

## Résumé :

*Ecballium elaterium* (cucurbitacées), est une plante médicinale largement utilisée dans la médecine traditionnelle dans de nombreux pays, comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, et pour le traitement de la sinusite chronique. Ces vertus thérapeutiques sont principalement dues à la présence des métabolites secondaires comme des polyphénols dans la composition cette plante.

La partie aérienne d'*Ecballium elaterium*, en provenance de la région de Bordj Bou Arreridj (Algérie), a été utilisée pour l'extraction des polyphénols, dans le but d'en évaluer l'activité antioxydants, par la mesure de l'effet scavenger du radical DPPH et du pouvoir réducteur.

L'extrait éthanolique à 70% et acétonique à 70%, de la plante se sont avérés contenir une teneur moyenne en composés phénoliques, et que les extraits aqueux, éthanolique et acétonique en sont relativement pauvres.

Les résultats des activités antioxydants, ont montré que les polyphénols des extraits éthanolique à 70% et acétonique à 70%, avaient une bonne activité anti-radicalaire (en comparaison avec les autres extraits), avec un  $EC_{50}$  égale à 36,77 ; 32,55  $\mu\text{g/ml}$ , et un bon pouvoir réducteur, tandis que les extraits aqueux, éthanolique et acétonique n'ont donné qu'une très faible activité inhibitrice du radical et un pouvoir réducteur faible.

**Mots-clés:** *Ecballium elaterium*, Composés phénoliques, Flavonoïdes, Tannins, Activité antioxydants.

## Abstract:

*Ecballium elaterium* (cucurbitaceous) is a medicinal plant widely used in traditional medicine in many countries, as a laxative, anti-inflammatory, analgesic and for the treatment of chronic sinusitis. These therapeutic effects are mainly due to the presence of secondary metabolites such as polyphenols in the composition of the plant. The aerial part of *Ecballium elaterium*, cutted in the region of Bordj Bou Arreridj (Algeria), was used for the extraction of polyphenols, in order to evaluate the antioxidant activity by measuring the scavenging effect of the radical DPPH and the reducing power.

The ethanolic 70% and acetonic 70% extracts, of the plant proved to contain an average content of phenolic compounds, and the aqueous, ethanolic and acetonic extracts are relatively poor. The results of the antioxidants activities, showed that the polyphenols of ethanolic 70% and acetonic 70% extracts, had a good anti-radical activity (compared with the other extracts), with an  $EC_{50}$  equal to 36.77; 32.55  $\mu\text{g/ml}$ , and a good reducing power, while the aqueous, ethanolic and acetonic extracts gave only very low antiradical activities group and a low reducing power.

**Keywords:** *Ecballium elaterium*, phenolic compounds, flavonoids, tannins, antioxidant activity.

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**Université Abderrahmane Mira-Bejaia**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-chimique

# Mémoire de Master

Filière : Biologie

Option: Pharmacologie Moléculaire

## Thème

**Activités antioxydants des extraits  
d'une plante médicinale : *Ecballium  
elaterium***

**Présenté par:**

M<sup>elle</sup> OUCHENI Mouna

**Membre de Jury:**

Présidente : M<sup>me</sup> Oukil N.

Promotrice : M<sup>me</sup> Bedjou F.

Examineur : M<sup>r</sup> Harfi TS.

Examineur : M<sup>me</sup> Saadaoui K.

**Grade:**

MCB

Professeur

MAA

MAA

Année : 2013/2014



# Remerciements

Tout d'abord, nous exprimons nos remerciements au bon dieu de nous avoir donné le courage et la force pour terminer notre travail et pour sa bienveillance.

Profonde gratitude va à notre promotrice, D<sup>r</sup> Bedjou F. pour ses précieux conseils, ses orientations, son aide et nous lui souhaitons la réussite dans ses projets.

Nos remerciements s'adressent également à notre Co-promotrice, M<sup>elle</sup> Bourebaba L. pour nous avoir guidés de la meilleure façon qui soit.

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements à la présidente de jury M<sup>me</sup> Oukil N. pour nous avoir consacré de son temps en nous faisant l'honneur d'accepter de présider le jury.

Nous remercions également les examinateurs, M<sup>r</sup> Harfi T. et M<sup>me</sup> Saadaoui K. pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.

Enfin nos remerciements s'adressent plus particulièrement à nos familles et nos amis(es) qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tous au long des années.

# *D*édicaces

*Je rends grâce, à mon dieu de m'avoir donné la force, la volonté, l'intelligence et la sagesse d'être patiente dans mes études.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A Mes parents, symboles de courage et de volonté, qui ont consacré et sacrifié leurs vies pour mon bien être ;*

*A mon cher mari : Achour pour sa patience*

*A Mes chers frères : laïd et Karim*

*A Mes chères sœurs : Noïra, Farïda, Habïba et Karïma*

*A ma belle-famille, sans oublier mes tantes, mes cousins et cousines*

*A tous ceux qui me sont chers*

*Mouna*



## *Liste des abréviations*

**ABTS<sup>•+</sup>** : acide 2,2' -azinobis (3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

**ADN**: Acide désoxyribonucléique

**AGPI**: Acide Gras Polyinsaturés

**Al Cl<sub>3</sub>**: Chlorure d'aluminium

**BHA**: Butyl hydroxyl anizol

**Cuc**: Cucurbitacines

**DL<sub>50</sub>**: Dose létale 50

**DPPH**: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**E. Acét.** : Extrait acétonique

**E. EtOH**: Extrait éthanolique

**EC50**: Concentration efficace à 50%

**ERO** : espèce réactive oxygénée

**Fe<sup>+2</sup>**: Fer ferreux

**Fe<sup>+3</sup>**: Fer ferrique

**FeCl<sub>3</sub>**: Chlorure ferrique

**FRAP**: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter

**GPS**: Geographies position

**GPx**: Glutathion peroxydase

**H<sub>3</sub>P W<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : acide phosphotungstique

**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : acide phosphomolybdique

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde d'hydrogène

**H<sub>2</sub>O (d)**: eau distillé

**HCl**: Chlorure d'hydrogène

**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>**: Ferricyanure de potassium

**NO<sup>•</sup>**: monoxyde d'azote

**O<sub>2</sub>**: Oxygène

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**: superoxide

**OH<sup>•</sup>**: radical hydroxyle

**RL**: Radical libre

**ROS**: Reactive Oxygen Species

**SOD**: Superoxyde dismutase

**TCA**: Acide trichloroacétique

**TEAC**: Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

## *Liste des figures*

<b>Figure n°1:</b> illustration d' <i>Ecballium elaterium</i> (A : Feuille; B: Fleurs ; C : fruit).....	4
<b>Figure n°2:</b> Structure de base des cucurbitanes .....	6
<b>Figure n°3:</b> Structure chimique des cucurbitacines les plus abondantes .....	7
<b>Figure n°4:</b> Balance radicaux libres /antioxydants .....	11
<b>Figure n°5:</b> Structure de la vitamine E.....	16
<b>Figure n°6:</b> Structure de la vitamine C : acide L- ascorbique.....	16
<b>Figure n°7:</b> Activité principale des polyphénols: le piégeage de radicaux libres .....	17
<b>Figure n°8:</b> Photographie de la partie aérienne d' <i>Ecballium elaterium</i> .....	18
<b>Figure n°9:</b> protocole d'extraction des composés phénoliques.....	19
<b>Figure n°10:</b> Protocole de dosage des composés phénoliques.....	21
<b>Figure n°11:</b> Procédure de dosage des flavonoïdes totaux .....	22
<b>Figure n°12:</b> Procédure de dosage des tannins condensés .....	23
<b>Figure n°13:</b> Protocole d'étude de l'activité « scavenging » du DPPH.....	24
<b>Figure n°14:</b> Protocole d'étude de l'activité antioxydant par l'ABTS <sup>+</sup> .....	26
<b>Figure n°15:</b> Protocole d'étude du pouvoir réducteur.....	28
<b>Figure n°16:</b> Représentation graphique du taux de composés phénoliques des extraits d' <i>Ecballium elaterium</i> .....	31
<b>Figure n°17:</b> Représentation graphique du taux de flavonoïdes des extraits d' <i>Ecballium</i> <i>elaterium</i> .....	32
<b>Figure n°18:</b> Teneurs en tanins pour les cinq extraits d' <i>Ecballium elaterium</i> .....	33

<b>Figure n°19:</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les cinq extraits d' <i>Ecballium elaterium</i> .....	35
<b>Figure n°20:</b> Activité scavenging du DPPH des antioxydants de référence.....	35
<b>Figure n°21:</b> pourcentage d'inhibition d'ABTS des extraits d' <i>Ecballium elaterium</i> . ....	38
<b>Figure n° 22:</b> Pouvoir réducteur des extraits d' <i>Ecballium elaterium</i> .....	40
<b>Figure n° 23:</b> Pouvoir réducteur des antioxydants de synthèse (BHA et acide ascorbique)...	41

## *Liste des tableaux*

<b>Tableaux I:</b> Classification taxonomique d' <i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.....	5
<b>Tableau II:</b> Les concentrations de sucres, lipides, et minéraux dans le jus de fruit d' <i>Ecballium elaterium</i> .....	8
<b>Tableau n° III:</b> Les rendements en extraits obtenus les différents solvants utilisés.....	29
<b>Tableau n° IV:</b> valeurs des EC <sub>50</sub> obtenues pour les extraits d' <i>Ecballium elaterium</i> .....	37
<b>Tableau n° V:</b> valeurs des TEAC obtenues pour les extraits d' <i>Ecballium elaterium</i> .....	39

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

Synthèse bibliographique

## *Chapitre I : Matière végétal*

I. présentation des cucurbitacées .....	3
II. <i>Ecballium elaterium</i> .....	3
I.1. Description botanique.....	3
I.2. position systématique.....	5
I.3. Composition phytochimique.....	5
I.4. Utilisation traditionnelles.....	8
I.5. Activités biologiques des cucurbitacines.....	9

## *Chapitre II : Radicaux libres et Antioxydants*

I. Les radicaux libres .....	10
I.1. Définition .....	10
I.2. Production des radicaux libres .....	10
I.3. Le stress oxydant.....	10
I.4. Les lésions cellulaires associées aux radicaux libres.....	11
I.5. Implications pathologiques du stress oxydatif.....	12
II. les antioxydants .....	12
II.1. Définition.....	12
II.2. Propriété.....	13
II.3. Les différents types d'antioxydants.....	13
II.3.1. Antioxydants naturels .....	13
a) Les systèmes enzymatiques.....	13
b) Les antioxydants non enzymatiques .....	15

---

*Partie expérimentale**Matériel et méthodes*

I. Préparation du matériel végétal .....	18
I.1. Récolte et identification de la plante.....	18
I.2. Séchage, broyage et tamisage .....	18
II. Méthodes .....	19
II.1. Extraction des composés phénoliques .....	19
a) Principe.....	19
b) Mode opératoire .....	19
c) Calcul du rendement.....	20
II.2. Dosage des composés phénoliques.....	20
II.2.1. Polyphénols totaux .....	20
a) Principe.....	20
b) Mode opératoire .....	20
c) Expression des résultats .....	21
II.2.2. flavonoïdes.....	21
a) Principe.....	21
b) Mode opératoire .....	22
c) Expression des résultats .....	22
II.2.3. tannins condensés .....	22
a) Principe.....	22
b) Mode opératoire .....	23
c) Expression des résultats .....	23
II.3. Evaluation de l'activité antioxydants .....	23
II.3.1. Effet « scavenging » du radical DPPH .....	24
a) Principe.....	24
b) Mode opératoire .....	24
c) Expression des résultats .....	25
II.3.2. Evaluation de l'activité antioxydant par l'ABTS <sup>+</sup> .....	25
a) Principe.....	25
b) Mode opératoire .....	26

---

c) Expression des résultats .....	26
II.3.3. Pouvoir réducteur .....	27
a) Principe .....	27
b) Mode opératoire .....	27
c) Expression des résultats .....	28

### *Résultats et discussion*

I. Taux d'extraction des composés phénoliques totaux.....	29
II. Dosage des composés phénoliques.....	30
II.1. Polyphénols totaux .....	30
II.2. flavonoïdes.....	32
II.3. Tannins condensés.....	33
III. Activités antioxydants .....	34
III.1. Activité scavenging du DPPH.....	34
- Détermination de l'EC <sub>50</sub> (Concentration efficace à 50%) .....	37
III.2. Evaluation de l'activité antioxydants par l'ABTS <sup>+</sup> .....	38
- Calcule du TEAC.....	39
III.3. Pouvoir réducteur .....	40
Conclusion et perspectives .....	43
Références bibliographiques	

***Synthèse***  
***bibliographique***

# ***Introduction***

Les plantes sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives. Elles représentent une source de revenu non négligeable pour de nombreuses populations (**Kultur, 2007 ; Bouzid., et al., 2011**).

Pendant longtemps, le traitement avec les plantes médicinales était la seule ressource disponible pour de nombreux groupes ethniques, et de nos jours, des plantes sont encore employées dans la médecine traditionnelle pour traiter, alléger ou empêcher beaucoup de maladies (**Gassita, 1995 ; Mpondo., et al., 2012 ; Sargin., et al., 2013**).

Actuellement, la communauté scientifique, biologiste et chimiste, met en évidence le rôle tragique du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides et des denrées alimentaires. Quel que soit le cas, le risque est aggravé avec la production de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides (**Pasquier, 1995**).

Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes) (**Barouki, 2006**).

