-1 Induction de l'hémolyse par l'acide salicylique

Principe

L'exposition des érythrocytes humains à des agents oxydant tels que l'acide salicylique (précurseur de l'aspirine) montre un effet néfaste sur l'hémolyse des globules rouges. Il provoque l'éclatement de la membrane plasmique et l'hémoglobine se trouvera alors dans le surnageant et sera dosé par spectrophotométrie (Houcher *et al.*, 2001).

Mode opératoire

Dans des tubes à essai contenant chacun 4,5 ml de NaCl hypotonique, 50 µl d'acide salicylique de concentrations variables (0,1 à 0,5 mg/ml) ont été mélangés. Le tube témoin reçoit le même volume du solvant (DMSO). Puis, une quantité de 500 µl de la suspension érythrocytaire est ajoutée dans chaque tube. Ces tubes ont été homogénéisés et incubés à 37°C pendant 30 min dans un bain marie. Ensuite, les tubes ont été centrifugés (3000 rpm ; pendant 5 min) et l'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm (**Houcher et al., 2001**).

II-5-2 Induction de l'hémolyse par chlorure de sodium (NaCl)**Principe**

L'évaluation dans ce test consiste à soumettre une suspension d'hématies à une agression oxydante par un agent qui est le chlorure de sodium.

Mode opératoire

Un volume de 5 ml de NaCl à différentes concentrations (3,5 ; 4 ; 5 ; 6 et 7 mg/ml) a été mélangé et homogénéisé avec 100 µl du culot d'une suspension de globules rouges. Le mélange a été ensuite incubé à température ambiante pendant 30 min, puis centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min et la densité optique du surnageant a été mesurée à 540 nm.

Les deux témoins positif et négatif ont été préparés dans les mêmes conditions à part que le premier reçoit 5 ml d'eau distillée et le deuxième 5 ml de NaCl isotonique (**Lourrad et al., 2016**).

II-5-3 Induction de l'hémolyse par le triton X100

Le principe de ce test est basé sur l'utilisation d'un perturbateur membranaire comme le détergent non ionique triton X-100 qui provoque la rupture de la membrane des globules rouges. Après cela, l'hémoglobine libérée est mesurée par spectrophotomètre.

Le protocole utilisé est celui décrit par (**Muthu and Durairaj, 2015**). Un volume de 800 µl du triton X100 à différentes concentrations (0,01%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,1 % et 1%) a été mélangé et homogénéisé avec 2,2 ml de tampon phosphate saline à un pH= 7,4 et 500 µl de la suspension érythrocytaire. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 1 heure, et ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min. La densité optique du surnageant a été mesurée

par spectrophotométrie à 540 nm. Le contrôle à été préparé dans les mêmes conditions expérimentales précédentes en absence du triton X100.

II-6 Evaluation de l'effet anti hémolytique des extraits d'*Ecballium elaterium*

II-6-1 Effet sur l'hémolyse induite par l'acide salicylique

L'évaluation de l'activité anti hémolytique des différentes extraits d'*Ecballium elaterium* a été réalisée selon le protocole de (**Houcher *et al.*, 2001**) avec quelque modification dans le but de démontrer l'effet protecteur et la préservation de l'intégrité des globules rouges. Les différentes étapes sont les suivantes :

- Mettre dans des tubes a hémolyse 300 µl de la suspension érythrocytaire préparé, avec 1ml de l'extrait à différentes concentration (0,25mg/ml ; 0,35mg/ml ; 0,5mg/ml et 1mg/ml) solubilisée dans le PBS
- Ajouter un volume de 4,5 ml de NaCl hypotonique avec 50 µl de l'acide salicylique à une concentration de 0,3mg/ml.
- Le témoin positif est constitué de 300 µl de la suspension érythrocytaire, 1 ml de PBS, 4,5 ml de NaCl hypotonique avec 50µl de l'acide salicylique. Le témoin négatif a été préparé en présence de NaCl isotonique
- Incubation a 37°C durant 1 h 30 min
- Diluée les tubes avec 5 ml de PBS
- Centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min
- Lire l'absorbance du surnageant récupérer de chaque tube à 540 nm a l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible

Pour comparer l'efficacité des extraits testés à une molécule de référence (standard), des essaie ont été réalisée avec l'induction de hémolyse par l'acide salicylique sur des érythrocytes incubés dans un milieu isotonique.

II-6-2 Effet sur l'hémolyse induite par chlorure de sodium (NaCl)

L'activité anti-hémolytique des extraits d'*Ecballium elaterium* a été évaluée aussi par la capacité de ces extraits à stabiliser la membrane des globules rouges vis-à-vis de l'attaque du chlorure de sodium (NaCl).

Un volume 100 µl de globules rouges sont mélangés avec 100 µl des extraits d'*Ecballium elaterium* à différentes concentrations (0,1 mg/ml ; 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml et 1 mg/ml). Après une incubation de 10 min à température ambiante, 5ml de NaCl à une concentration de 3,5 mg/ml sont ajoutés. Le mélange a été ensuite incubé pendant 1H 30 min à 37 °C, puis centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. L'évaluation du pouvoir hémolytique a été effectuée en mesurant l'absorbance du surnageant à 540 nm.

La quercitine a été utilisée comme standard anti-hémolytique et les essais ont été réalisés dans les mêmes conditions précédemment décrites.

II-6-3 Effet sur l'hémolyse induite par le triton X-100

L'activité anti-hémolytique des extraits d'*Ecballium elaterium* vis-à-vis l'hémolyse induite par le triton X-100 a été évaluée en suivant le protocole décrit par **Muthu et Durais (2015)**.

Dans des tubes à hémolyse, un volume de 50µl des extraits à différentes concentrations (0,25 mg/ml ; 0,5 mg/ml et 1 mg/ml) a été ajouté à 500 µl de la suspension érythrocytaire pré incubée pendant 1 min. un volume de 800 µl de triton X-100 (0,05%) a été additionné dans à chaque tube, puis incubé à 37 °C pendant 1 heure0 les mélanges ont été ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 541 nm. Les contrôles négatif et positif ont été préparés dans les mêmes conditions expérimentales en absence de la suspension érythrocytaire pour le premier et absence de l'extrait végétal pour le deuxième.

Pour comparer l'activité des extraits testés à un anti-hémolytique standard, des essais ont été réalisés dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique.

Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = (ABS_C - ABS_T) / ABS_C \times 100$$

Abs_C: absorbance du contrôle positif

Abs_T: absorbance du test

➤ **Analyse statistique**

Les analyses statistiques des résultats sont donnés pour des expériences réalisées au moins trois fois et d'une manière indépendante. Les résultats sont présentés comme une moyenne ± écart-type. La détermination des IC50 (concentration inhibitrice à 50%) a été réalisée en utilisant le logiciel Origin 8. Les résultats sont comparés par une analyse de la variance, en utilisant ANOVA (STATISTICA 5.5) et le degré de signification est pris à la probabilité P<0,05.

III-1 Taux d'extraction

Avant de procéder à l'extraction, les différentes parties d'*Ecballium elaterium* ont été séchées à l'air libre, et à l'abri de la lumière afin d'éviter les endommagements des composés d'intérêt, à savoir les composés phénolique.

De plus, le broyage a été réalisé de façon à obtenir une poudre fine et homogène, afin d'augmenter la surface de contact de la matière végétale avec le solvant utilisé qui est l'éthanol à 70%. En effet, l'éthanol est connu comme un excellent solvant d'extraction de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques. Il est aussi caractérisé par sa faible toxicité comparativement à d'autres solvants organiques tel que le méthanol (Cowan, 1999).

Les taux d'extraction à partir des différentes parties d'*Ecballium elaterium* à été calculés par rapport à la poudre végétale initiale utilisée pour la préparation des extraits éthanolique. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 4**.

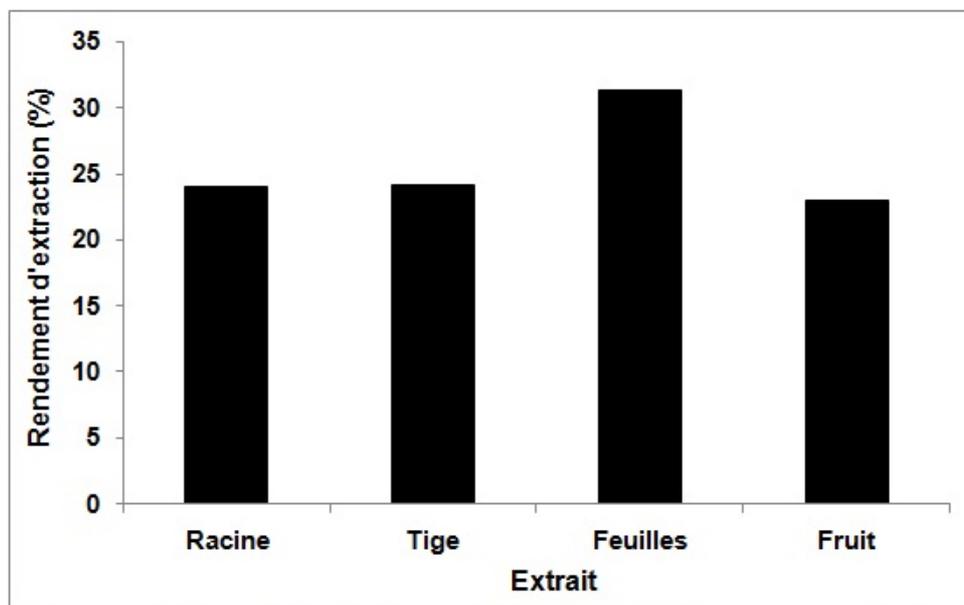


Figure 04 : Taux d'extraction par macération dans l'éthanol à 70% des différentes parties d'*Ecballium elaterium*.

Bien que le solvant d'extraction est le même, on observe une variabilité des rendements d'extraction entre les quatre parties de la plante. Les feuilles ont données le rendement le plus élevé avec 31,28% de la matière végétale initiale, suivi des tiges et des racines qui ont donnés des taux très proche qui sont respectivement de l'ordre de 24,21% et 24,08%. Enfin, le fruit a donné le rendement le plus bas qui est de 22,93%.

Ces rendements sont assez faibles par rapport aux rendements d'extraction obtenus avec l'espèce *Cucumis melon* qui appartient à la même famille des cucurbitacées, l'extraction a été faite par le méthanol, et a donné des rendements variés en fonction de la partie utilisée. Ainsi, la chair a donné le rendement le plus élevé (89,6 %), suivi par les feuilles (76,6%), tandis que le plus faible rendement a été obtenu à partir des graines avec 23,7%. (Ismail *et al*, 2010).

Il a été rapporté que le taux d'extraction des composés phénoliques est influencé par la nature du solvant, le type d'extraction, la granulométrie de la poudre végétale, le rapport solide-liquide et la température d'extraction (Bonnaillie *et al.*, 2012).