Il semble donc important de tester la potentielle thérapeutique des molécules antioxydants naturelles ou de synthèse, qui peuvent agir dans la prévention des maladies (**Favier, 2006**).

*Ecballium elaterium* est une plante sauvage appartenant à la famille des cucurbitacées, trouvé abondamment dans les régions méditerranéennes. Elle a été employée pour le traitement de diverses maladies par les populations du bassin méditerranéen (**Christodoulakis., et al., 2011**).

Cette espèce est l'une des plantes, les plus souvent utilisées dans la médecine populaire de nombreux pays pour ses effets anti-inflammatoire, analgésique et le traitement de la sinusite chronique. D'autres utilisations traditionnelles incluent le traitement de la fièvre, du cancer, de la constipation, et des maladies rhumatismales (**Polat et Satil, 2012**).

La présente étude a été consacrée à l'évaluation in vitro de l'activité antioxydants de différents extraits d'*Ecballium elaterium* d'Algérie.

Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Extraction des polyphénols de la plante.
- Dosage des composés phénoliques totaux à partir de différents extraits de la plante.
- Evaluation de l'effet anti-radicalaire de ces extraits en utilisant un radical synthétique (DPPH) et un radical cation ABTS<sup>•+</sup>.
- Evaluation de l'effet réducteur de ces mêmes extraits en utilisant le système FRAP.

# ***Chapitre I***

## ***Matériel végétal***

## I. Présentation des cucurbitacées

La famille des Cucurbitacées comprend environ 800 espèces réparties en 120 genres (**Kocyan et al., 2007**). Ce sont principalement des plantes tropicales que l'on peut trouver sur tous les continents, en particulier en Afrique et en Amérique latine. Il existe cependant des représentants sauvages en Europe (**Couplan, 1998**).

Ces plantes sont herbacées (parfois des arbustes) plus ou moins rampantes grâce au développement de vrilles spiralées. Portant des feuilles lobées, molles et velues. Les petites fleurs jaunes donnent des fruits charnus, très aqueux, de goût caractéristique.

Cette famille de plantes rampantes ou grimpantes fournit à l'homme les concombres, cornichons, courges, courgettes, gourdes, melons, pastèques et potirons (**Couplan, 2009**).

Il existe de nombreux types de cucurbitacées, variant par leur forme (longue ou bien courte et renflée) et leur couleur, qui peut être verte, claire ou foncée, jaune ou blanche. Certains concombres sont plus ou moins épineux, d'autres ressemblent à de gros citrons mais les plus courants sont longs et vert foncé, avec une chair blanche teintée de vert.

Nous pouvons également citer quelques genres dont les fruits sont plus connus : *Citrullus* (melon d'eau ou pastèque), *Cucumeropsis* (melon blanc d'hiver), *Cucumis* (cantaloup), *Cucurbita* (potiron), *Lagenaria* (gourde ou calabasse), et aussi *Telfairia* (citrouille cannelée) (**Aubaile-Sallenave, 2001**).

## II. *Ecballium elaterium*

### II.1. Description botanique

*Ecballium elaterium* (Figure n°1) est une plante médicinale sauvage limitée au bassin méditerranéen et cultivée en Europe centrale et en Angleterre (**Ben-Yakir et al., 1996; Attard et Scicluna-Spiteri, 2001; Toker et al., 2003**).



A (Salhab, 2013)

B (Dibos, 2010)



C (Darweesh et al., 2012)

**Figure n°1:** Illustrations d'*Ecballium elaterium* (A : Feuille; B: Fleurs ; C : fruit).

*Ecballium elaterium* également connue sous le nom de concombre d'âne (**Attard et Scicluna-Spiteri, 2001**), est une plante vivace, hérissée de poils raides, à tiges épaisses, couchées, sans vrilles, de 30 à 100 cm de longueur, portant des feuilles épaisses, triangulaires en cœur, sinueuses-dentées, épineuses et blanchâtres en dessous. Les fleurs jaunâtres, sont veinées de vert, et ont une longueur de 16 à 20 mm, la période de leur floraison s'étale d'avril à décembre avec un pic entre mai et août. Le fruit est ovoïde, charnu, hérissé, verdâtre, approximativement de 4 cm de longueur (**Adwan et al., 2011**).

## II.2. Position systématique

La systématique d'*Ecballium elaterium* est représentée dans le tableau I.

**Tableaux I:** Classification taxonomique d'*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich (Jaradat et al., 2012).

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	végétale
Super division	Spermatophyte
Division	Magnoliophyte
classe	Magnoliopsidea
Ordre	Violales
Famille	Cucurbitacées
Genre	<i>Ecballium</i> A. Rich
Espèce	<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich

## II.3. Composition phytochimique

Le composant majoritaire d'*Ecballium elaterium* est l'elaterine.

Les elaterines sont maintenant connus sous le nom de cucurbitacines mais désignées généralement dans beaucoup d'articles, plus anciens, comme elaterine et de temps en temps sous le nom de momordicine (Bar-Nun, 1990 ; Attard, 2008 ; Jaradat et al., 2012;).

Les cucurbitacines sont des substances naturelles extraites des plantes médicinales, plus principalement de la famille des Cucurbitacées. Ce sont des stérols naturels triterpéniques tétracycliques riches en oxygène. Leur structure de base est composée du squelette d'un noyau cucurbitane tétracyclique, le 19-24 (10→9β)-abeo-10α-lanost-5-ène

aussi connu sous le nom de 9 $\beta$ -méthyl-19-norlanosta-5-ène (Figure n°2) (Hylands et Oskoui, 1979).

Ces substances représentent les composés pharmacologique très actifs, généralement toxiques pour les cellules des mammifères ils sont également responsables du goût amer des fruits des cucurbitacées (Bruneton, 1999).

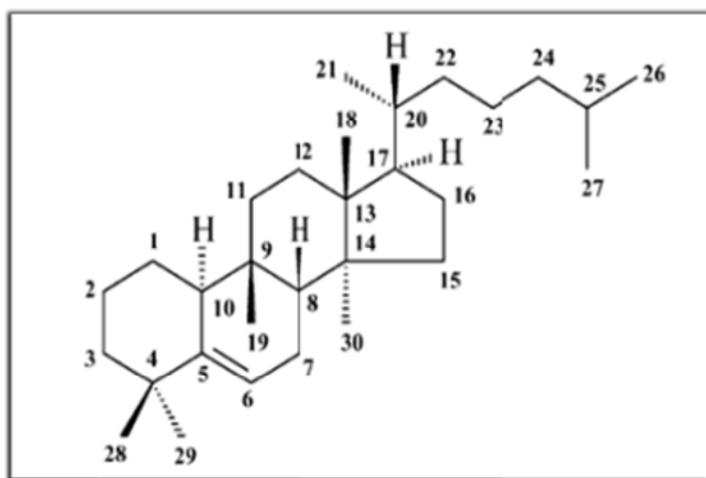
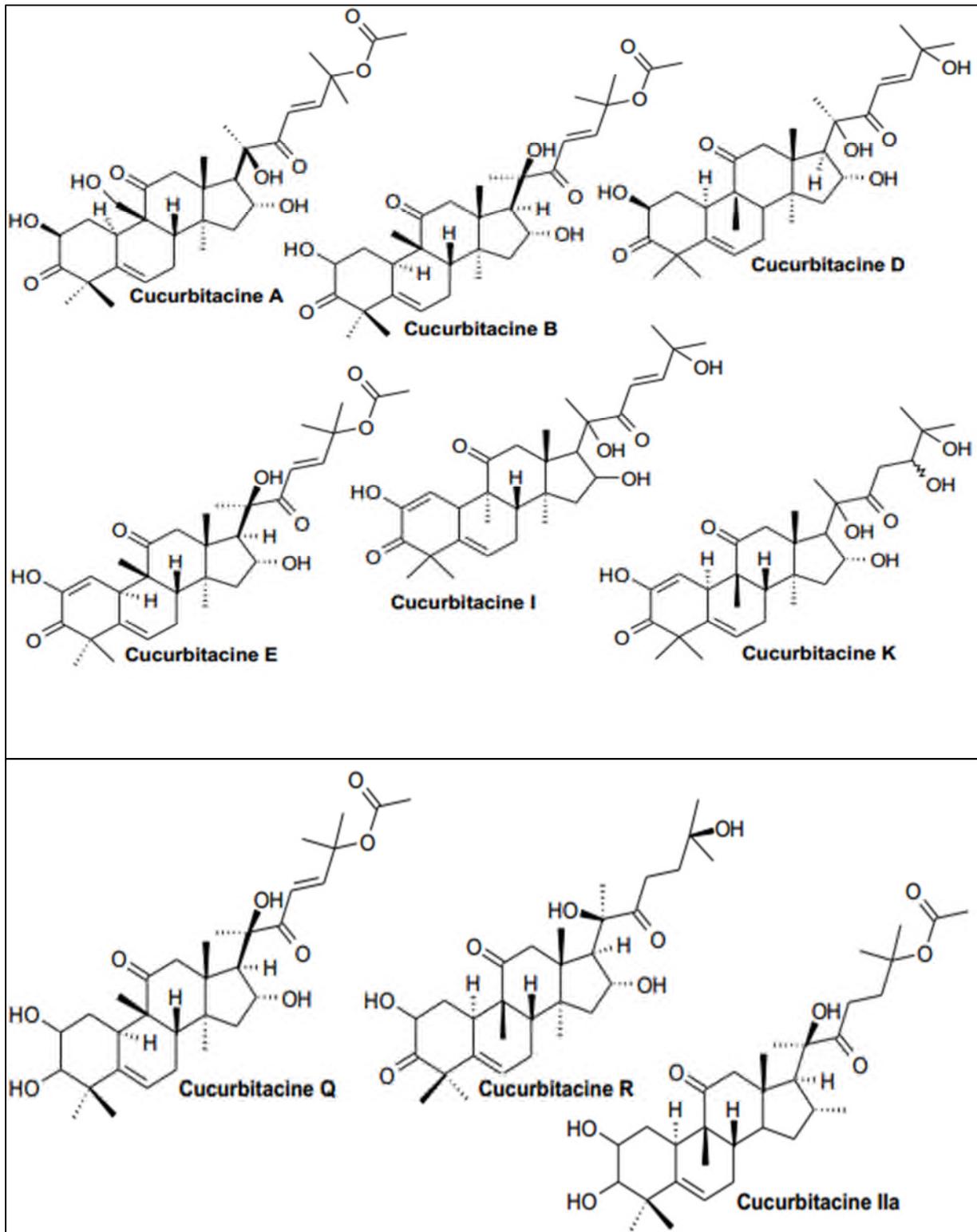


Figure n°2: Structure de base des cucurbitanes (Darweesh, 2012)

Selon les différentes familles, ces substances sont localisées dans les racines, les rhizomes, les fruits ou les graines de la plante. A l'exception des dérivés glycosidiques des cucurbitacines, ces substances présentent un goût très amer qui permet de protéger les plantes des herbivores (Abbas, 2012).

Les Cucurbitacines (Cuc) B, D, E, I, L, et ses dérivés tels que le glycosyl-cucurbitacine sont parmi les cucurbitacines les plus abondantes chez *Ecballium elaterium* (environ 30%) lui conférant plusieurs activités biologiques (Figure n°3) (Greige-Gerges et al., 2007; Darweesh et al., 2012).



**Figure n°3:** Structure chimique des cucurbitacines les plus abondantes

En plus des triterpénoïdes, *Ecballium elaterium* possède également d'autres constituants, avec principalement :

Des hydrates de carbone, des gommes, des leucoanthocyanines, des tannins et des peptides (Gaboriaud et al., 1989 ; Attard et al., 2005 ; Kraitzner et al., 2005 ; Attard, 2008 ; Sommerhoff et al., 2010).

L'intérieur des fruits contient un liquide connu sous le nom de jus d'*Ecballium elaterium*. Celui-ci contient plusieurs ingrédients bioactifs, dont les plus communs sont des cucurbitacines A, E, D, I. Ces composés tétracycliques sont d'intérêt médicinal en raison de leur activité cytotoxique et antitumorale (Salhab, 2013).

Le jus contient aussi des protéines, lipides, sucres, et minéraux (Favel et al., 1998).

Le tableau II nous donne les concentrations des différents composés retrouvés dans le jus.

**Tableau II:** Concentrations en sucres, lipides, et minéraux du jus de fruit d'*Ecballium elaterium* (Greige-Gerges et al., 2007).

Composées	Concentration (g/l)
Sucres	6.32
Protéines	1.04
Lipides	3
Minéraux	3.8

#### II.4. Utilisation traditionnelle

*Ecballium elaterium* est utilisée pour le traitement de diverses affections telles que les constipations, le rhumatisme et l'ictère ainsi qu'en tant qu'émétique (Attard, 2008 ; Toker, et al., 2003).

Traditionnellement le jus de ce fruit est utilisé en tant qu'anti-inflammatoire, analgésique, pour le traitement de la sinusite chronique, de la fièvre, de l'hypertension, et de la cirrhose du foie (Donald et al., 2008).

# ***Chapitre II***

## ***Radicaux libres et antioxydants***

## I. Les radicaux libres

### I.1. Définition

Un radical libre est un atome ou une molécule possédant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) (appelé aussi électron célibataire) sur sa couche externe. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules une grande instabilité.

Les radicaux libres les plus courants sont le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ), le radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ) et le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ) (Benbrook, 2005).

### I.2. Production des radicaux libres

Les espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS) (Pincemail et al., 2003).