III-2 Dosage des composés phénoliques

III-2-1 Teneur en polyphénols totaux

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées, grâce à leurs propriétés intéressantes. Le dosage des polyphénols totaux des extraits des différentes parties d'*Ecballium elaterium* a été effectué par la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La quantification des taux des polyphénols totaux présents dans les extraits est estimée en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée en utilisant l'acide gallique (Annexe II). Les résultats obtenus sont exprimés en gramme équivalent d'acide gallique par 100 gramme de la matière végétale sèche (g EAG/ 100 g MS).

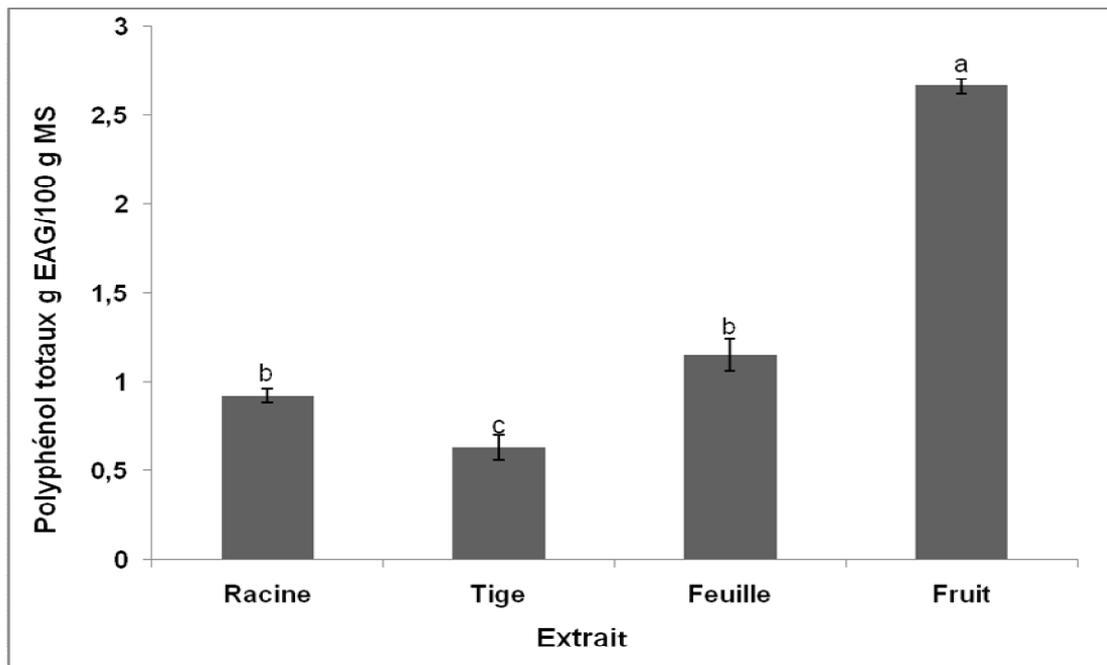


Figure 05 : Teneur en polyphénols totaux des différentes parties d'*Ecballium elaterium*

Les teneurs en polyphénols totaux (**Figure 5**) montrent que l'extrait des fruits a donné la teneur la plus élevée qui est de l'ordre de $2,66 \pm 0,04$ g EAG/ 100g MS, suivi de celle des feuilles qui est de l'ordre de $1,15 \pm 0,09$ g EAG/ 100 g MS. L'extrait de la racine a donné un taux de polyphénol totaux qui est de $0,98 \pm 0,04$ g EAG/ 100 g MS. Enfin, la teneur la plus faible est obtenue avec l'extrait de la tige qui est de $0,63 \pm 0,07$ g EAG/ 100 g MS.

La variation de la quantité des polyphénols totaux peut être expliquée par la différence de la partie végétale utilisée, ainsi que leurs degré de maturation (**Pinelo et al., 2004**).

Des études réalisées sur les fruits de l'espèce *Citrullus colocynthis* et les racines de *Bryonia dioica* qui font partie à la même famille des cucurbitacées ont rapportées des teneurs en polyphénols totaux différentes de celle trouvées dans la présente étude, puisque les extraits aqueux du fruit de *Citrullus colocynthis* et de la racine de *Bryonia dioica* ont donné des taux respectivement de l'ordre 1187.90 mg EAG/ 100 g MS, et 2554.56 mg EAG/100 g MS (**Chekroun et al., 2015**). Cette différence est due à l'intervention de plusieurs facteurs tel que : la nature du solvant, le lieu géographique, la période de récolte et la méthode d'extraction.

III-2-2 Teneur en flavonoïde

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). La couleur jaune est formée dans tous les extraits après l'addition du trichlorure d'Aluminium, cette coloration exprime la présence des flavonoïdes dans les extraits analysés.

Les résultats du dosage des flavonoïdes sont exprimés en gramme équivalent quercétine par 100 gramme de la matière sèche végétale en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions en utilisant différentes concentrations de quercétine (**Annexe III**), et les résultats sont représentés sur la **Figure 6**.

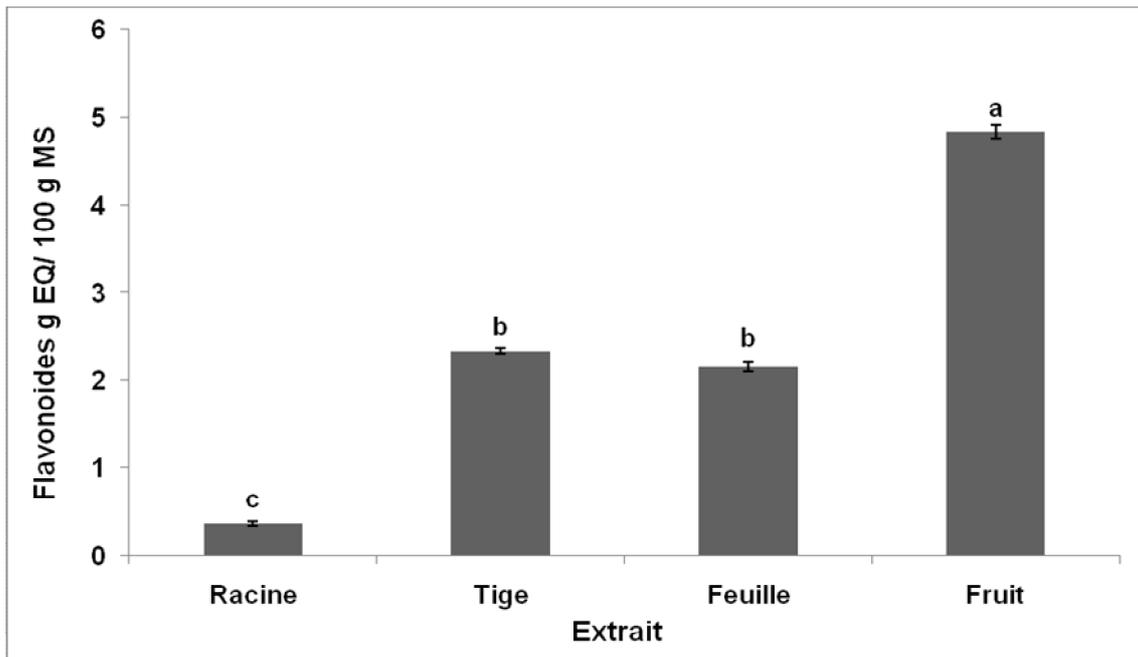


Figure 06 : Teneurs en flavonoïdes des différentes parties d'*Ecballium elaterium*.

Ces résultats montrent une différence de la teneur en flavonoïdes selon les parties de la plante étudiée. Ainsi, il est à noter que le fruit présente le taux le plus élevé en flavonoïdes avec $4,84 \pm 0,08$ g EQ/100 g MS. La teneur en flavonoïdes des extraits de la tige et des feuilles sont proche et sont de l'ordre de $2,34 \pm 0,03$ g EQ/100 g MS et $2,16 \pm 0,06$ g EQ/100g MS respectivement. Enfin, la partie la plus pauvre en flavonoïdes est la racine qui a donné une teneur de $0,37 \pm 0,03$ g EQ/100 g MS.

La richesse des organes aériens en flavonoïdes par rapport aux racines peut être attribués à l'irradiation avec de la lumière qui affecte le contenu phénolique des organes. Il existe une relation positive bien établie entre rayonnement naturel et la synthèse des composés phénoliques par les plantes (Niknam and Ebrahimzadeh, 2002).

III-2-3 Teneur en tanins

La teneur en tanins dans les extraits des quatre partie étudiées d'*Ecballium elaterium* a été déterminée par une colorimétrie. Les analyses quantitatives sont déterminées à partir de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions en utilisant une molécule de référence qui est l'acide tannique (Annexe IV). Les résultats obtenus ont été exprimée en grammes équivalent d'acide tannique par 100 gramme de la matière sèche végétale (g EAT/100 g MS) (Figure 07).

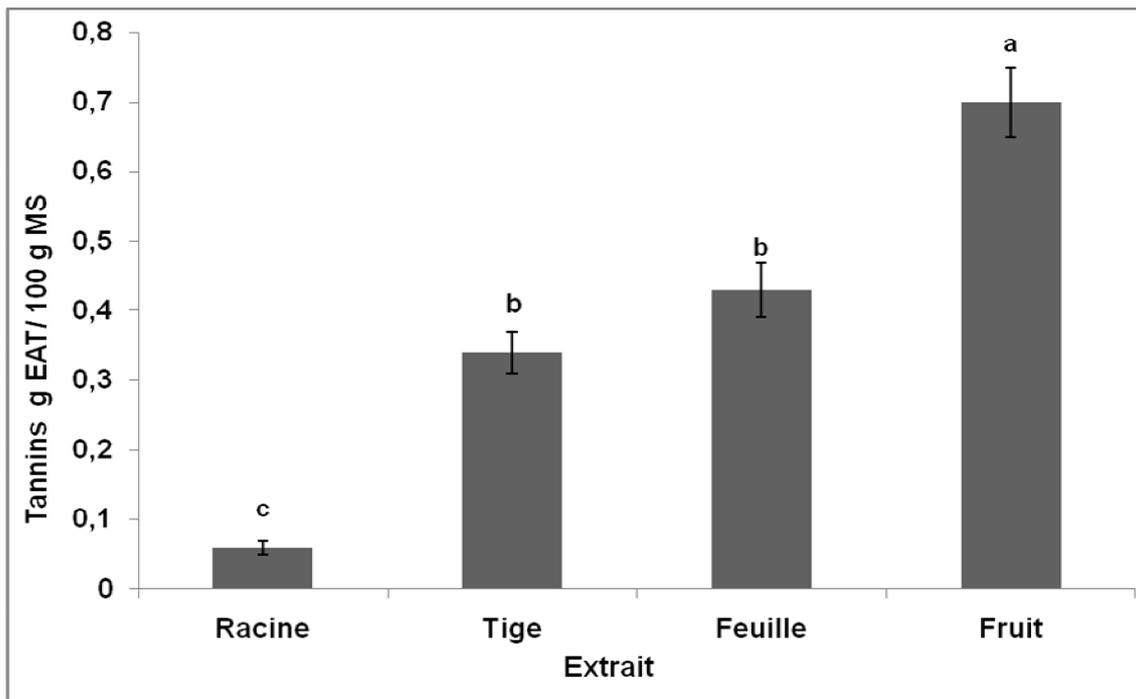


Figure 07 : Teneurs en tanins des différentes parties *Ecballium elaterium*.

D'après ces résultats, on constate que la teneur du fruit en tanins présente le taux le plus élevé avec $0,70 \pm 0,05$ g EAT /100 g MS par rapport aux autres parties. Ensuite la feuille et la tige ont donnés des teneurs très proche et qui sont respectivement de $0,43 \pm 0,04$ g EAT/100 g MS et $0,34 \pm 0,03$ g EAT/100 g MS. Par contre, la racine est la partie avec laquelle la plus faible teneur en tanins a été enregistrée qui est de l'ordre de $0,059 \pm 0,01$ g EAT/100 g MS.

Ces résultats sont différents de ceux rapportés par Abbassi et ses collaborateur (**Abbassi *et al.* 2014**), et qui indique que les teneurs en tannins des différents organes d'*Ecballium elaterium* sont comme suit : fruit ($4,29 \pm 0,33$ mg EAT/g MS) ; feuille ($3,54 \pm 0,66$ mg EAT/g MS) et racine ($2,09 \pm 0,33$ mg EAT/g MS).

Cette différence des teneurs en tannins peu être due à la nature du solvant utilisée en raison de leur structure fortement hydroxylée, et aussi probablement dû au séchage appliqué qui a conduit à la dégradation des tannins (**Okwu et Ukanwa, 2007**).

III-3 Activité anti-hémolytique des extraits d'*Ecballium elaterium*

Les érythrocytes constituent un type cellulaire très adéquat pour l'étude de certaines agressions en raison de la richesse de leur membrane en lipides et en protéines. La concentration cellulaire élevée en oxygène et en hémoglobine est un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaires (**Arbos *et al.*, 2008**).

III-3-1 Variation des taux d'Hémolyse induite par l'acide salicylique

Le but de ce test est de montrer l'effet néfaste de l'acide salicylique sur l'hémolyse des érythrocytes humains sur les deux aspects, c'est-à dire sur la membrane plasmique des érythrocytes et sur l'hémoglobine.

Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 08**, et montrent la variation du pourcentage d'hémolyse mesuré par la densité optique à 540 nm en fonction de différentes concentrations d'acide salicylique. On observe qu'à des concentrations de 0,1 mg/ml jusqu'à 0,3 mg/ml l'hémolyse augmente proportionnellement avec les concentrations de l'acide salicylique. Au delà de 0,3 mg/ml, le taux d'hémolyse est stable (lyse presque complète à 100%). Ces résultats montrent que l'hémolyse des globules rouge incubés dans le milieu hypotonique augmente en fonction de la concentration de l'acide salicylique jusqu'à la concentration de 0.3 mg/ml qui représente une lyse à 100%.

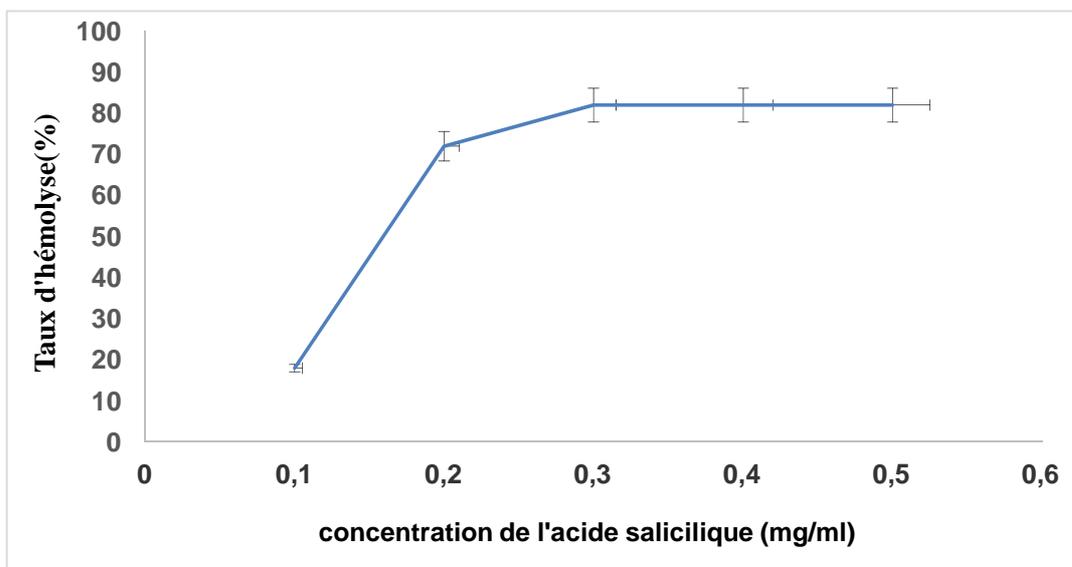


Figure 08: Courbe représentant l'effet de l'acide salicylique sur l'hémolyse des Globules rouges incubées dans le milieu hypotonique.

L'exposition des érythrocytes humains à des agents oxydants tels que l'acide salicylique, précurseur de l'aspirine ne favorise l'hémolyse qu'en cas de prises importantes (fortes concentrations ou surdosage). L'hémolyse induite augmente en fonction de la concentration d'acide salicylique, et cela est expliquée par les travaux de (**Houcher *et al.*, 2001**) qui montre que les fortes doses d'acide salicylique augmentent le taux d'hémolyse. Nous postulons que l'effet de l'acide salicylique est dû à son hydrophobicité qui lui permet de

s'incorporer au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique des érythrocytes et provoque une diminution de la fluidité membranaire qui empêche les échanges membranaires, et qui induit une hémolyse. De plus, parmi les effets secondaires de l'aspirine, on peut citer son effet oxydant, qui peut entraîner la production des radicaux libres, ces derniers attaquent la membrane plasmiques des globules rouge (Li et al., 1999).

III-3-2 Effet des extraits sur l'hémolyse induite par l'acide salicylique

L'étude de l'activité anti-hémolytique des extraits des quatre parties d'*Ecballium* est testée par le teste d'inhibition de l'hémolyse induite par l'acide salicylique dans un milieu hypotonique. L'effet de l'acide salicylique sur les érythrocytes incubé dans le milieu isotonique a été considéré comme standard (Annexe V).

Les résultats obtenus (Figure 9) montrent que l'effet anti-hémolytique des différents extraits varie significativement ($P < 0,05$) pour toutes les parties de la plante, sachant que l'effet de protection des hématies augmente avec les concentrations des extraits utilisée. Les extraits des feuilles et des racines ont donnés le plus grand pourcentage d'inhibition de l'hémolyse qui est de l'ordre $84,0 \pm 0,01\%$ et $82,17 \pm 0,015\%$ respectivement, pour une concentration de 1 mg/ml. Pour la même concentration maximale, la tige a donné un pourcentage d'inhibition de $73,97 \pm 0,12\%$. Enfin, une faible inhibition a été enregistrée avec l'extrait du fruit avec un pourcentage de $64,69 \pm 0,16\%$.

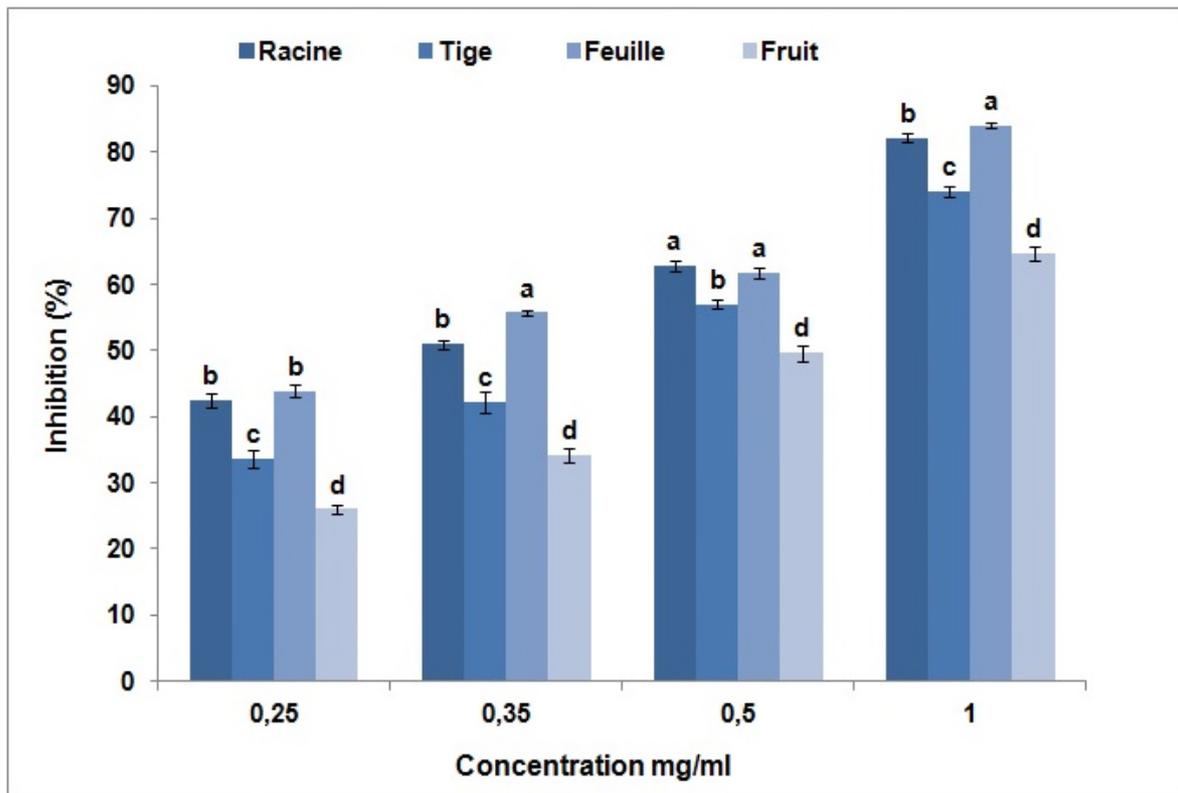


Figure 09 : Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par l'acide salicylique à différentes concentrations des extraits d'*Ecballium*.