### I.3. Le stress oxydant

Dans certaines situations, la production d'ERO augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces espèces (Costantino et al., 2011).

En 1991, Sies a défini aussi la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié soit à une production accrue d'EOA soit à une diminution de la capacité de défense antioxydant.

De nombreux facteurs sont à l'origine de ce déséquilibre, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée du tabac et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la production des radicaux libres dans notre organisme (Curtay et Robin, 2000). Enfin, Une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant (Pincemail et al., 2008).

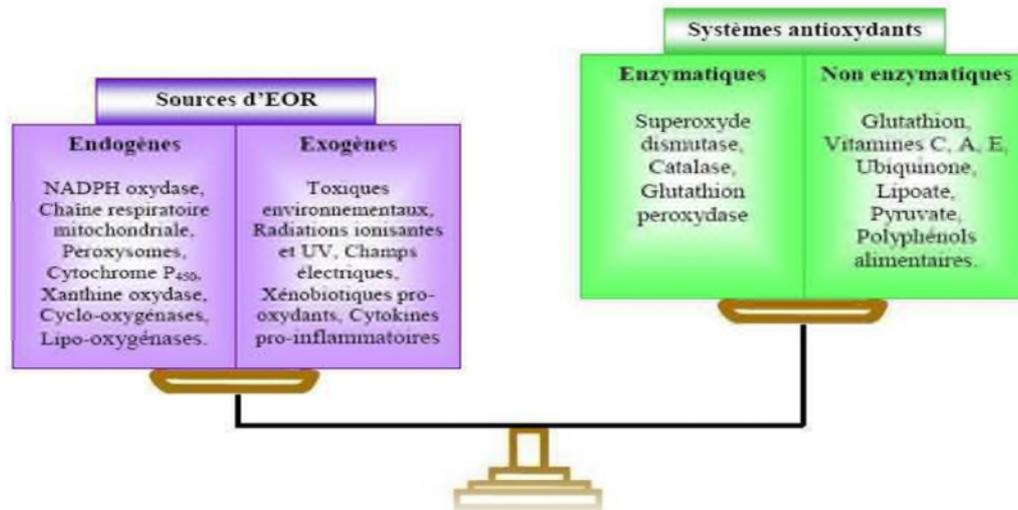


Figure n°4: Balance radicaux libres /antioxydants (Pincemail et al., 2008).

#### I.4. Les lésions cellulaires associées aux radicaux libres

Les radicaux libres sont instables et cherchent à s'apparier avec un électron d'une autre molécule. Ils sont à l'origine de réactions en chaîne qui conduisent à des destructions cellulaires. Leurs cibles essentielles sont l'ADN, les membranes cellulaires mais aussi toutes les molécules pouvant être déstabilisées (Pincemail et al., 1999; Camara et al., 2006).

Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés et donc altérer la structure des protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées (Pincemail et al., 1999). Elles peuvent aussi agir sur le glucose et générer des intermédiaires réactifs.

Les radicaux libres peuvent attaquer les lipides et notamment les acides gras mono- et polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires (principaux constituants des membranes des cellules). Ils sont à l'origine de réactions de peroxydation (Pelli et Marika, 2003).

Cette réaction est à l'origine de la formation d'hydroperoxydes lipidiques. Ceux-ci s'accumulant dans la membrane, entraînent la diminution de sa fluidité et de sa perméabilité.

Sa fonction étant complètement perturbée, la membrane se désorganise. Si les dégâts sont trop importants, les peroxydes peuvent conduire à la mort de la cellule (Galan et al., 1994).

Les peroxydes lipidiques peuvent aussi réagir avec d'autres composés cellulaires et être à l'origine de molécules très toxiques. Ils peuvent réagir ainsi avec l'ADN et peuvent mener à des modifications des bases azotées, à la fragmentation de l'ADN, à des ruptures de brins ou à des pontages entre des bases et être à l'origine de substances mutagènes (**Defraigne et Pincemail, 2007**).

### **I.5. Implications pathologiques du stress oxydatif**

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications (**Haleng et al., 2007**). La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux. Le stress oxydant est également un facteur potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies neuro-dégénératives et la pathogenèse des infections virales. Les radicaux libres peuvent s'attaquer aux cellules du système immunitaire et donc altérer les réactions de défenses de l'organisme. Ils peuvent léser des neurones et entraîner leur mort.

Vu la diversité et la gravité des maladies qu'induit le stress oxydant, plusieurs équipes de chercheurs se sont investis dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre les radicaux libres et les pathologies qui y sont associées (**Galan et al., 1994 ; Bidié et al., 2011**).

## **II. Les antioxydants**

### **II.1. Définition**

Les antioxydants sont définis par **Halliwell (1994)**, comme « toute substance qui a faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ».

Dans l'organisme, les antioxydants peuvent être de nature endogène (enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme) ou exogène c'est-à-dire alimentaire. Ces systèmes antioxydants interviennent en protégeant les cellules des dommages oxydatifs induits par les radicaux libres (**Pastre et Priymenko, 2007**)

D'après **Halliwell (1994)**, les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- (i) Le piégeage direct des ROS.
- (ii) L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS.
- (iii) La protection des systèmes de défense antioxydants.

## **II.2. Propriétés**

D'un point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur : il va donc pouvoir réagir avec un oxydant pour le réduire. Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux libres si dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé. Ainsi, les antioxydants présents dans les aliments protègent les molécules organiques, par exemple les lipides ou l'ADN, de l'oxydation et semblent jouer un rôle protecteur contre la cancérogenèse (**Goudable et Favier, 1997**).

## **II.3. Les différents types d'antioxydants**

### **II.3.1. Antioxydants naturels**

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types: les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (**Diplock, 1991**).

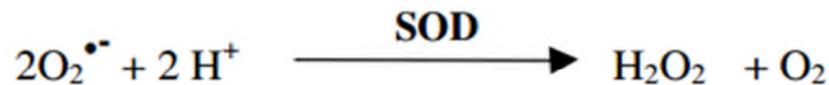
#### **a) Les systèmes enzymatiques**

Cette ligne de défense est constituée principalement de trois enzymes. Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de la glutathion peroxydase (GPx).

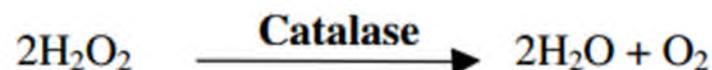
Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

✓ **La superoxyde dismutase**

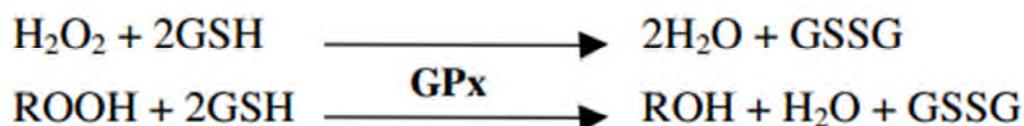
Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD), qui existe sous différentes formes, est une enzyme qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :

✓ **La catalase**

Elle est localisée surtout dans les peroxysomes. Son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :

✓ **Les glutathion peroxydase et réductase**

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) (**Marfak, 2003**):



La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH :



Cette réaction produit du  $\text{NADP}^+$  qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, la G6PD (glucose-6-phosphate-déhydrogénase) :



### b) Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, les vitamines E et C et les polyphénols (Valko *et al.*, 2007).

#### ✓ La vitamine E

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature: les  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -tocophérols et tocotriénols (figure n°6) (Valko *et al.*, 2007). Elle intervient directement au niveau des membranes biologiques où elle piège les radicaux libres avant qu'ils n'atteignent leurs cibles.

La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Evans, 2002; Packer *et al.*, 1997).

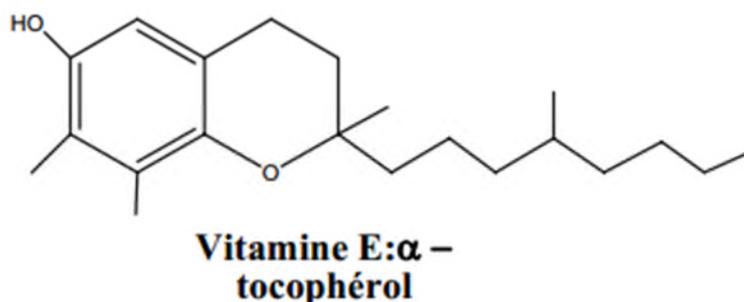


Figure n°5: Structure de la vitamine E

#### ✓ La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur (Curtay *et Robin*, 2000). Elle se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire; elle peut capter



***Partie***  
***expérimentale***

***Matériel***

***&***

***Méthodes***

## I. Préparation du matériel végétal

Au cours de ce travail, nous avons d'abord extrait les composés phénoliques à partir des feuilles d'*Ecballium elaterium*, ensuite nous avons procédé à l'étude comparative de leurs effets antioxydants.

### I.1. Récolte et identification de la plante

La partie aérienne d'*Ecballium elaterium* (Figure n°9) a été récoltée au mois de mars 2014 dans la région de l'Anasser située au Sud-est de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, dont les données GPS sont les suivantes : Latitude : 4° 48' 12.46" E ; Longitude : 36° 3' 0.684" N et Altitude : 900m.

L'identification botanique de la plante a été réalisée au niveau du laboratoire de physiologie végétal en se référant à flore algérienne de Quezel et Santa, 1963.



**Figure n°8:** Photographie de la partie aérienne d'*Ecballium elaterium*

### I.2. Séchage, broyage et tamisage

La plante fraîchement récoltée, a été débarrassée de la poussière, du sable et autres particules lavée à l'eau courante, puis séchée à l'étuve à 40°C.

Une fois séchées, les feuilles ont été réduites en poudre à l'aide d'un broyeur électrique, puis soumises à un tamisage à l'aide d'un tamiseur électrique muni d'un ensemble de tamis avec des pores ayant des diamètres allant de 250 à 125 $\mu$ m. la poudre obtenue a été conservée dans des récipients en verre, hermétiquement fermés et stockés à l'abri de la lumière pour des utilisations ultérieures.

## **II. Méthodes**

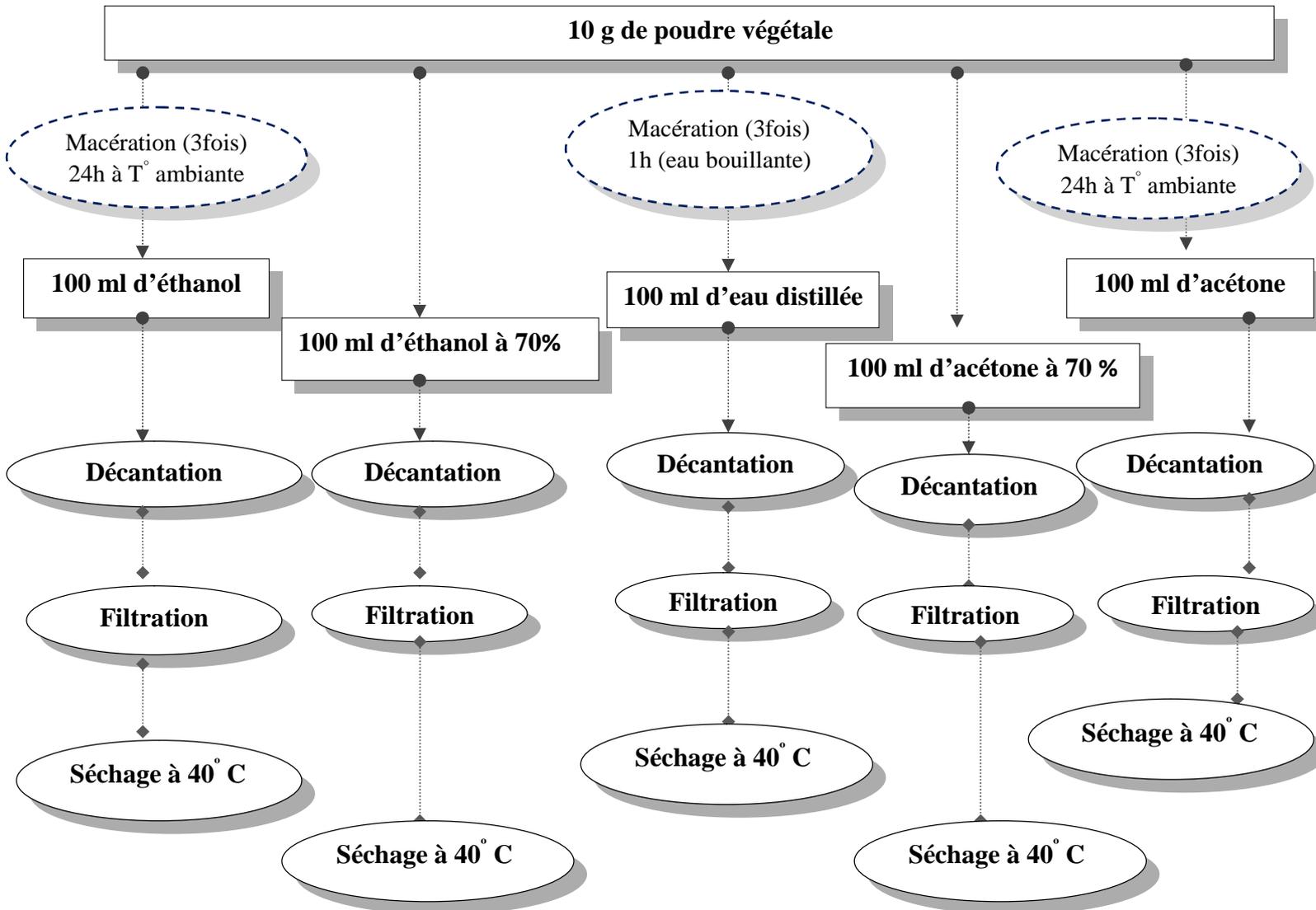
### **II.1. Extraction des composés phénoliques**

#### **a) Principe**

L'objectif de cette extraction est de libérer les polyphénols présents dans des structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion (**Laure et al., 2002**). Plusieurs solvants sont utilisés pour l'extraction des polyphénols. Le protocole suivi dans cette étude est celui de **Peschel et al., 2006**.