L'efficacité de l'activité anti-hémolytique des extraits des différentes parties d'*Ecballium elaterium* a été aussi exprimée en termes de concentration d'extrait végétal capable d'inhiber 50% de la lyse. Les résultats obtenus (**Tableau III**), confirment ceux exprimés ci-dessus en pourcentage d'inhibition, et montre que le meilleur pouvoir anti-hémolytique a été enregistré par l'extrait des feuilles avec un IC₅₀ de l'ordre de 0,435 mg/ml, qui ne présente aucune différence significative avec celui de l'extrait de la racine qui est de 0,438 mg/ml. Tandis que la faible inhibition a été constatée avec l'extrait du fruit avec un IC₅₀ de l'ordre de 0,476 mg/ml. Ces IC₅₀ des différents extraits montrent un faible pouvoir anti-hémolytique par rapport au à celui du standard (acide salicylique dans un milieu isotonique) qui présente une meilleure efficacité avec un IC₅₀ de 0,154 mg/ml.

Tableau III: L'efficacité des différents extraits d'*Ecballium* et du standard qui est l'effet de l'acide salicylique sur les érythrocytes incubées dans le milieu isotonique.

Les parties	IC50 en mg/ml
Racine	0,438
Tige	0,452
Feuille	0,435
Fruit	0,476
Standard	0,154

Selon la recherche bibliographique sur les plantes médicinales qui pouvant combattre l'effet hémolytique de l'acide salicylique (aspirine) sur les érythrocytes, aucun travail n'a été effectué.

Quelque médicaments sont susceptibles de provoquer une oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine, lorsqu'ils sont administrés en excès (**Mayer and Ley, 1970**), Ces médicaments oxydants ne sont donc hémolysants qu'en cas de prise importante ou de surdosage .Par ailleurs, ils sont impliqués dans la plupart des cas dans l'induction de l'anémie hémolytique chez les sujets possédant une déficience enzymatique en G6PD et en pyruvate kinase (**Sanford et al .,1986**) *In vivo*, l'effet hémolytique des médicaments oxydants peut être évité en associant un autre anti-inflammatoire avec un antioxydant tel que la vitamine E .

Donc on peut suggérer que l'effet anti-hémolytique des extraits des quatre parties d'*Ecballium elaterium* est dû à sa composition et sa richesse en quelques composants tel que la vitamine E, ainsi des études menées par (**Houcher et al, 2001**) ont démontré que la vitamine E est l'un des puissants antioxydants, la vitamine E protège les cellules érythrocytaire de la destruction et la peroxydation lipidique et neutralise les radicaux libres.

III-3-3 Variation des taux d'Hémolyse induite par le chlorure de sodium (NaCl)

Les résultats de l'hémolyse induite par le chlorure de sodium, agent oxydant qui possède la capacité de détruire la membrane suite à la peroxydation lipidique des acides gras insaturés, qui sont présents dans la membrane érythrocytaire (**Louerrad et al., 2016**).

D'après les résultats obtenus (**Figure 10**), le taux d'hémolyse dépend de la concentration de NaCl. Une concentration de 3,5 mg/ml a provoqué une hémolyse très importante (hémolyse totale). Cependant, pour les concentrations beaucoup plus élevées (4, 5 et 6 mg/ml) l'hémolyse diminue et tend à être nulle à la concentration de 7 mg/ml (milieu pratiquement isotonique ou la concentration dans le milieu sont presque égale aux concentrations à l'intérieur des globules rouges).

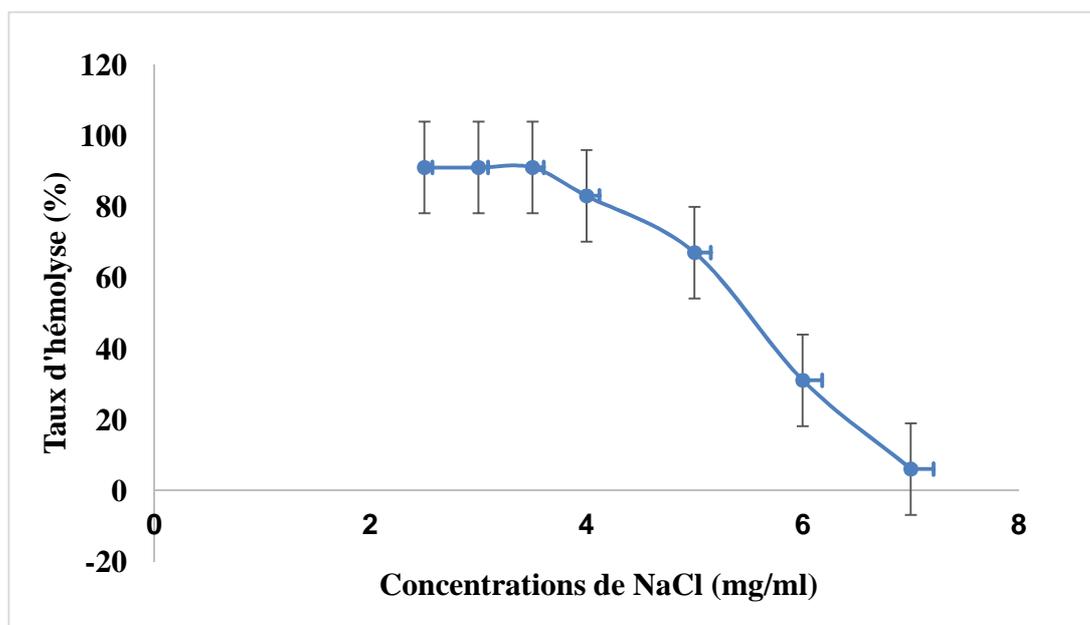


Figure 10: Taux d'hémolyse induite par différentes concentrations de NaCl.

Ces résultats s'accordent avec les résultats rapportés par Louerrad et ses collaborateurs (**Louerrad *et al.*, 2016**) qui montre que l'activité hémolytique a été observé à partir d'une concentration de 3,5 mg/ml, suite à un stress oxydatif. Les cellules réagissent en accumulant les espèces réactives de l'oxygène et l'hémoglobine sera exposée, ce qui entraîne une perte d'élasticités membranaire des globules rouges.

III-3-4 Effet des extraits sur l'hémolyse induite par le chlorure de sodium

L'effet anti-hémolytique des extraits d'*Ecballium* à différentes concentrations et du standard (quercitine) vis-à-vis de l'hémolyse induit par le chlorure de sodium dans un milieu hypotonique, ont été évalué par la capacité de ces extraits à protéger la membrane des globules rouges, les résultats sont présentés dans la **Figure 11**.

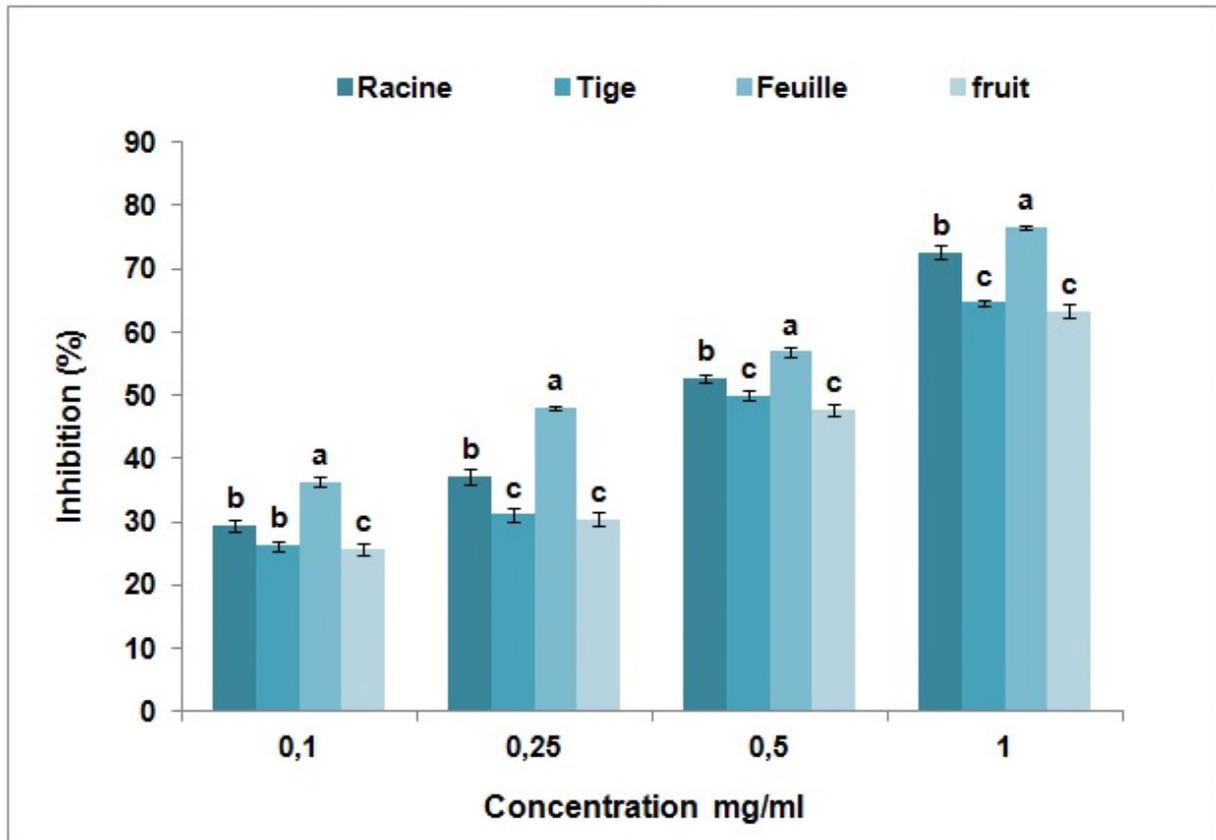


Figure 11 : Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par le chlorure de sodium à différentes concentrations des extraits d'*Ecballium elaterium*.

D'après ces résultats, les extraits des quatre parties testées d'*Ecballium elaterium* ont montrées des différences significativement importante en terme concentrations en fonction de la partie étudiée ($P < 0,05$). Ces extraits assurent aux globules rouges humains une protection contre l'hémolyse induite par le chlorure de sodium. Le pourcentage d'inhibition de chaque extrait augmente en fonction des concentrations utilisée. Par exemple, l'extrait des feuilles avec une concentration de 1 mg/ml présente un taux d'inhibition de $76,66 \pm 0,25\%$, alors qu'à une concentration de 0,1 mg/ml, il présente un taux de $36,21 \pm 0,20\%$.

Les résultats précédents ont été exprimés aussi par le calcul des concentrations inhibitrices de 50% du pourcentage d'inhibition (**Tableau IV**).