### b) Mode opératoire

Les différentes étapes du protocole d'extraction sont représentées dans la figure n°10.



**Figure n°9:** protocole d'extraction des composés phénoliques (Peschel et al., 2006)

### c) Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est le rapport entre le poids de l'extrait sec exprimé en mg et le poids de l'échantillon (poudre végétale), exprimé en pourcentage.

🧪 Le rendement est calculé selon la formule suivante :

$$(\%) = [(P_0 - P_1) / P_E] * 100$$

Où :

**P<sub>0</sub>– P<sub>1</sub>**: Poids de l'extrait sec exprimé en milligrammes.

**P<sub>0</sub>**: Poids de la boîte de pétri contenant l'extrait exprimé en milligrammes.

**P<sub>1</sub>**: Poids de la boîte de pétri vide exprimé en milligrammes.

**P<sub>E</sub>**: poids de l'échantillon (poudre végétale) exprimé en milligrammes.

## II.2. Dosage des composés phénoliques

### II.2.1. Polyphénols totaux

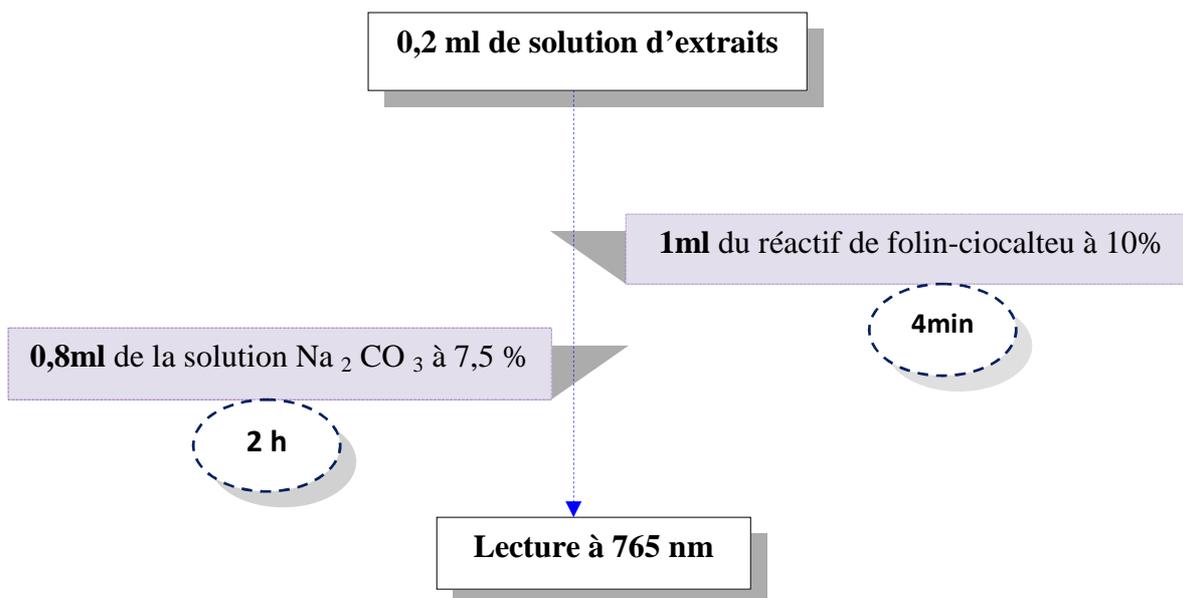
#### a) Principe

Le principe de cette méthode repose sur l'interaction des composés phénoliques avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols entraînant la formation d'un complexe de couleur bleue.

La coloration produite, dont l'absorption maximale est mesurable à 760 nanomètres, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (**Bonnaillie et al., 2012**).

#### b) Mode opératoire

Le protocole utilisé pour le dosage des composés phénoliques totaux est schématisé dans la figure n°11 (**Singleton et Rossi, 1965 in Wong et al., 2006**).



**Figure n°10:** Protocole de dosage des composés phénoliques (Wong *et al.*, 2006).

❖ **Le témoin:** contient 200µl de méthanol, 1ml de folin et 800µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

#### d) Expression des résultats

Les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide gallique dans du méthanol.

Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent en acide gallique par gramme de poids sec (mg EAG/ g MS).

### II.2.2. Flavonoïdes

#### a) Principe

Les flavonoïdes de nos extraits sont déterminés par spectrophotométrie selon le protocole de Djeridane *et al.*, (2006).

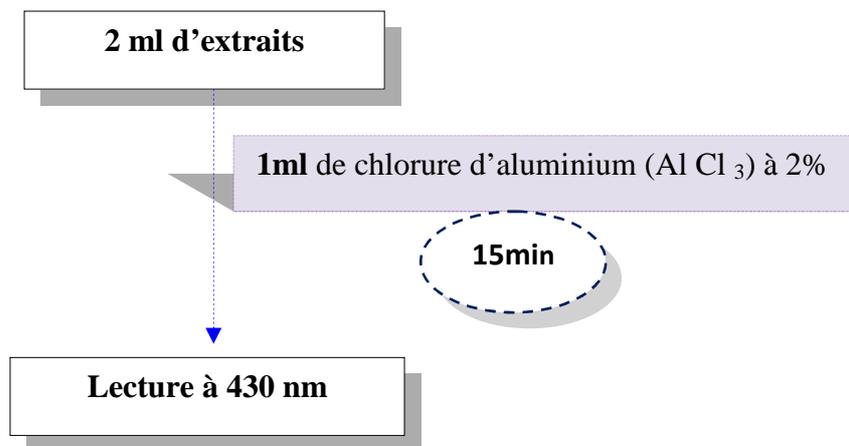
Le dosage des flavonoïdes repose sur leur aptitude à chélater les métaux (fer et aluminium), cette propriété est propre aux groupements hydroxyles des phénols flavonoïdes capables de

donner un complexe jaunâtre en présence d'aluminium, utilisé dans notre protocole sous forme de chlorure d'aluminium (**Ren et al., 2003**).

Le principe est basé sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium qui a un maximum d'absorbance à 430 nm.

### b) Mode opératoire

Le protocole de dosage des flavonoïdes est schématisé dans la figure n°12.



**Figure n°11:** Procédure de dosage des flavonoïdes totaux (**Djeridane et al., 2006**)

❖ **Le témoin:** contient 2ml d'extrait et 1ml de méthanol.

### c) Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de Quercétine par gramme de matière sèche.

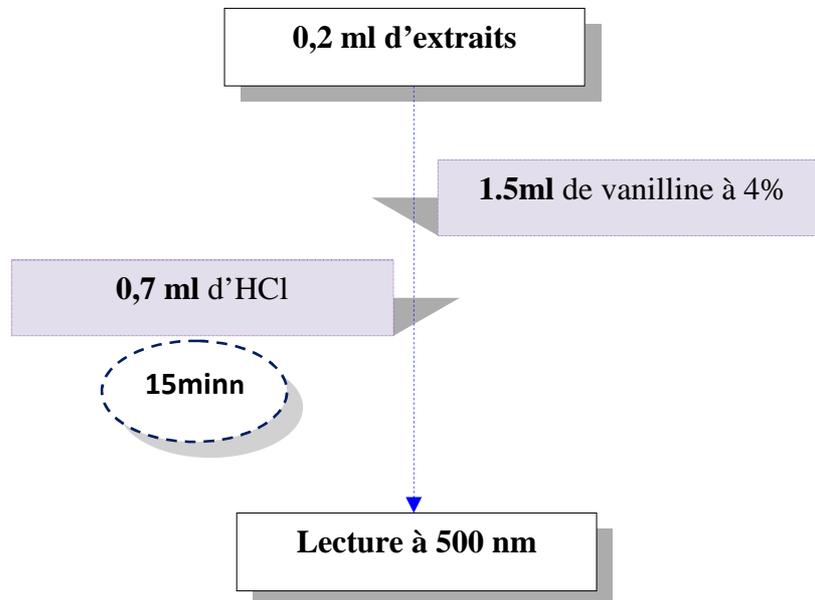
## II.2.3. Tannins condensés

### a) Principe

Les tanins condensés sont dosés par la méthode de la vanilline en milieu acide, dont le principe repose sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés, en présence d'acide, pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm (**Bouزيد et al., 2011**).

### b) Mode opératoire

Les tannins condensés des extraits d'*Ecballium elaterium* ont été dosés selon la technique décrit par **Broadhurst et Jones (1978)** in **Saad et al., (2012)** (Figure n°13).



**Figure n°12:** Procédure de dosage des tannins condensés (**Saad et al., 2012**)

❖ **Le témoin:** contient 250µl d'extrait, 750µl d'HCl et 1.5ml de méthanol.

### c) Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de catéchine par gramme de matière sèche.

## II.3. Evaluation de l'activité antioxydants

Pour toutes les activités, l'extrait sec de composés phénoliques est reconstitué dans du méthanol et préparé à différentes concentrations.

L'acide ascorbique et la BHA ont été utilisés comme antioxydants de référence, pour apporter un point de comparaison avec les différents extraits.

### II.3.1. Effet « scavenging » du radical DPPH :

#### a) Principe

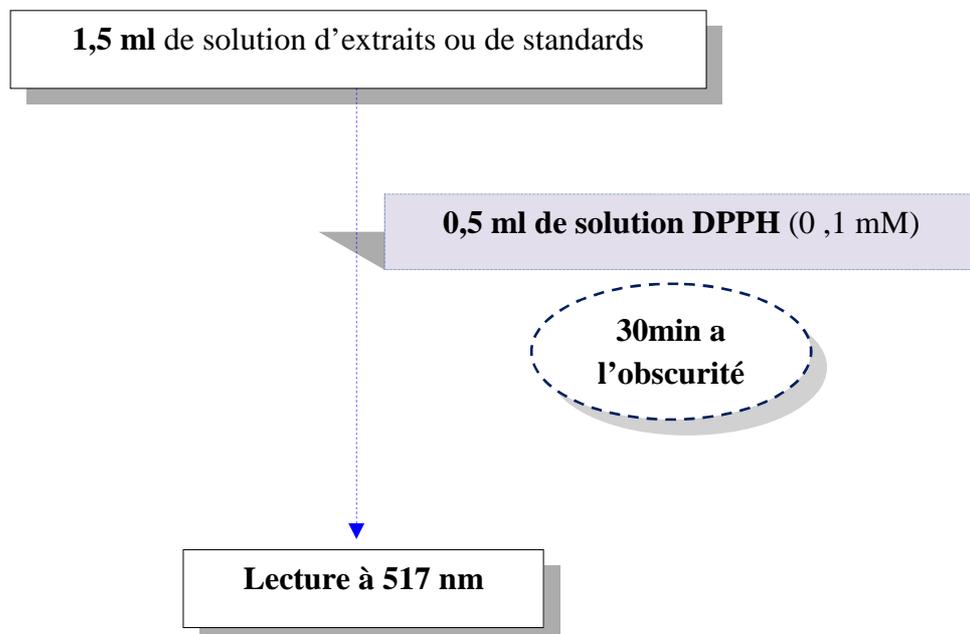
Le DPPH est un radical libre organique stable, généralement utilisé pour évaluer les propriétés anti-radicalaires de toute substance in-vitro (**Bozin et al., 2008**).

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl-1- picryl hydrazyl) de couleur violette (forme oxydé) se réduit en 2,2 Diphenyl-1- picryl hydrazine de couleur jaune (**Popovici et al., 2009**).

L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre à 517 nanomètres, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité (**Kouamé et al., 2009**).

#### b) Mode opératoire

La méthode décrite par **Blois, (1958)** in **Wu et Ng, (2008)** a été utilisée pour évaluer l'activité anti-radicalaire des extraits d'*Ecballium elaterium*. Toutes les étapes de l'essai sont schématisées dans la figure n°14.



**Figure n°13:** Protocole d'étude de l'activité « scavenging » du DPPH (**Wu et Ng, 2008**)

- ❖ **Le témoin contient** : 1,5 ml d'extrait et 0,5 ml de méthanol,
- ❖ **Le contrôle contient** : 1,5 ml de méthanol et 0,5 de DPPH.

### c) Expression des résultats

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

$$\% \text{ d'inhibition du radical DPPH} = (A_C - A_T) / A_C * 100$$

Où :

$A_C$  : Absorbance du contrôle,

$A_T$  : Absorbance du test – absorbance du blanc du test.