Tableau IV : L'efficacité des différents extraits d'*Ecballium* et du standard contre l'hémolyse induite par le chlorure de sodium exprimé en IC50.

Parties	IC50 (mg/ml)
Racine	0,467
Tige	0,457
Feuille	0,456
Fruit	0,418
Quercitine	0,383

L'efficacité anti-hémolytique des extraits d'*Ecballium elaterium* est faible pouvoir par rapport à celle d'un flavonoïde de référence quercitine qui a donné un IC50 = 0,383 mg/ml (**Annexe VI**). La meilleure activité anti-hémolytique IC50 le plus faible qui est de l'ordre de 0.418 mg/ml)) a été constaté avec l'extrait du fruit. Il est à noter que tous les extraits ont donné des IC50 inférieur à 0.5 mg/ml.

Le pourcentage d'inhibition des extraits d'*Ecballium elaterium* est meilleur que celui de l'extrait aqueux de la plante *Haloxylon scoparium* (**Louerrad et al., 2016**). Cette dernière a donné un pourcentage d'inhibition de 39,85% pour une concentration de 1 mg/ml. Donc l'extrait aqueux de cette plante possède une capacité faible pour protégé la membrane contre les dommages causés par l'agent oxydant NaCl.

Une étude faite par Moreira et ses collaborateurs (**Moreira et al., 2011**) a rapporté que le propolis (extrait de résine) possède un bon effet antioxydant au niveau des érythrocytes vis-à-vis à stress oxydant induit par différentes concentrations de NaCl. Cet effet est du à sa richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes préviennent des dommages oxydatifs causés dans les érythrocytes, et cette protection peut être due à la chélation du fer dans la cellule.

Les composés phénoliques et les flavonoïdes attribuent aux plantes un pouvoir protecteur contre le stress oxydatif. Cependant l'effet protecteur peut être influencé par plusieurs facteurs tels que, les teneurs d ces composés dans les plantes qui varient essentiellement selon leur origine, la saison de récolte, ainsi que les conditions climatiques et environnementales (**Ebrahimzadeh et al., 2008**).

III-3-5 Effet de la concentration du triton X-100 sur l'hémolyse

Ce protocole expérimental a été adapté pour évaluer l'effet des différentes concentrations du triton X-100 sur le taux d'hémolyse des érythrocytes.

Selon la **Figure 12**, le taux d'hémolyse des globules rouges dépend de la concentration du triton X-100 présent dans le milieu réactionnel. L'hémolyse des globules rouges augmente en fonction du pourcentage du triton X-100, jusqu'à atteindre une hémolyse totale pour la concentration la plus élevée qui est de 1%.

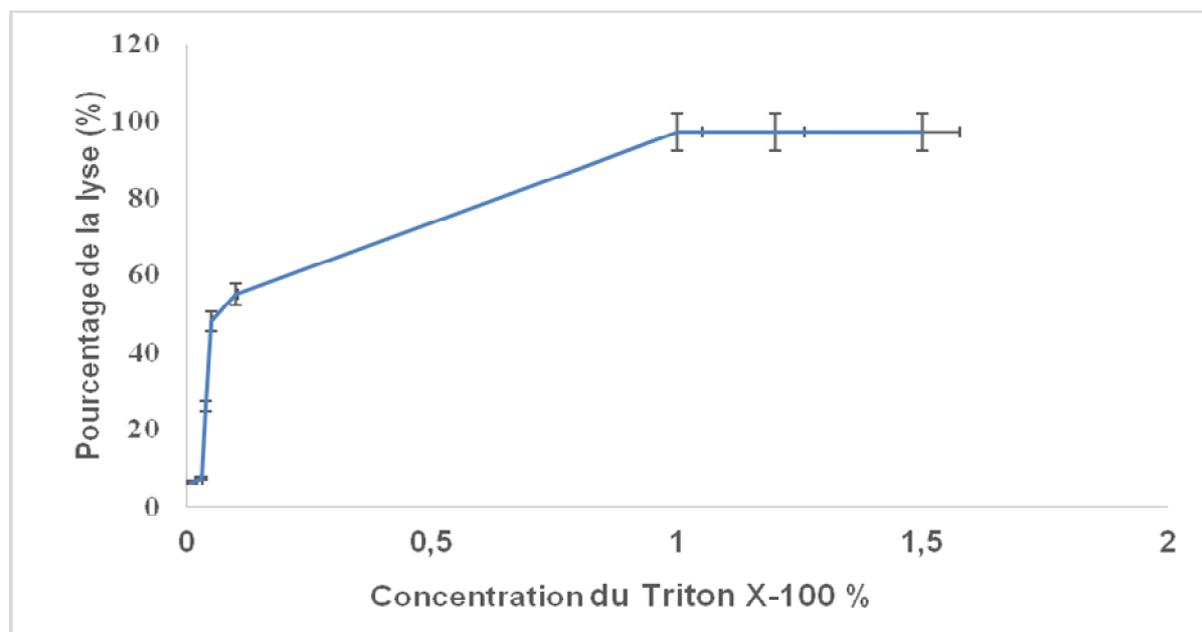


Figure 12 : Courbe représentant l'effet des concentrations du triton X-100 sur les érythrocytes.

Le triton X-100 a la capacité de perturber la membrane des globules rouges et des cellules en général. C'est un détergent de synthèse non ionique qui est constituée d'une partie polaire hydrophile et d'une queue hydrophobe. Les molécules du triton X-100 rentrent en interaction avec les parties hydrophobes des lipides de la membrane érythrocytaire jusqu'à saturation, ce qui provoque l'extraction des lipides et puis la perturbation de l'organisation de la membrane. A des concentrations très élevées, les globules rouges seront totalement solubilisés sous forme de micelles ou de liposomes (Muthu et Durais, 2015).

III-3-6 Effet des extraits sur l'hémolyse induite par le triton X-100

Les résultats de l'effet des extraits des différentes parties de la plante *Ecballium elaterium* sur l'hémolyse provoquée par le triton sont représentés dans la **Figure 13**.

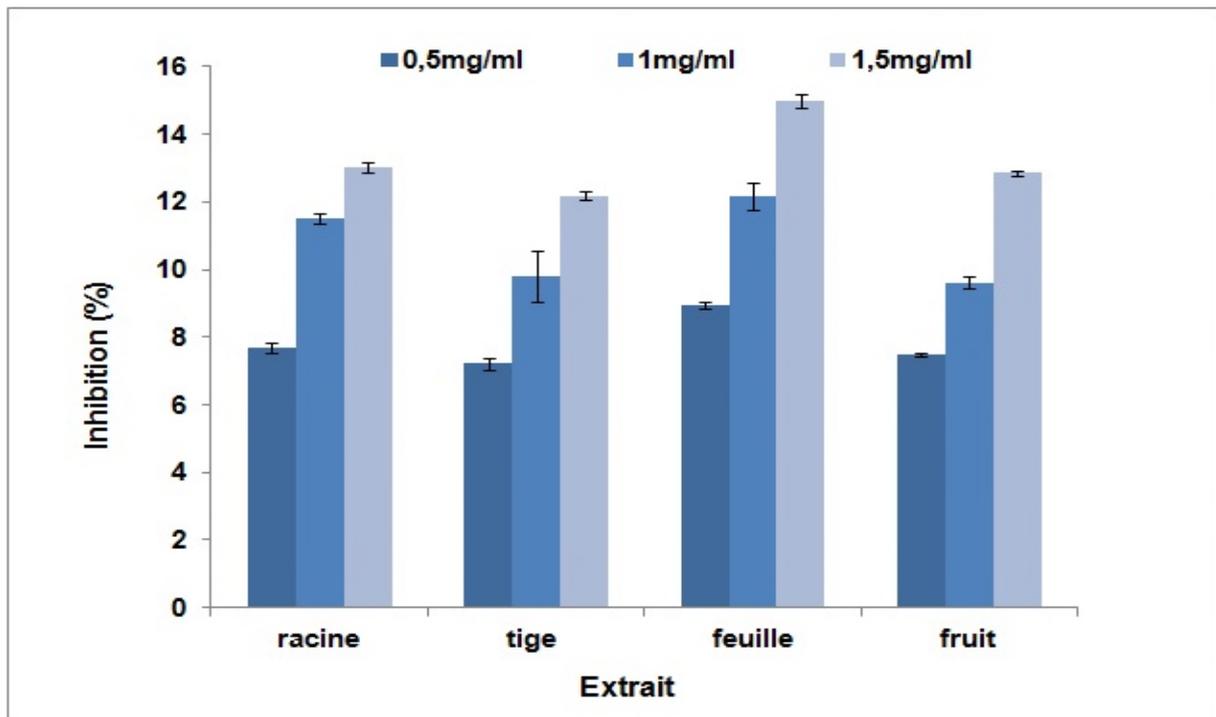


Figure 13: Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par le triton X-100 à différentes concentrations des extraits d'*Ecballium elaterium*.

D'après les résultats illustrés dans la **figure 13**, l'effet anti-hémolytique qui a été observé quelque soit la partie utilisée et même à des concentrations maximale était très réduit et ne dépasse pas dans les meilleurs cas 15% d'inhibition. Presque les mêmes résultats ont été aussi enregistrés avec le standard qui est l'acide gallique (**Annexe VII**). Le pourcentage le plus faible de l'extrait de la tige est de l'ordre de $7,21 \pm 0,04\%$ pour une concentration de 0,5 mg/ml jusqu'à le pourcentage le plus grand obtenu par la feuille avec $14,97 \pm 0,15\%$ à une concentration de 1,5 mg/ml.

Les extraits des différentes parties d'*Ecballium elaterium* utilisée contre l'hémolyse induite par le triton X-100, n'ont montré aucun effet protecteur pour la membrane des globules rouges, car le triton est un détergent qui possède une structure chimique qui le rend plus accessible à la membrane des érythrocytes que les extraits. On constate que les composés bioactifs des extraits de la plante étudiée sont probablement incapables d'interagir avec les lipides de la bicouche lipidique pour prévenir l'hémolyse (**Preté et al., 2011**).

Conclusion

Les plantes restent toujours une source importante des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans cette étude nous avons essayé de tester les propriétés anti-hémolytiques d'*Ecballium elaterium*, une plante qui appartient à la famille des cucurbitacées et qui est utilisée en Algérie pour ses propriétés thérapeutiques.

L'extraction par macération dans un mélange hydro-alcoolique des différentes parties d'*Ecballium elaterium* nous a permis de récupérer quatre extraits avec des rendements variables, le taux le plus élevé était enregistré par l'extrait des feuilles avec 31,28%. La quantification des composés phénoliques dans ces extraits a révélé la présence des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins.

L'extrait du fruit était le plus riche en composé phénolique. Le taux des polyphénols totaux était de l'ordre de $2,66 \pm 0,04$ g EAG/ 100g MS, celui des flavonoïdes était de $4,84 \pm 0,08$ g EQ/100 g MS, et celui des tannins était $0,70 \pm 0,05$ g EAT /100 g MS. Il est suivi par les extraits des feuilles et des tiges. L'extrait de la racine était le plus pauvre en termes de composé phénoliques.

Les trois modèles hémolytiques utilisés dans cette étude, à savoir l'acide salicylique, le chlorure de sodium et le triton X100, se sont montrés très efficaces, puisqu'ils se sont avérés capables de provoquer des dommages au niveau de la membrane plasmique des globules rouges et induire des taux d'hémolyse presque total.

Les effets anti-hémolytiques des différents extraits d'*Ecballium elaterium* réalisés *ex vivo* sur les érythrocytes humains ont donné de bons résultats. Dans le cas de l'hémolyse induite par l'acide salicylique, c'est l'extrait des feuilles qui a donné le meilleur effet anti-hémolytique avec un $IC_{50} = 0.418$ mg/ml. Lorsque l'hémolyse a été induite par le chlorure de sodium, c'était l'extrait du fruit qui a donné la meilleure activité anti-hémolytique, puisque son IC_{50} était de l'ordre de 0.418 mg/ml. Enfin, lorsque l'inducteur de l'hémolyse était le triton X-100, les extraits testés n'ont révélé presque aucune activité anti-hémolytique.

Ces résultats restent cependant initiaux partiels, et d'autres travaux s'imposent tant au niveau chimique que pharmacologique. Il serait donc judicieux à l'avenir d'approfondir l'étude phytochimique de cette plante en essayant d'identifier et de purifier les composés phénoliques responsables de l'activité anti-hémolytique et de les tester *ex vivo* et *in vivo*.

- Abbassi, F., Ayari, B., Mhamdi, B., and Toumi, L.** (2014) Phenolic contents and antimicrobial activity of squirting cucumber (*Ecballium elaterium*) extracts against food-borne pathogens. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 27, 475-479.
- Agil, A., Miró, M., Jimenez, J., Aneiros, J., Caracuel, M.D., García-Granados, A., and Navarro, M.C.** (1999). Isolation of an anti-hepatotoxic principle from the juice of *Ecballium elaterium*. *Planta medica* 65, 673-675.
- Agrawal, K.N., Agrawal, D.K., Mishra, K.P.** (1991). Impact of anemia prophylaxis in pregnancy on maternal haemoglobin, serum ferritin et birthweight. *Indian Journal of Medicine Resources* 94, 277-280.
- Arbos, K.A., Claro, L.M., Borges, L., Santos, C.A., and Weffort-Santos, A.M.** (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research* 28, 457-463.
- Attard, E., and Cuschieri, A.** (2004). Cytotoxicity of Cucurbitacin E extracted from *Ecballium elaterium* in vitro. *Journal of Natural Remedies* 4, 137-144.
- Bachy, E., Houot, R., Dony, A.** (2015). Hématologie adulte et pédiatrique, Onco-Hématologie (Ellipses) 9,44-46.
- Benhemou, N., Bekkara, F.A., Panovska, T.K.** (2008). Antioxydant and antimicrobiens activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Africain journal of pharmacy and pharmacology* 2, 022-028.
- Bennick, A.** (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 13, 184-196.
- Bernard, S., Dubin, J., Madec, Y., and Le Cam, M.** (1966). Sur les variations de quelques activités enzymatiques dans le globule rouge humain, au cours de diverses circonstances physiologiques et pathologiques. *Clinica Chimica Acta* 14, 300-310.
- Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., and Saykova, I.** (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) 7, 35-45.
- Borochoy, H., Zahler, P., Wilbrandt, W., and Shinitzky, M.** (1977). The effect of phosphatidylcholine to sphingomyelin mole ratio on the dynamic properties of sheep erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 470, 382-388.
- Bravo, L.** (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* 56, 317-333.
- Chakraborty, D., and Shah, B.** (2011). Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betel leaf extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 192-199.

- Chekroun, E., Benariba, N., Adida, H., Bechiri, A., Azzi, R., and 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, 632-637.
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., and Lin, Y.** (1998). Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38, 421-64.
- Collin, S., and Crouzet, J.** (2011). Polyphénols et procédés: transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. (Lavoisier). 12,564-582.
- Cowan, M.M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12, 564-582.
- Denis, P.S.** (1830). Recherches expérimentales sur le sang humain, considéré à l'état sain. (Denis). 52,601-623.
- Dodge, J.T., Mitchell, C., and Hanahan, D.J.** (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 100, 119-130.
- Dudley, G.A., Staron, R.S., Murray, T.F., Hagerman, F.C., and Luginbuhl, A.** (1983). Muscle fiber composition and blood ammonia levels after intense exercise in humans. *Journal of applied physiology* 54, 582-586.
- Fahn, A., and Shimony, C.** (2001). Nectary structure and ultrastructure of unisexual flowers of *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. (Cucurbitaceae) and their presumptive pollinators. *Annals of Botany* 87, 27-33.
- Freitas, V.d.** (1995). Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. (Bordeaux 2). 48, 909-930.
- Gadri, R.B., Roth, J.R., Montie, T.C., Kelly-Wintenberg, K., Tsai, P.P.-Y., Helfritch, D.J., Feldman, P., Sherman, D.M., Karakaya, F., and Chen, Z.** (2000). Sterilization and plasma processing of room temperature surfaces with a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *Surface and Coatings Technology* 131, 528-541.
- Greige-Gerges, H., Khalil, R.A., Mansour, E.A., Magdalou, J., Chahine, R., and Ouaini, N.** (2007). Cucurbitacins from *Ecballium elaterium* juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. *Chemico-Biological Interactions* 169, 53-62.
- Gurpreet, M.D., Patricia, A., Cornett, M.D., Lawrence, M., Tierney, J.R., M.D.** (2004). Hemolytic Anemia. *American Family Physician* 69, 2599-2606.
- Hagerman, A.E., and Butler, L.G.** (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 26, 809-812.

- Houcher, B., Naimi, D., Kebir, N., Abbaoui, N., and Beggag, S.** (2001). EFFET DE L'ACIDE SALICYLIQUE SUR LA FRAGILITE OSMOTIQUE DES ERYTHROCYTES HUMAINS. *Sciences & Technologie A*, 69-72.
- Ismail, H.I., Chan, K.W., Mariod, A.A., and Ismail, M.** (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry* 119, 643-647.
- James, O., and Alewo, I.M.** (2014). In vitro antihemolytic activity of gymnema sylvestre extracts against hydrogen peroxide (H₂O₂) induced haemolysis in human erythrocytes. *Am. J. Phytomed. Clin. Ther* 2, 861-869.
- Jondal, M., Holm, G., and Wigzell, H.** (1972). Surface markers on human T and B lymphocytes: I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *Journal of Experimental Medicine* 136, 207-215.
- Kadali, V.N., Ramesh, T., Pola, S.R., Sandeep, B., and Divakar, T.** (2016). Evaluation of Anti hemolytic activity, antibacterial activity and phytochemical investigation of *Acalypha indica* methanolic leaf extract. *Evaluation* 1. 47, 3954-3962.
- Kloutsos, G., Balatsouras, D.G., Kaberos, A.C., Kandiloros, D., Ferekidis, E., and Economou, C.** (2001). Upper airway edema resulting from use of *Ecballium elaterium*. *The Laryngoscope* 111, 1652-1655.
- Kozlova, E.K., Chernysh, A.M., Moroz, V.V., and Kuzovlev, A.N.** (2013). Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron* 44, 218-227.
- Krätznner, R., Debreczeni, J.É., Pape, T., Schneider, T.R., Wentzel, A., Kolmar, H., Labie, D., and Elion, J.** (2005). Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC-Hématologie* 2, 220-239.
- Lamaison, J.C., and Carenet, A.** (1990). Contents in main flavonoid compounds of *Crataegus monogynajacq* and *Crataegus Laevigata* (Poiret) DC flowers at different development stages. *Pharmaceutica Acta Helvetica* 65, 315-320.
- Lapornik, B., Prošek, M., and Wondra, A.G.** (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering* 71, 214-222.
- Li, J., and Jiang, Y.** (2007). Litchi flavonoids: isolation, identification and biological activity. *Molecules* 12, 745-758.

- Lippi, G., Avanzini, P., Pavesi, F., Bardi, M., Ippolito, L., Aloe, R., and Favaloro, E.J.** (2011). Studies on in vitro hemolysis and utility of corrective formulas for reporting results on hemolyzed specimens. *Biochemia medica: Biochemia medica* 21, 297-305.
- Lourrard, Y., Haddi, R., and Harche, M.K.** (2016). Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale Haloxylon scoparium POMEL. *Journal of Bioresources Valorization* 1, 28.
- Lux, S.** (1983). Disorders of the red cell membrane skeleton: Hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. *Metabolic basis of inherited disease*/[edited by] John B. Stanbury. 1573-1605.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., and Jay-Allemand, C.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. (*PPUR presses polytechniques*).
- Magalhães, A.S., Silva, B.M., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., and Carvalho, M.** (2009). Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1372-1377.
- Maiworm, A.I., Presta, G.A., Santos-Filho, S.D., Paoli, S.d., Giani, T.S., Fonseca, A.S., and Bernardo-Filho, M.** (2008). Osmotic and morphological effects on red blood cell membrane: action of an aqueous extract of *Lantana camara*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 42-46.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727-747.
- Mayer, K., and Ley, A.B.** (1970) .Hemolysis of red cells due to sulfone . *Ann International Medecine* 72, 709-711.
- Middleton, E., Kandaswami, C., and Theoharides, T.C.** (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews* 52, 673-751.
- Miro, M.** (1995). Cucurbitacins and their pharmacological effects. *Phytotherapy research* 9, 159-168.
- Mohandas, N., and Chasis, J.** (1993). Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *In Seminars in hematology*, pp. 171-192.
- Moreira, L.L., Dias, T., Dias, L.G., Rogão, M., Da Silva, J.P., and Estevinho, L.M.** (2011). Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach. *Food and Chemical Toxicology* 49, 520-526.