### II.3.2. Evaluation de l'activité antioxydant par l'ABTS<sup>+</sup>

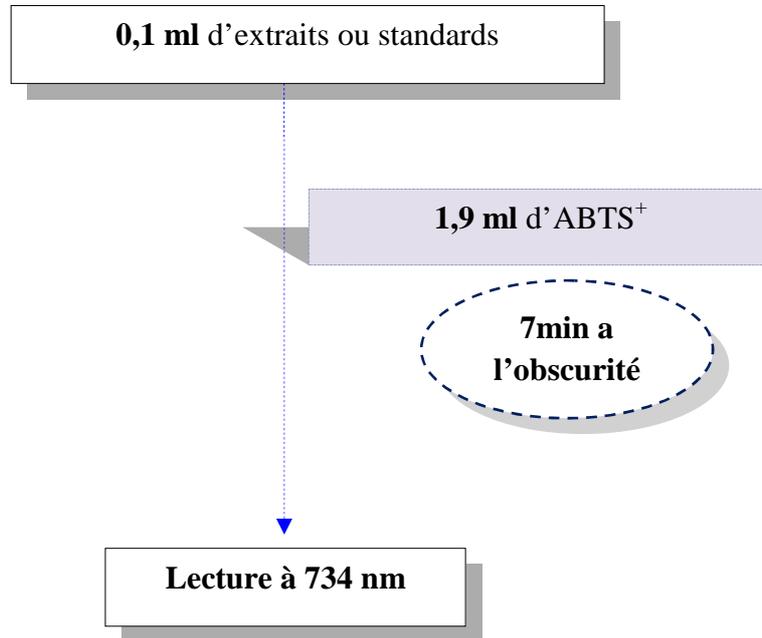
#### a) Principe

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cation chromophore, acide 2,2'-azinobis (3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS<sup>•+</sup>) de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS<sup>+</sup> incolore par piégeage d'un proton par l'antioxydant (Miller et Rice-Evans, 1997). La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre (Lien et al., 1999).

L'activité des différents extraits est comparée avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8 tétraméthylchroman-2-carboxylique), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Il est à noter que plus la valeur du TEAC est élevée plus la molécule est active.

**b) Mode opératoire**

Le protocole préconisé par **Re et al., (1999)** est représenté dans la Figure n°15.



**Figure n°14:** Protocole d'étude de l'activité antioxydant par l'ABTS<sup>+</sup> (**Re et al., 1999**)

❖ **Le témoin contient :** 100µl de méthanol et 1,9ml d'ABTS<sup>+</sup>.

**c) Expression des résultats**

Le pourcentage d'inhibition du radical cation ABTS<sup>+</sup>(%) est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition du radical cation ABTS}^+ = (A_C - A_T) / A_C * 100$$

\*le TEAC « capacité antioxydant équivalente au trolox », correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydant qu'une concentration de 1 mM du composé testé.

### II.3.3. Pouvoir réducteur

#### a) Principe

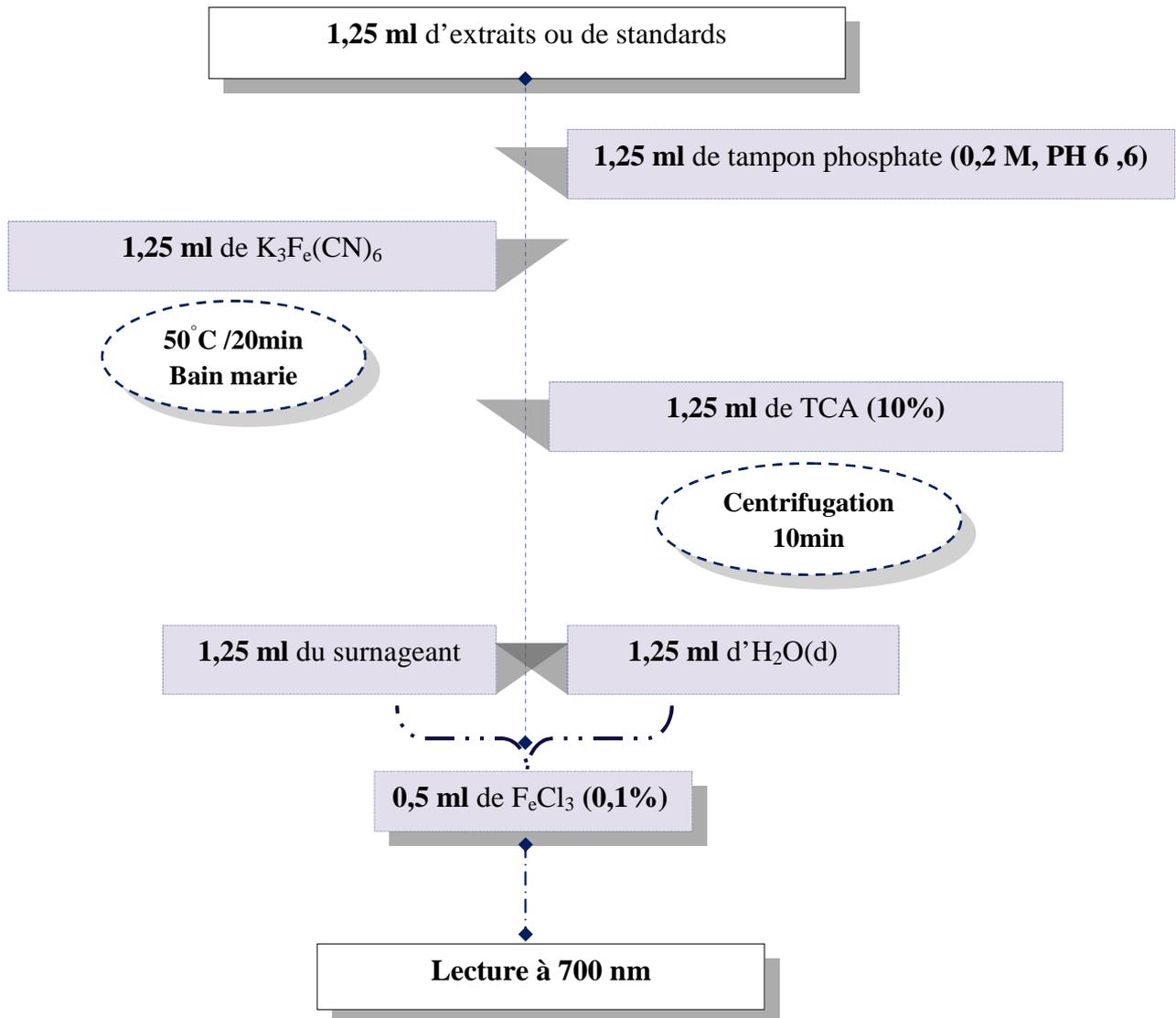
L'analyse du pouvoir réducteur, d'un antioxydant, est basée sur la réduction du complexe fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), en présence des antioxydants réducteurs. Elle se manifeste par l'apparition d'une couleur « bleu », mesurable par spectrophotométrie à 700 nanomètres, et dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits testés (**Bijoy et al., 2008**).

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

#### b) Mode opératoire

La méthode d'**Oyaizu, (1986)** in **Ferreira et al., (2007)** a été choisie afin de déterminer le pouvoir réducteur des différents extraits d'*Ecballiumelaterium*.

Les différentes étapes sont schématisées dans la figure n°16.



**Figure n°15:** Protocole d'étude du pouvoir réducteur (Ferreira et al., 2007)

❖ Pour le **témoin**, l'extrait est remplacé par du méthanol.

### c) Expression des résultats

Pour chaque concentration, une absorbance est mesurée et les résultats sont représentés sous forme de graphique.

***Résultats***  
***&***  
***Discussion***

### I. Taux d'extraction des extraits sec

Les rendements en extraits sec pour les différents solvants utilisés sont présentés dans le tableau n° III.

**Tableau n° III:** Rendements d'extraits des différents d'*Ecballium elaterium*

Extraits	Rendements %
Aqueux	35,70
Éthanolique	10,50
Éthanolique à 70%	27,10
Acétonique	6
Acétonique à 70%	20,60

Les résultats obtenus, montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait aqueux (**35,70%**) suivi de l'extrait éthanolique à 70% (**27,10%**), acétonique à 70% (**20,60%**), éthanolique (**10,50%**) et enfin l'extrait acétonique qui présente un taux de rendement très faible (**6%**).

On remarque que c'est l'extrait aqueux qui donne un meilleur rendement d'extraction par rapport aux autres extraits, puisque l'eau est plus polaire que l'éthanol et l'acétone.

Lorsque les solvants sont mélangés avec de l'eau (éthanol à 70 %, acétone à 70%) nous remarquons que le rendement d'extraction augmente par rapport à celui obtenu avec l'éthanol ou l'acétone à 100%. ceci pourrait indiquer que la plante utilisée comporte plus de composés polaires qu'apolaires.

Les travaux réalisés par **Wu et Ng, (2008)**, sur la partie aérienne de (*Momordica charantia*) (cucurbitacées) récoltée à Taiwan, ont révélé un rendement de **31%** pour l'extrait aqueux, ce qui est assez comparable à celui qu'on a obtenu ; et un rendement de **22%** pour l'extraits éthanolique, qui est supérieure à celui obtenu pour *Ecballium elaterium*.

On peut constater, d'après les résultats obtenus et ceux cités par la littérature, qu'il existe une variation du rendement d'extraction entre les espèces de la même famille.

Cette différence de rendement peut être expliquée essentiellement par deux principaux facteurs :

- D'une part, la différence de l'espèce étudiée.
- D'autre part, les conditions d'extractions en question, semblent être également un facteur influençant le taux d'extraction des composés phénoliques, en effet dans notre étude la macération dure trois jours, contrairement à **Wu et Ng, (2008)**, qui ont réalisé une macération de six jours.

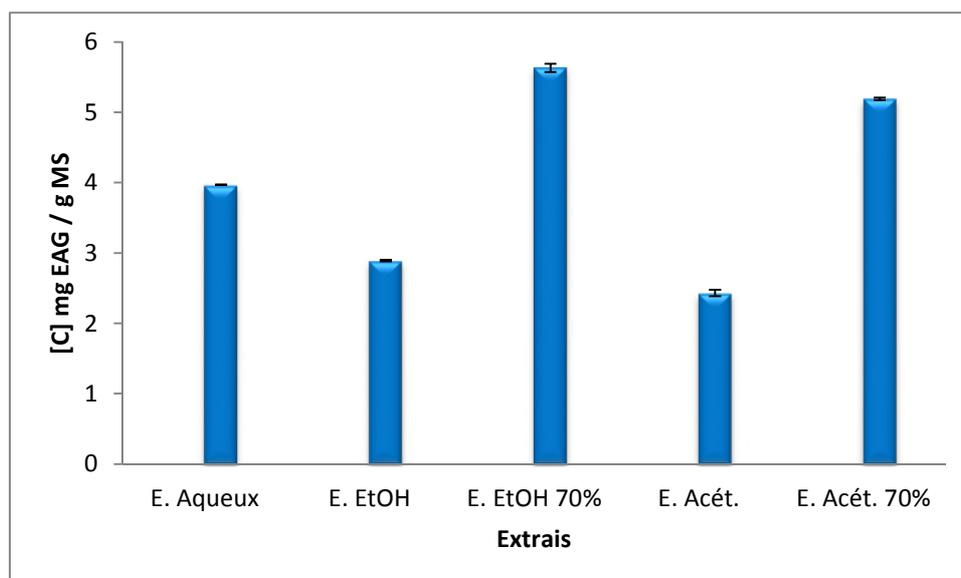
De manière générale, les fluctuations et variations constatées dans le rendement en composés phénoliques peuvent être attribuées à plusieurs facteurs dont essentiellement : l'origine de l'espèce, la période de récolte, et plus particulièrement les composés phénoliques, en fonction de leur structure et de la nature de leur substituants qui ne présentent pas la même solubilité (l'extraction est fonction du ratio solubilité entre solvant/soluté) (**Brada et al., 2007; Ksouri et al., 2008 ; Mansouri et al., 2011**).

## II. Dosage des composés phénoliques

### II.1. Polyphénols totaux

Les résultats du dosage des polyphénols totaux obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (**mg EAG/ g MS**).

Les valeurs moyennes de la concentration en polyphénols totaux des extraits d'*Ecballium elaterium*, calculées à partir des valeurs des absorbances à une longueur d'onde de 765 nm, sont représentées dans la figure n° 17.



**Figure n°16:** Représentation graphique du taux de composés phénoliques des extraits d'*Ecballium elaterium*

Pour les cinq extraits d'*Ecballium elaterium* nous remarquons une variabilité des teneurs en phénols totaux (figure n°17). La teneur la plus élevée est constatée dans l'extrait éthanolique à 70% , elle est de l'ordre de **5,63 ± 0,057 mg EAG / g MS** suivi par l'extrait acétonique à 70% avec une teneur de **5,19 ± 0,016 mg EAG / g MS**, puis les extraits aqueux, éthanolique et acétonique avec une teneur de **3,97 ± 0,004** , **2,89 ± 0,011** et **2,43 ± 0,045 mg EAG / g MS** respectivement.

Se sont donc les extraits éthanolique à 70% et acétonique à 70% qui renferment une grande quantité de polyphénols, par rapport aux autres extraits. Cela étant due au fait que la polarité de ces solvants est augmentée par l'ajout d'eau, ce qui entrainerait une augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans ces solvants. En effet, **Bushra et al., (2007)**, ont montré que l'éthanol et le méthanol sont les solvants les plus efficaces pour l'extraction des composés phénoliques.

Les résultats de l'étude réalisée par, **Wu et Ng, (2008)**, ont révélé que *Momordica charantia* (cucurbitacée) récoltée en Asie est plus riche en composés phénoliques avec une concentration de **68.8mg/g** pour l'extrait éthanolique et **51.6mg/g** pour l'extrait aqueux.