- Morton, N., MacKinney, A., Kosower, N., Schilling, R., and Gray, M.P.** (1962). Genetics of spherocytosis. *American journal of human genetics* 14, 170.
- Muthu, S., and Duraira, B.** (2015). Inhibitory effect of hydroethanolic extracts of *Annona muricata* on human platelet aggregation and hemolysis in vitro. *Int J Pharm Pharm Res* 2, 207-213.
- Niknam, V., and Ebrahimzadeh, H.** (2002). Phenolics content in *Astragalus* species. *Pak. J. Bot* 34, 283-289.
- Okamura, H., Mimura, A., Yakou, Y., Niwano, M., and Takahara, Y.** (1993). Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33, 557-561.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., and Nunez, M.** (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry* 85, 267-273.
- Preté, P.S., Domingues, C.C., Meirelles, N.C., Malheiros, S.V., Goñi, F.M., de Paula, E., and Schreier, S.** (2011). Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction—A spin label study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1808, 164-170.
- Rother, R.P., Bell, L., Hillmen, P., and Gladwin, M.T.** (2005). The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama* 293, 1653-1662.
- Sanford, D.M., and Knodel, L.C.** (1986) Induction of hemolytic anemia by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Drug Internationall Clinic Pharmacological* 20, 925-934.
- Seeman, P., and Weinstein, J.** (1966). I. Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. *Biochemical Pharmacology* 15, 1737-1752.
- Shahidi, F., Janitha, P., and Wanasundara, P.** (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition* 32, 67-103.
- Sheldrick, G.M., and Uson, I.** (2005). Structure of *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II (EETI-II): a rigid molecular scaffold. *Acta Crystallographica Section D* 61, 1255-1262.
- Streichman, S., and Gescheidt, Y.** (1998). Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *American journal of hematology* 58, 206-212.

Thephinlap, C., Pangjit, K., Suttajit, M., and Srichairatanakool, S. (2013). Anti-oxidant properties and anti-hemolytic activity of *Psidium guajava*, *Pandanous odorus* and *Rhinacanthus nasutus*. *Journal of Medicinal Plants Research* 7, 2001-2009.

Valent, P., and Lechner, K. (2008). Diagnosis and treatment of autoimmune haemolytic anaemias in adults: a clinical review. *Wiener klinische Wochenschrift* 120, 136-151.

Wajcman, H. (2006). Déficits en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hématologie*, 13-006.

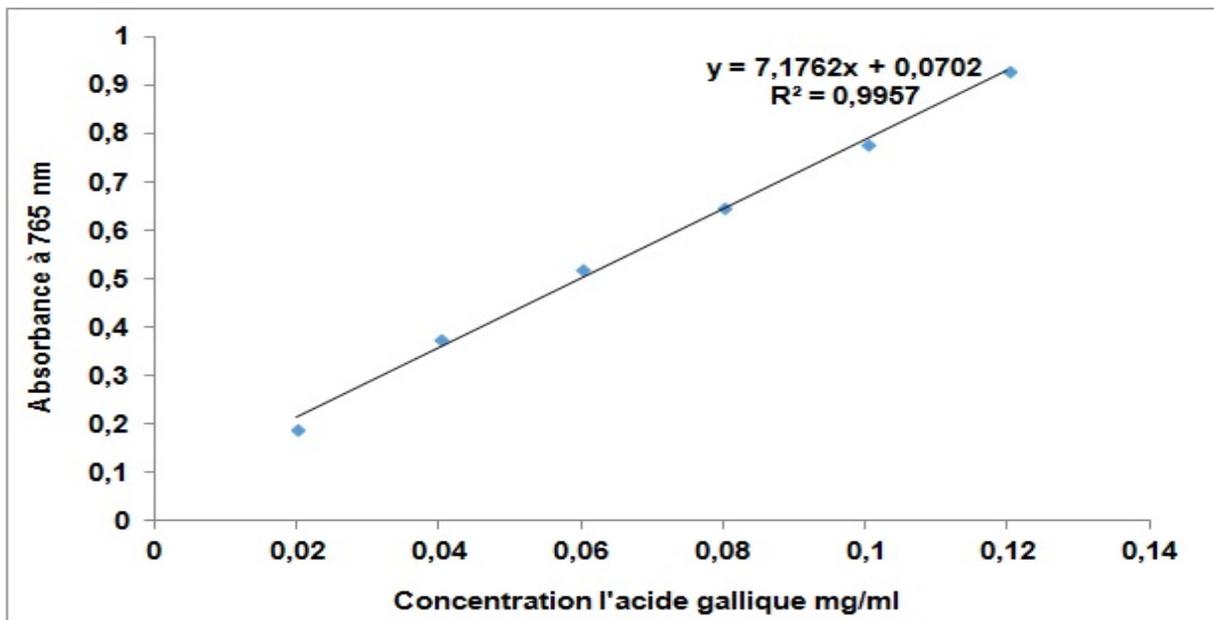
Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W., Chen, F.A. (2006). systematic survey of antioxydant activity of 30 chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxydant power assay. *food chemistry* 97,705-711.

Yuan, X., Wang, J., Yao, H., and Chen, F. (2005). Free radical-scavenging capacity and inhibitory activity on rat erythrocyte hemolysis of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber. *LWT-Food Science and Technology* 38, 877-883.

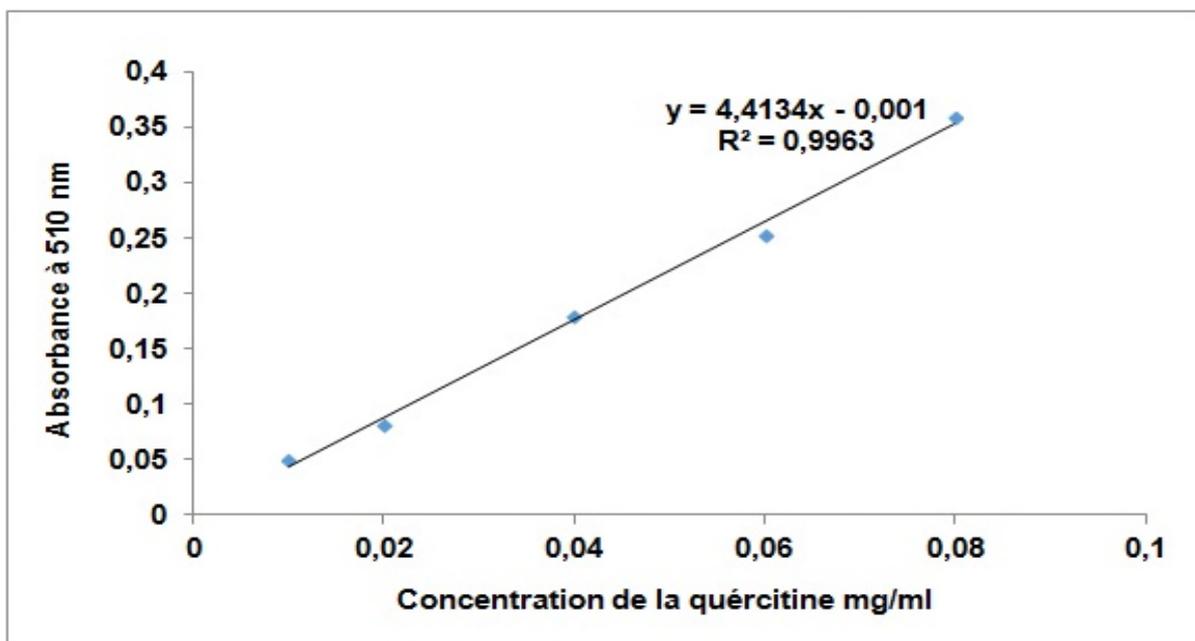
Annexe I : Matériel et réactif utilisés.

Appareillage	Produit chimique
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agitateur ▪ Bain marie ▪ Balance ▪ Broyeur électrique ▪ Centrifugeuse ▪ Distillateur ▪ Etuve ▪ Micropipette ▪ Ph mètre ▪ Spectrophotomètre ▪ Tamiseur électrique ▪ Barreaux magnétique ▪ Bécher ▪ Tube a essaie ▪ Tube à héparine 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acide gallique ▪ Quercitine ▪ Folin- Ciocalteu. ▪ Chlorure d'hydrogène (HCl) ▪ Ethanol ▪ Protéine Albumine de sérum bovin (BSA) ▪ Triéthanolamine (TEA) ▪ Sodium Dodecyl sulfate (SDS) ▪ Hydrogéno-phosphate de sodium (Na_2HPO_4) ▪ Phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4) ▪ Chlorure de sodium (NaCl) ▪ Eau distillée ▪ Carbonate de sodium (Na_2CO_3) ▪ Trichlorure d'Aluminium (AlCl_3) ▪ Acide salicylique ▪ Triton X-100 ▪ Diméthyle sulfoxide (DMSO)

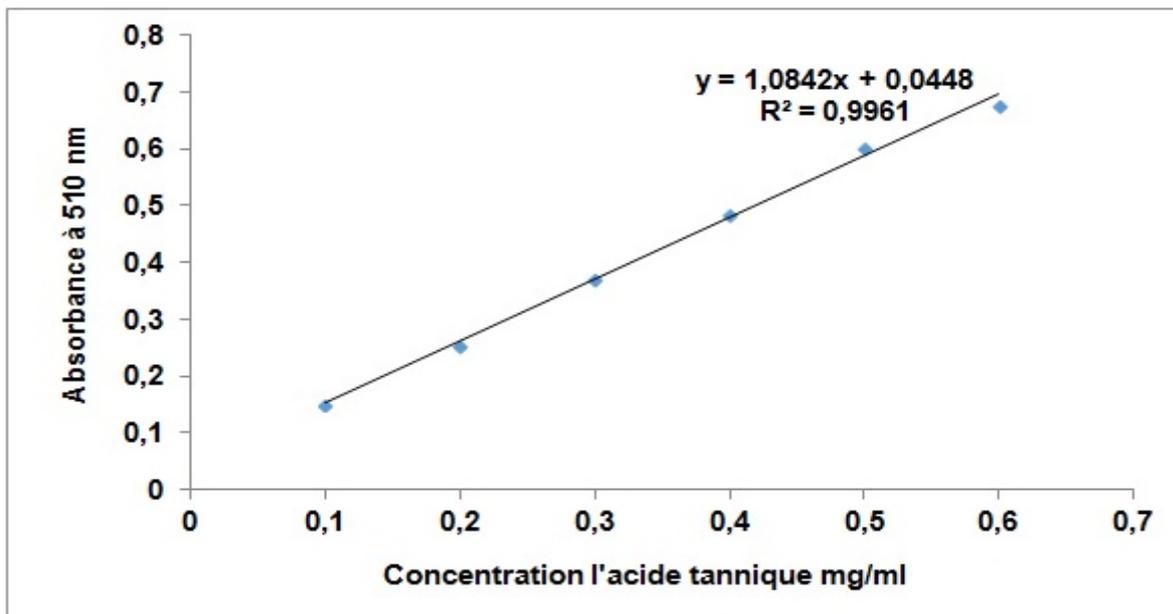
Annexe II : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux utilisant l'acide gallique comme standard.