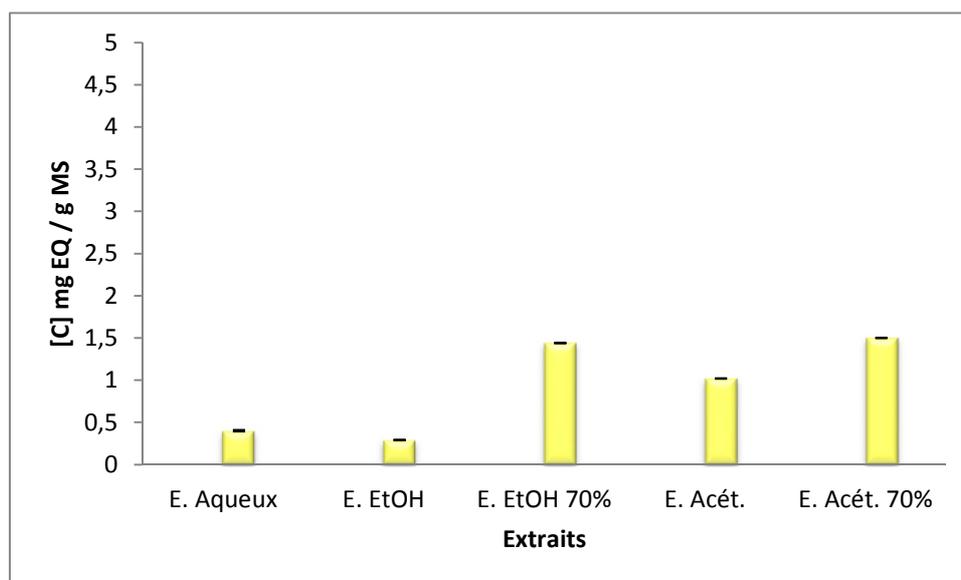
Par comparaison à ces résultats, les teneurs obtenues dans notre cas sont très faible autant pour l'extrait aqueux que pour les autres extraits.

D'après **Jakopič et al., 2009**, les variations observées dans les taux en composés phénoliques, pourraient être attribuées essentiellement aux conditions d'extraction ainsi qu'aux conditions environnementales et à la saison de récolte.

Ainsi, plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (**Bouزيد et al., 2011**).

## II.2. Flavonoïdes

Les valeurs moyennes de la concentration en flavonoïdes des extraits d'*Ecballium elaterium*, calculée à partir des valeurs des absorbances à une longueur d'onde de 430 nm, sont représentées dans la figure n° 18.



**Figure n°17:** Représentation graphique du taux en flavonoïdes des extraits d'*Ecballium elaterium*

D'après l'histogramme illustré dans la figure n°18, nous observons des teneurs rapprochées en flavonoïdes dans les extraits acétonique à 70% et éthanolique à 70%, ces teneurs sont respectivement de **1,50 ± 0,003** et **1,44 ± 0,004 mg EQ/g MS**, suivies par les extraits acétonique, aqueux et éthanolique avec une teneur de **1,02 ± 0,0029 ; 0,4 ± 0,01 ; 0,29 ± 0,0014 mg EQ/g MS** respectivement.

D'après ces résultats on remarque que l'extrait acétonique à 70% et éthanolique à 70% présentent un taux de flavonoïdes plus ou moins élevé par rapport aux autres extraits, puisque les flavonoïdes sont solubles dans ces solvants.

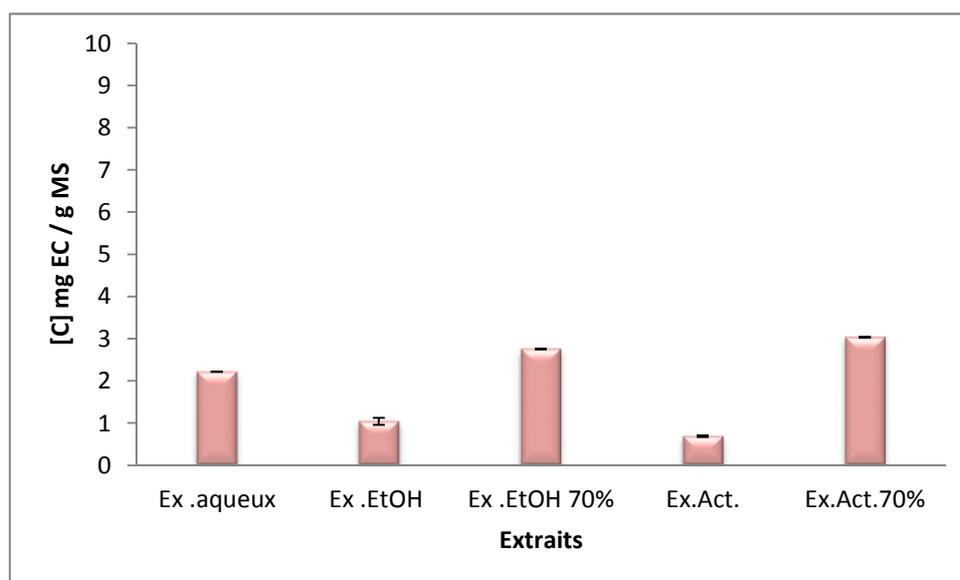
Si on compare nos résultats avec ceux de, **Wu et Ng, (2008)**, qui ont trouvé une concentration plus élevée en flavonoïdes totaux (**44.0 mg/g**) pour l'extrait éthanolique et (**62.0 mg/g**) pour l'extrait aqueux, on constate que notre plante (*Ecballium elaterium*) est pauvre en flavonoïdes.

Ce résultat rejoint donc les observations émises par **Jaradat et al., (2012)**, qui ont établis que *Ecballium elaterium* serait une espèce pauvre en flavonoïdes.

### II.3. Tannins condensés

Les résultats du dosage des tannins sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EC/g) (annexe).

Comme le montre la figure n°19, les concentrations en tanins sont classées comme suit: l'extrait acétonique à 70% > éthanolique à 70% > aqueux > éthanolique > acétonique qui sont de l'ordre de **3,03 ± 0,009 ; 2,75 ± 0,004 ; 2,21 ± 0,003 ; 1,03 ± 0,83** et **0,68 ± 0,017 mg EC/g MS** respectivement. On remarque que les teneurs en tanins enregistrées dans l'extrait acétonique à 70% et éthanolique à 70% sont les plus importantes.



**Figure n°18:** Teneurs en tanins pour les cinq extraits d'*Ecballium elaterium*

La quantité en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins est variable entre les différentes parties d'*Ecballium elaterium*. Les extraits acétonique à 70% et éthanolique à 70% sont plus riches en tanins par rapport aux autres extraits qui représentent des teneur assez faibles.

Selon **Jean-Blain, (1998) et Bruneton, (1999)**, la solubilité des tannins dans l'eau dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation.

Les tannins sont également solubles dans l'acétone et les alcools. C'est pour cette raison que l'extraction des tannins est généralement réalisée par une solution acétone-eau ou méthanol-eau (Brunet, 2008).

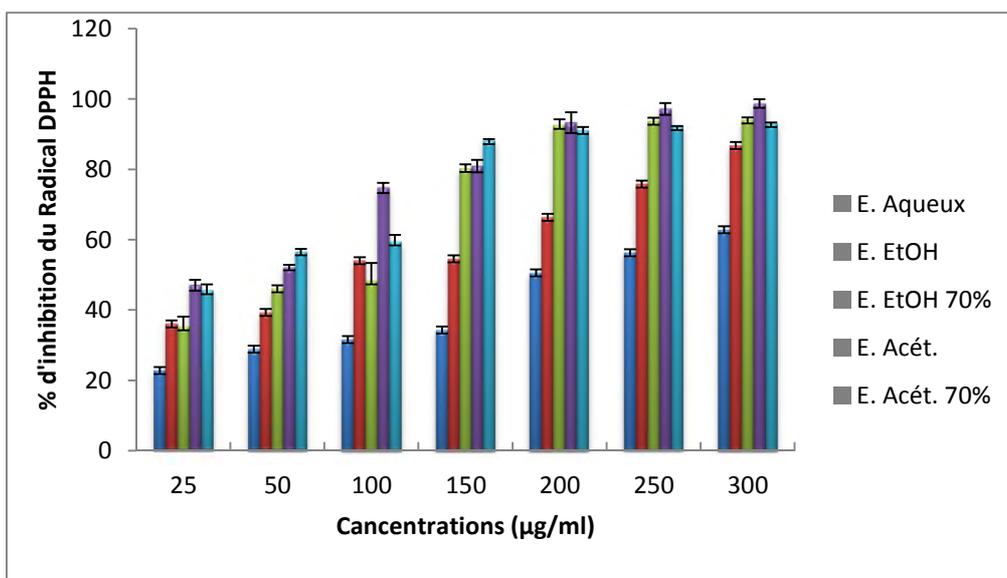
- Après le dosage des composés phénoliques, les flavonoïdes et tanins on constate que la plante est pauvre en polyphénols, effectivement par ce qu'elle produit beaucoup plus de cucurbitacines (**Everaldo et al., 2001 ; Christodoulakis et al., 2011**).

Des études faites par **Jaradat et al., (2012)** et **Attard et Scicluna-Spiteri, (2001)**, montrent que les composants les plus abondants dans *Ecballium elaterium* sont les cucurbitacines avec une teneur de l'ordre de 30%.

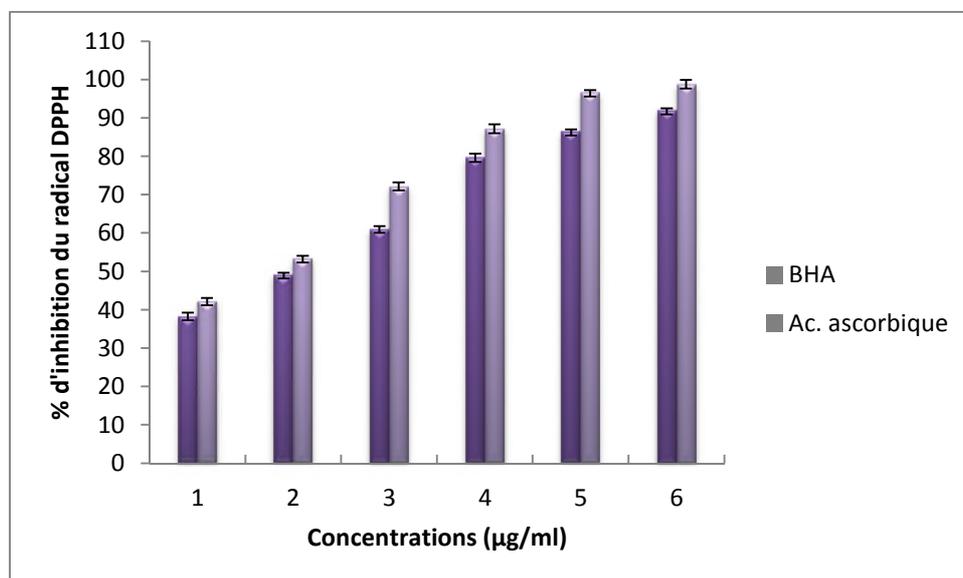
### **III. Activités antioxydants**

#### **III.1. Activité scavenging du DPPH**

La figure n°20 illustre le pourcentage « scavenging » du radical DPPH par les extraits contenant les polyphénols d'*Ecballium elaterium*.



**Figure n°19:** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les cinq extraits d'*Ecballium elaterium*



**Figure n°20:** Activité scavenging du DPPH des antioxydants de référence

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'activité anti-radicalaire augmente en augmentant la concentration.

Les standards utilisés possèdent l'activité anti-radicalaire la plus élevée, avec des pourcentages d'inhibition du radical DPPH allant de **38,23 ± 1,02** pour la BHA à **98,63 ± 1,24** pour l'acide ascorbique.

D'après l'histogramme, on remarque que l'effet scavenging du DPPH de l'extrait acétonique varie de **47 ± 0,77** à **98,69 ± 1,24**, suivi de l'extrait acétonique à 70% de **45,46 ± 1,86** à **93,05 ± 0,25**, puis l'extrait éthanolique à 70% (**35,23 ± 2,86** à **94,07 ± 0,7**), éthanolique (**36,03 ± 2,07** à **86,77 ± 0,83**) et enfin l'extrait aqueux qui présente un faible effet scavenging du DPPH qui est de l'ordre de **22,73 ± 4,05** à **62,79 ± 2,41** dans une gamme de concentrations allant de **25µg à 300µg d'extrait /ml** de méthanol.

Les résultats expérimentaux obtenus montrent que les extraits acétonique et acétonique à 70%, présentent un effet scavenging du DPPH efficace. Ceci suggère que ces extraits possèdent des composés doués d'activité antioxydants élevée. En effet lors du dosage des tannins condensés, ces deux mêmes extraits ont montrés la plus forte teneur en ces composés.

De nombreux tannins présentent des propriétés antioxydants par le piégeage des radicaux libres ou encore par l'inactivation des ions pro-oxydants (**Bruneton, 1999; Feucht et Treutter, 1999**).

Grâce à leurs fonctions phénoliques, qui ont un fort caractère nucléophile, les tannins sont d'excellents piègeurs de radicaux libres (**Brunet, 2008**).

**Sasmakov., et al., 2012**, ont testé l'effet scavenger de l'extrait méthanolique d'*Ecballium elaterium* et ont montré un effet scavenging de radicale DPPH efficace.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les extraits de notre plante, ont une activité antioxydants moyenne comparée aux antioxydants de référence utilisés. Ceci pourrait être attribué à la pureté de ces composés actifs.

Cette différence d'activité, est probablement due au degré de pureté des échantillons utilisés, les standards étant des composés purs et les échantillons des extraits bruts non purifiés. Selon **Dawidowicz et al., (2006)**, il est difficile d'établir une corrélation et d'obtenir un même résultat entre des composés purifiés et des extraits bruts, puisqu'il est possible d'avoir des interactions entre les différents composés de l'extrait (effet de synergie ou effet d'antagonisme).

➤ **Calcul des EC<sub>50</sub>:**

La capacité antioxydant des différents extraits a été déterminée à partir des EC<sub>50</sub>, paramètre étant défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH<sup>•</sup>. Plus la valeur d'EC<sub>50</sub> est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande (**Pokorny et al., 2001**).

Les valeurs des EC<sub>50</sub> obtenues pour tous les extraits testés sont représentées dans le tableau n° IV.

**Tableau n° IV:** valeurs des EC<sub>50</sub> obtenues pour les extraits d'*Ecballium elaterium*

Extrait	EC <sub>50</sub> exprimées en µg/ml
Aqueux	207,94
Éthanolique	106,81
Éthanolique à 70%	102,29
Acétonique	36,77
Acétonique à 70%	32,55
BHA	2,17
Acide ascorbique	1,76

Les valeurs des EC<sub>50</sub> obtenues sont comparables aux pourcentages scavenging du radical DPPH.

Les extraits acétonique et acétonique à 70% présentent les EC<sub>50</sub> les plus faibles, ce qui leur confère l'activité anti-radicalaire la plus élevée par rapport aux autres extraits.

L'EC<sub>50</sub> obtenue par **El Sayed et Badr, (2012)** pour *Ecballium elaterium* récoltée en Égypte utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant est nettement inférieur à celle obtenue dans notre étude, elle est de l'ordre de **8,4 µg/ml** et possède donc une meilleure activité anti-radicalaire.

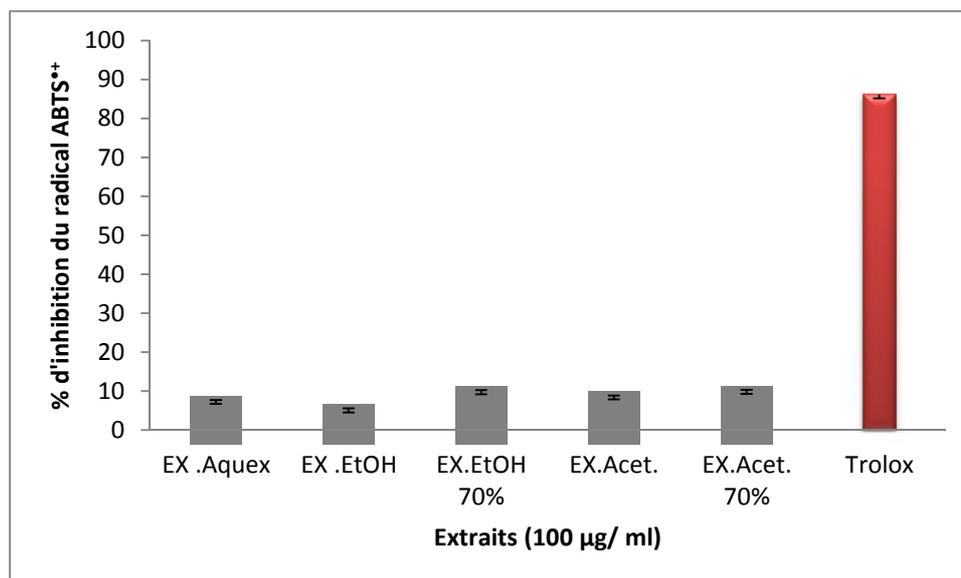
Cette différence d'EC<sub>50</sub> et donc d'activité peut être expliquée essentiellement par deux principaux facteurs :

- La région et la période de la récolte.
- Le type de solvants utilisés (Jakopič et al., 2009).

Une autre espèce de la famille des Cucurbitacés (*Momordica charantia*), étudiés par Wu et Ng, (2008), a également donné des EC<sub>50</sub> inférieures à celles d'*Ecballium elaterium*, (de l'ordre de **6.15 mg/ml** pour l'extrait aqueux et **7.08 mg/ml** pour l'extrait ethanologique), ceci implique que *Momordica charantia* possède une meilleure activité que celle d'*Ecballium elaterium*, par ce que cette plante est plus riche en composés phénolique par rapport à *Ecballium elaterium*.

### III.2. Evaluation de l'activité antioxydants par l'ABTS<sup>+</sup>

La figure n°21 illustre le pourcentage d'inhibition de l'ABTS<sup>+</sup> par les extraits d'*Ecballium elaterium* et le standard Trolox à 100 µg/ ml.



**Figure n°21:** pourcentage d'inhibition d'ABTS des extraits d'*Ecballium elaterium*.

Le pourcentage d'inhibition exercée par le Trolox (figure n° 21), est nettement supérieur à ceux obtenues avec les extraits d'*Ecballium elaterium*.

Le Trolox, analogue de la vitamine E, a donné un pourcentage d'inhibition de **86,09 ± 0,619 %** à une concentration de **100µg/ml**. Ce pourcentage est environ 8 fois plus élevé que celui de l'extrait éthanolique à 70% et acétonique à 70% présentant un pourcentage d'inhibition de **10,2 ± 0,025%** et **10,25 ± 0,01 %** à la même concentration.

➤ Calcule du TEAC :

La capacité antioxydant en équivalent Trolox (TEAC) correspond à la concentration (m mol/l ou mg/l ) de Trolox ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de la substance à tester (**Miller et Rice-Evans, 1997**).

Les valeurs de TEAC des différents extraits testés sont présentées dans le tableau n° V :

**Tableau n° V:** valeurs des TEAC obtenues pour les extraits d'*Ecballium elaterium*

Extrais	TEAC (mM ET/g d'extrait)
Aqueux	1,36
Éthanolique	0,82
Éthanolique à 70%	1,17
Acétonique	1,02
Acétonique à 70%	0,97

Les résultats obtenus, montrent que la valeur du TEAC la plus élevée est celle de l'extrait aqueux (**1,36**) suivi de l'extrait éthanolique à 70% (**1,17**), acétonique (**1,02**) puis l'extrait acétonique à 70% (**0,97**) et enfin l'extrait éthanolique qui présente la valeur la plus faible du TEAC (**0,82**) **Mm ET/g d'extrait**.

Plus la valeur du TEAC est élevée plus le composé possède une activité anti-ABTS<sup>++</sup> importants.

On peut constater d'après ces résultats, que les extraits aqueux, éthanolique à 70% et acétonique sont les plus actifs avec des valeurs de TEAC plus élevée par rapport aux deux autres extraits.

Par comparaison aux résultats des dosages des différentes classes de polyphénols, on peut supposer qu'il existe des composés autres que les polyphénols qui interviennent dans le piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup>.

Ce résultat pourrait être également dû à la nature des composés phénoliques, différente dans les cinq extraits testés, et à la teneur en ces composés, tenus pour responsable de l'activité antioxydants (Dawidowicz *et al.*, 2006).

### III.3. Pouvoir réducteur

Les figures n°22 et 23 illustré le pouvoir réducteur des extraits et des standards respectivement.

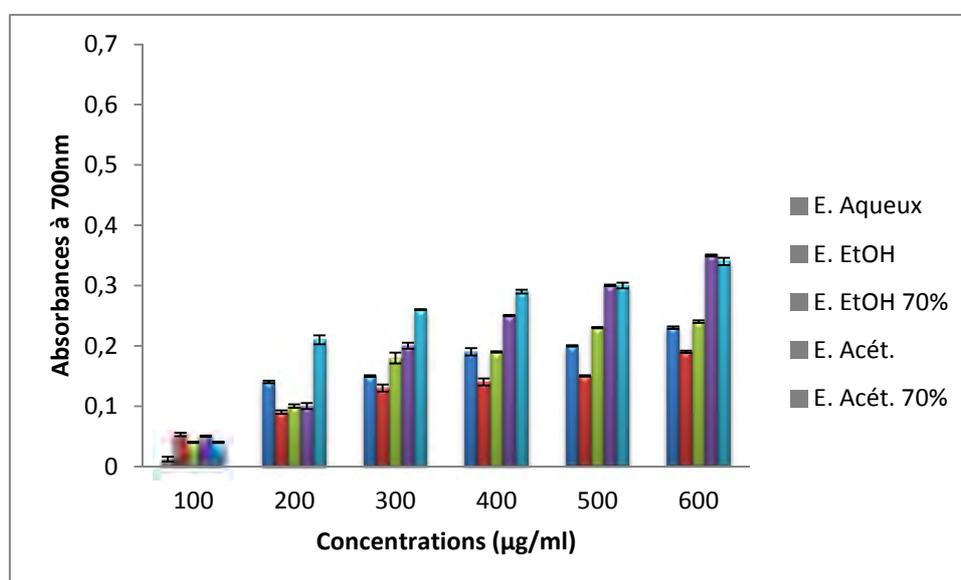
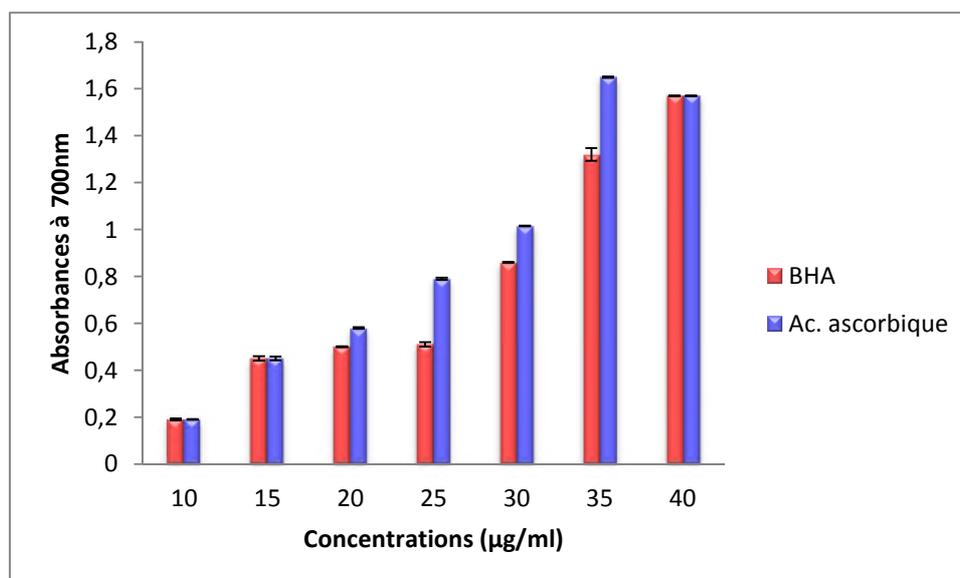


Figure n° 23: Pouvoir réducteur des extraits d'*Ecballium elaterium*



**Figure n° 24:** Pouvoir réducteur des antioxydants de référence (BHA et acide ascorbique)

Au première abord, on remarque que les standards et les extraits, ont une activité dépendante de la concentration c.-à-d. que le pouvoir réducteur augmente avec l'augmentation de la concentration en extraits et en substances standards.

D'après les graphiques précédents il existe une grande différence entre l'activité des standards et celle des extraits. En effet, pour une concentration de **10 µg/ml**, les absorbances données par les standards varient de **0,19** (acide ascorbique, BHA) à **1,57**, en augmentant la concentration alors que les extraits d'*Ecballium elaterium* ont donné une très faible absorbance de **0,012** à une concentration **10** fois plus élevée, soit **100 µg/ml**.

Cette différence d'activité, est probablement due au degré de pureté des échantillons utilisés, les standards étant des composés de synthèse purs et les échantillons des extraits bruts non purifiés.

D'après l'histogramme on remarque que, les absorbances de l'extrait acétonique à 70% varient de **0,04 ± 0,001** à **0,34 ± 0,006**, suivi de l'extrait acétonique de **0,05 ± 0,001** à **0,35 ± 0,0016**, puis l'extrait éthanolique à 70% (**0,04 ± 0,001** à **0,24 ± 0,002**) et enfin les extraits éthanolique et aqueux qui présente des absorbances faible dans une gamme de concentrations allant de 100 µg à 600 µg d'extrait /ml de méthanol.

Les potentiels réducteurs observés se classent dans l'ordre croissant suivant :

Acide ascorbique > BHA > acétonique à 70% > acétonique > éthanolique à 70% > aqueux > éthanolique.

Comme on le remarque la richesse en polyphénols des extraits (acétonique à 70%, acétonique, éthanolique à 70%) leur permettent une meilleure activité par rapport aux autres extraits, ceci étant dû au potentiel réducteur élevé des polyphénols présents dans ces extraits (**Blazovics et al, 2003**).

**Kubola et Siriamornpun (2008)**, ont montré que l'extrait de *Momordica charantia* (cucurbitacée) récolté en Thaïlande possède un bon pouvoir réducteur avec une absorbance de **0,433 ± 0.007**, ce qui coïncide avec sa forte teneur en composés phénoliques.

Tous ces résultats, indiquent que la réduction du  $\text{Fe}^{+3}$  est un mécanisme d'action important de l'activité antioxydant des polyphénols.

De manière générale, les travaux d'**Odabasglu et al., (2004)**, ont montré qu'il existe une relation, entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir réducteur de plusieurs plantes médicinales. La capacité réductrice de ces plantes est due principalement aux composés phénoliques.