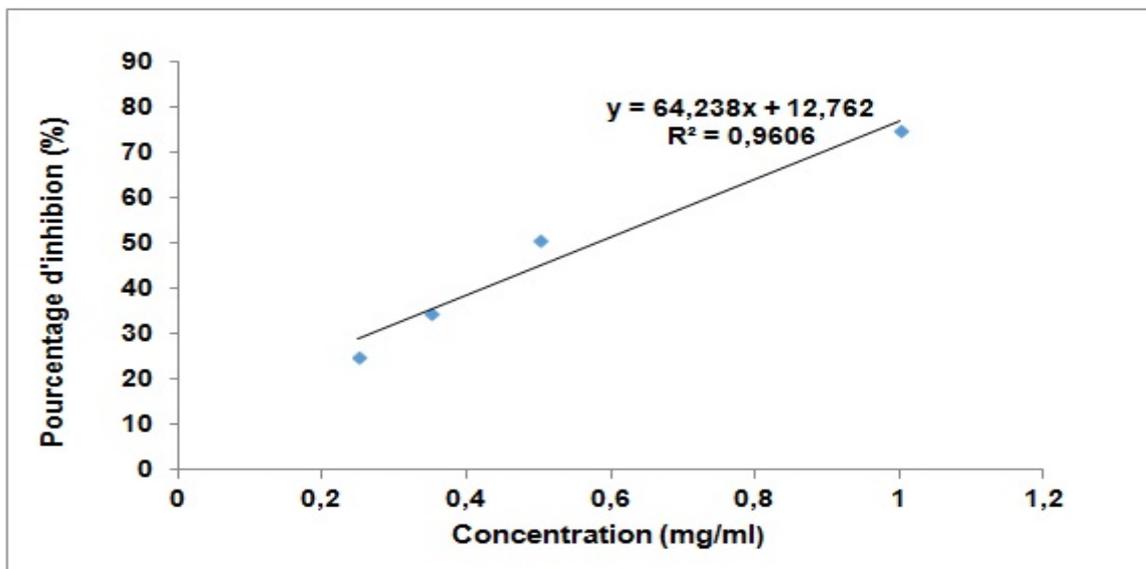
Annexe III : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes utilisant la quercétine comme standard.



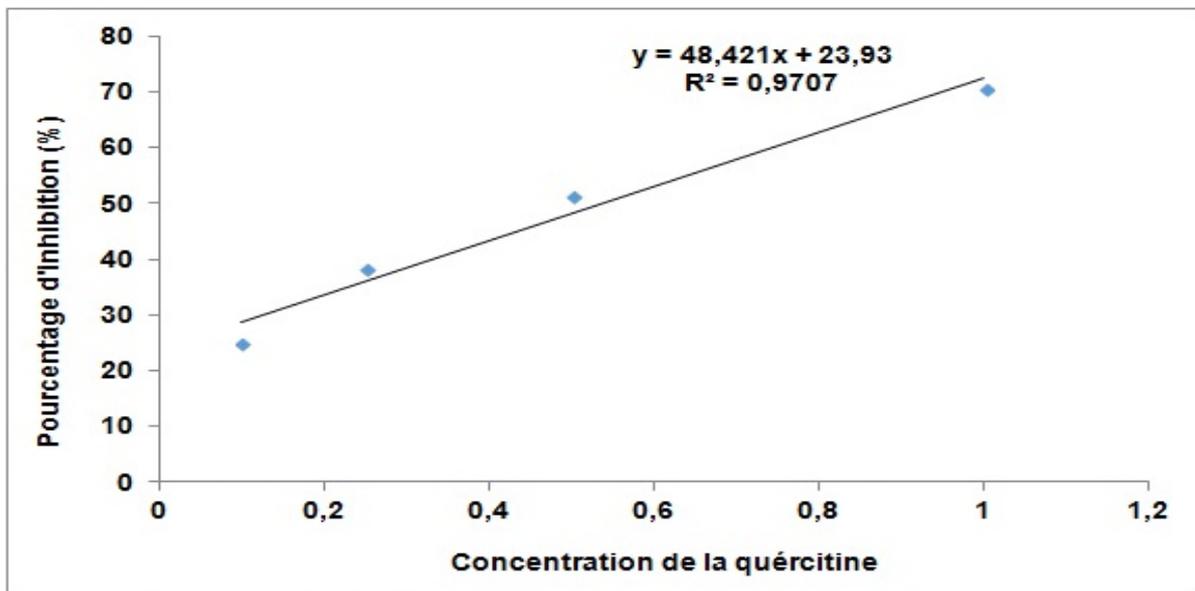
Annexe IV : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins utilisant l'acide tannique comme standard.



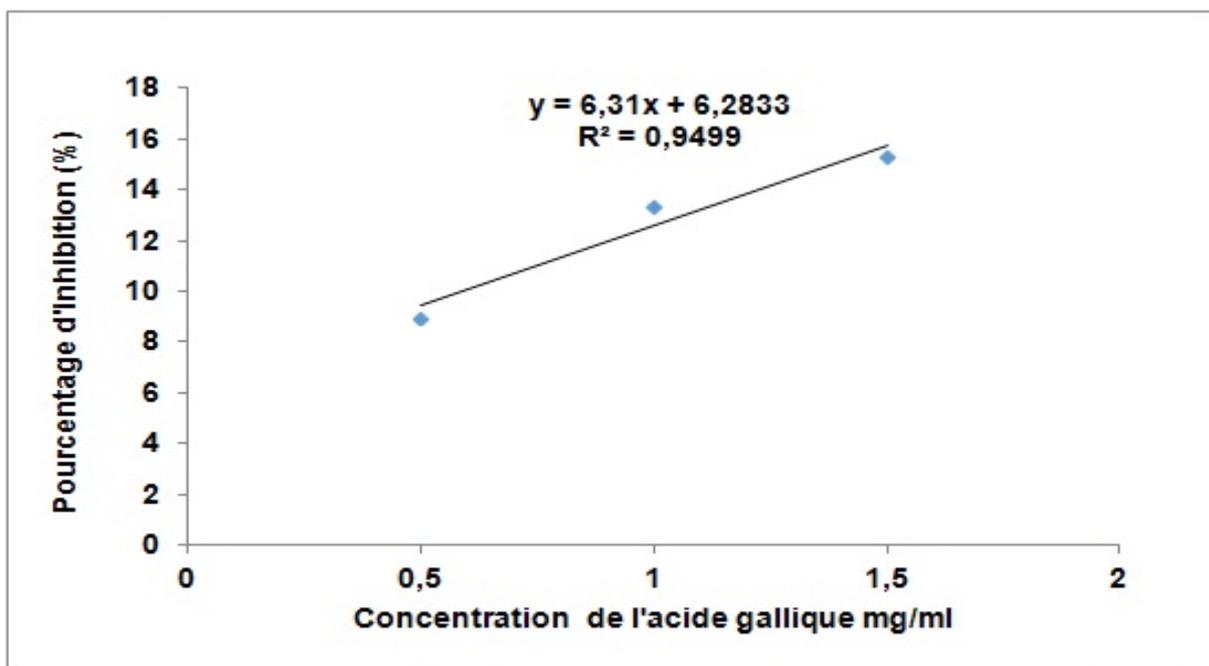
Annexe V : Pourcentage d'inhibition du standard (l'effet l'acide salicylique sur les érythrocytes incubés dans le milieu isotonique).



Annexe VI : Pourcentage d'inhibition de la quercitine en fonction de concentration dans l'hémolyse induite par le chlorure de sodium



Annexe VII : Pourcentage d'inhibition de l'acide gallique dans l'hémolyse induite par le Triton X-100.



Résumé

La plante *Ecballium elaterium* est connue pour son usage en médecine traditionnelle, ce travail a pour objectif de tester l'effet anti-hémolytique des différentes concentrations des extraits de différentes parties de cette plante contre l'hémolyse menée *in vitro* sur modèle membranaires des érythrocytes humains . D'une part, l'étude de contenus des extraits des différentes parties en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins ont été estimés par des dosages colorimétriques.les résultats démontre que l'extrait de fruit présente la teneur la plus élevée en composés phénolique. D'autre part, les testes d'induction d'hémolyse ont été réalisé à différentes concentrations par l'acide salicylique, le chlorure de sodium et du triton X-100, ses derniers ont la capacité de provoqué l'hémolyse des globules rouge. Cependant, les concentrations des différentes parties ont montré un effet protecteur contre l'hémolyse provoqué par l'acide salicylique et le chlorure de sodium, ces mêmes extraits n'ont enregistré aucun effet protecteur contre l'hémolyse induit par le triton X-100.

Mot clé : *Ecballium elaterium*, hémolyse, composés phénolique, Acide salicylique, Triton X-100, anti-hémolytique.

Abstract

The plant *Ecballium elaterium* is known for its use in traditional medicine, this work aims to test the anti-hemolytic effect of different concentrations of extracts of different parts of this plant against the hemolysis conducted in vitro membrane model human erythrocytes. On the one hand, the study of the contents of the extracts of the various parts in total polyphenols, flavonoids and tannins were estimated by colorimetric assays. The results show that the fruit extract has the highest content of phenolic compounds. On the other hand, the haemolysis induction tests were performed at different concentrations by salicylic acid, sodium chloride and triton X-100, the latter have the ability to cause hemolysis of red blood cells. However, the concentrations of the different parts showed a protective effect against salicylic acid and sodium chloride-induced hemolysis, and these same extracts showed no protective effect against triton X-100-induced hemolysis

Key word: *Ecballium elaterium*, hemolysis, phenolic compound, anti-haemolytic, Acid salicylic, Triton X-100.

ملخص

ومن المعروف أن نبات *Ecballium elaterium* لاستخدامها في الطب التقليدي، ويهدف هذا العمل إلى اختبار تأثير مضاد للانحلال تركيزات مختلفة من مقتطفات من أجزاء مختلفة من هذا النبات ضد انحلال الدم التي أجريت في المختبر على نموذج غشاء الكريات الحمراء الإنسان . أولاً، تضمنت الدراسة مقتطفات من مناطق مختلفة في إجمالي البوليفينول، قدرت مركبات الفلافونويد والعفص التي كتبها colorimétriques.les أظهرت فحوصات النتائج أن مستخلصات الفاكهة لديها أعلى نسبة عالية من المحتوى الفينولي المجمع. من ناحية أخرى، نفذت تحريض الخصيتين انحلال الدم من بتركيزات مختلفة من حمض الصفصاف، وكلوريد الصوديوم وتريتون X-100، تسببت قدرتها الأخيرة انحلال الدم من خلايا الدم الحمراء. ومع ذلك، فقد أظهرت تركيزات الأجزاء المختلفة لها تأثير وقائي ضد انحلال الدم الناجم عن حمض الصفصاف وكلوريد الصوديوم، وأظهرت هذه المقتطفات نفس ليس له تأثير وقائي ضد انحلال الدم الناجم عن تريتون X-100.

الكلمة الرئيسية: *Ecballium elaterium* ، انحلال الدم ، مركب الفينول ، حمض الصفصاف ، تريتون X-100 ، مضاد للدم.