***Conclusion***

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est due à la diversité des molécules actives qu'elles contiennent.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et au pouvoir antioxydants de différents extraits d'*Ecballium elaterium*.

Les résultats du dosage des composés phénoliques totaux, à partir des cinq extraits obtenus, ont montré que l'extrait éthanolique à 70% et acétonique à 70%, possède une teneur moyenne en ces composés, et que les extraits aqueux, éthanolique et acétonique en sont relativement pauvres.

Il ressort également qu'*Ecballium elaterium* renferme beaucoup plus de tanins condensés et ne contient pratiquement pas de flavonoïdes.

L'évaluation de l'activité antioxydants *in-vitro*, a révélé des résultats différents pour les cinq extraits:

- Les extraits acétonique et acétonique à 70%, présentent des  $EC_{50}$  vis-à-vis du radical libre DPPH de 36,77 et 32,55  $\mu\text{g/ml}$  respectivement, et un bon pouvoir scavenger pour ce radical. Ces même extraits, on également montré un bon pouvoir réducteur en comparaison avec les autres extraits.
- En revanche, les extraits éthanolique à 70%, éthanolique et aqueux n'ont pas donné de bons résultats pour les deux tests réalisés, et un pouvoir réducteur tout aussi faible.

Ces résultats étant en accords avec ceux obtenus lors du dosage. Ainsi, la richesse des extraits acétonique et acétonique à 70% en composés phénoliques leur confère une meilleure activité par rapport aux autres extraits.

L'analyse des différents extraits d'*Ecballium elaterium*, nous conduira dans la perspective future de notre étude, de compléter et d'approfondir ce travail par une étude phytochimique avancée.

Dans un premier temps de faire un fractionnement de ces extraits et d'identifier les molécules responsables du pouvoir antioxydants en utilisant des techniques d'identification plus performantes.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant de valoriser cette plante en étudiant d'autres activités telles que l'activité anti-inflammatoire, antibactérienne, etc.

Enfin, des études toxicologiques sont nécessaires pour affirmer ou rejeter la possibilité d'emploi des extraits d'*Ecballium elaterium* dans le traitement de différentes maladies.

## ***Références bibliographiques***

---

-A-

- Abbas, S. (2012).** Etude des propriétés de deux séries de substances d'origine naturelle : les cucurbitacines et les parabènes : analyse de leur biotransformation chez l'homme et mesure du pouvoir cytotoxique des cucurbitacines sur une lignée cellulaire de chondrosarcome humain. *Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de Docteur de l'université de Lorraine, 164p.*
- Adwan,G., Salameh, Y., & Adwan, K., (2011).** Effect of ethanolic extract of *Ecballium elaterium* against Staphylococcus aureus and Candida albicans. *Jornal of Asia and the Pacific of tropical biomedecine, 456-460.*
- Alcoceba, E., Gonzalez, M., Gaig, P., Figuerola, E., Auguet, T., & Olona, M. (2010).** Edema of the Uvula: Etiology, Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *J Investig Allergol Clin Immunol, 20(1): 80-83.*
- Attard, E. G. & Scicluna-Spiteri, A. (2001).** *Ecballium elaterium*: an in vitro source of Cucurbitacins. *Phytothérapie, 72 : 46-53.*
- Attard, E., Attard, H. (2002).** A Micropropagation Protocol for *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. *Cucurbit Genetics Cooperative Report, 25: 67-70.*
- Attard, E., Attard, H. (2008).** Antitrypsin activity of extracts from *Ecballium elaterium* seeds. *Phytotérapie, 79: 226–228.*
- Attard, E., Brincat, M.P., & Cuschieri, A. (2005).** Immunomodulatory activity of cucurbitacin E isolated from *Ecballium elaterium*. *Phytothérapie, 76: 439–441.*
- Aubaile-Sallenave, F. (2001).** Les cucurbitacées en Méditerranée. De Babylone à aujourd'hui: le cas de la courgette et d'al-Fāqūs. *Boccone, 13: 239-250.*

-B-

- Bar-nun, N. & Mayer, A. M. (1990).** Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by botrytis cinerea. *Phytochimie, 29 (3):787-791.*
- Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *MEDECINE/SCIENCES, 22: 266-72.*

- Benbrook ,C.M. (2005).** Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. *The Organic Center*, **84 p.**
- Ben-yakir, D., Gal, D., Chen, M., & Rosen, D. (1996).** Potential of *Aspongopus viduatus* F. (Heteroptera: Pentatomidae) as a Biocontrol Agent for Squirting Cucumber, *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. (Cucurbitaceae). *Contrôle biologique*, **7: 48–52.**
- Bidie, A., N'Guessan, B.B., Yapo, A.F., N'Guessan, J.D., & Djaman,A.J. (2011).** Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, **8 (1): 1 – 11.**
- Bilus'ic Vundac, V., Brantner, A.H., & Plazibat, M. (2007).** Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some Stachystaxa. *Food Chemistry*, **104: 1277–1281.**
- Bijoy, M., Jayati, S. & Prabir, K.S. (2008).** Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema. *Food Research International*, **41: 586 - 593.**
- Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., & Saykova, I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, **7, 35-45.**
- Bouزيد, W., Yahia, M., Abdeddaim, M., Aberkane, M.C. & Ayachi, A. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubepine monogyne. *Lebanese. Science journal*, **12(1): 59 - 69.**
- Bozin, B., Mimica-Duric, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. (2008).** Phenolics as anti oxydants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae). *Food Chemistry*, **111: 925-929.**
- Boizot, N ; Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *INRA* , 79-82.
- Blázovics A, Lugasi A, Szentmihályi K, Kéry A (2003) .** Reducing power of the natural polyphenols of *Sempervivum tectorum* in vitro and in vivo . *Acta Biologica Szegediensis*. **47(1 -4) , p: 99-102.**

**Brada, M., Bezzina, M., Marlier, M., Carlier, A. & Lognay, G. (2007).** Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **11(1)** : 3 – 7.

**Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R.C., & Rice-Evans, C. (1998).** Structural dependence of flavonoid interactions with  $\text{Cu}^{+2}$  ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.*, **330**: 1173-1178.

**Brunet, S. (2008).** Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. *Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de Docteur de l'université de Paul Sabatier*, **p246**.

**Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. *tec & toc, Paris*, **1120p**.

**-C-**

**Christodoulakis, N.S., Kollia, K., & Fasseas, C. (2011).** Leaf structure and histochemistry of *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. (Squirting cucumber). *Flora*, **206**: 191–197.

**Costantino, M., Coiro, V., Colutta, E., & Giampaolo, C. (2011).** Stress oxydatif & crénothérapie sulfurée. *Press Therm Climat*, **148**:71-77.

**couplan, F. (1998).** Nutritionnel des plantes : sauvages et cultivées. *Delachaux et niestlé, Paris*, **475p**.

**couplan, F (2009).** Le régal végétal: Plantes sauvages comestibles. *Ellebore, Paris*, **527p**.

**Curtay, J.P et Robin, J.M. (2000).** Intérêt des complexes antioxydants. Centre d'étude et développement de la nutrithérapie. *Phytothérapie*, **72** : 46-53.

**-D-**

**Darweesh, M., Agha, M., I., H. & Barkil, S. (2012).** Étude de contribution sur l'activité de *Ecballium elaterium* L. de la famille des cucurbitacées dans le traitement d'ictère hémolytique sur des rats. *Journal arabe des sciences pharmaceutiques- journal d'unité universitaires arabique*, **4** : 133-138.

- DE Moffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J., Lekeux, P. (2005).** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Ann. Méd. Vét.*, **149**: 1-9.
- Defraigne, J.O., Pincemail, J. (2007).** Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liege*, **62**: 1-10.
- Descamps-Latscha, B., Witko-Sarsat, V. (2003).** Le stress oxydant dans l'insuffisance rénale chronique et l'hémodialyse. *Néphrologie*, **24**: 377-379.
- Dibos, C. (2010).** Interactions Plante – Pollinisateur : caractérisation de la qualité du pollen de deux cucurbitacées durant son ontogenèse, sa présentation et son transport sur le corps de l'abeille domestique. *Thèse pour obtenir le grade de docteur en science agronomique, université d'Avignon et des pays de Vaucluse*, **191 p**.
- Diplok, A.T. (1991).** Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview. *Am J Clin Nutr*, **53**:189-93.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97**: 654-660.
- Donald, G., Barceloux, MD., Faact, Facmt, Facep. (2008).** medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals. *America*, 876-878p.
- ƒ**
- Evans, J.L; Goldfine, I.D; Maddux, B.A; & Grodsky, G.M. (2002).** Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*, **23**: 599-622.
- Ezura, H., Amagai, H., Yoshioka, K., & Oosawa, K. (1992).** Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of melon (*Cucumis melo* L.). *Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd*, **85**: 209-213.
- El Sayed, Z., Badr., W.H. (2012).** Cucurbitacin Glucosides and Biological Activities of the Ethyl Acetate Fraction from Ethanolic Extract of Egyptian *Ecballium elaterium*. *Journal of Applied Sciences Research*, **8**(2): 1252-1258.

## F

- Favel, A., Le-Nguyen, D., Coletti-Previero, M.A., & Castro, B. (1989).** Active site chemical mutagenesis of *Ecballium elaterium* Trypsin Inhibitor II: New micmproteins inhibiting elastase and chymotrypsin. *Communications biochimiques et biophysiques de recherches*, **162** : 79-82.
- Favier, A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Anales pharmaceutiques Françaises*, **64(6)**: 390 - 396.
- Feucht, W. et Treutter, D. (1999).** The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: Principles and practices in chemical ecology, *PRESS et BOCA RATON (Eds.)*, pp. 307-338.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M. & Barros, L. (2007).** Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, **100**: 1511–1516.

## G

- Gaboriaud, C., Vaney, M. C., Bachet, B., Le-Nguyen, D., Castro, B., & Mornon, J. P. (1989).** Crystallization and Preliminary X-ray Study of Porcine Trypsin, Free and Complexed with *Ecballium elaterium* Trypsin Inhibitor, a Member of the Squash Inhibitors Family. *Interactive des Macromolecules Biologiques*, **210**: 883-884.
- Galan, P., Preziosi, P., & Hercberg, S. (1994).** Vitamin Status of a healthy French population: dietary intakes and bio-chemical markers. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 220-233.
- Gassita, (1995).** La nouvelle pharmacopée pragmatique africaine (N.P.PA) justification scientifique et applications industrielles. *Pharm. Méd. trad. afro*, pp : 95-100.
- Goudable, J. & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénées et antioxydants. *Nutr. Clin. Métabol.*, **11**: 115 - 120.
- Greige-Gerges, H., Abou Khalil, R., Abou Mansour, E., Magdalou, J., Chahine, R., & Ouaini, N. (2007).** Cucurbitacins from *Ecballium elaterium* juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. *Interactions Chemico-Biologiques*, **169**: 53–62.

**-H-**

- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liège*, **62**: 628-638.
- Halliwell, B. (1994).** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev*, **52**: 253-265.
- Hylands, P.J., & Oskoui, M.T. (1979).** The structure of elasterol from *ecballium elaterium*. *Phytochimie*, **18**: 1543-1545.

**-J-**

- Jakopič, J., Veberič, R. & Štampar, F. (2009).** Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta agriculturae Slovenica*, **93**: 11 – 15.
- Jaradat, N., Jodeh,S., Rinno, T., Kharoof, M., Zaid, A.N., & Hannon, M. (2012).** Determiation the presence of phytomelin in *Ecballium elaterium* to approve its folk uses. *Journal international de pharmacies ET de sciences pharmaceutiques*, **4(2)** :233-237.
- Jean-Blain, C. (1998).**Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev. Méd. Vét.* **149**, 911-920.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic, M.G. (1994).** Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 4846-4851.

**-K-**

- Kocyan, A., Zhang, L.B., Schaefer, H., & Renner, S.S. (2007).** A multi-locus chloroplast phylogeny for the Cucurbitaceae and its implications for character evolution and classification. *Phylogenetic molecular and evolution*, **44**: 553–577.
- Kouamé, J., Gnoula, C., Palé, E., Bassolé, H., Guissou, I.P., Simporé, J. & Nikiéma, J.B. (2009).** Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). *Science et technique, Sciences de la santé*, **32** : 9 - 23.

**Krařtzner, R., Debreczeni, J.E., Pape, T., Schneider, T.R., Wentzel, A., Kolmar, H., Sheldrick, G.M. & Uson, I. (2005).** Structure of Ecballium elaterium trypsin inhibitor II (EETI-II): a rigid molecular scaffold. *Acta Cryst*, **61**: 1255–1262.

**Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A. & Abdelly, C. (2008).** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biologies*, **331**: 865–873.

**Kultur, S. (2007).** Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, **111**: 341–364.

-L-

**Laure, C., Cottereau, Ph., & Renard, R. (2002).** Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard. *Revue Française d'Œnologie*, **193** : 10-16.

**Lien, E.J, Ren, S., Bui, H.H., & Wang, R. (1999).** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants, *Free Radic Biol Med*, **26**: 285-94.

-M-

**Mansouri, N., Satrani, B., Ghanmi, M., El Ghadraoui, L. & Aafi, A. (2011).** Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata* du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **15**(3) : 415 - 424.

**Marfak, A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides, étude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges.

**Mehinagic, E., Bourles, E., & Jourjon, F. (2011).** Composés des fruits d'intérêt nutritionnel: impact des procédés de transformation sur les polyphénols. *Arboriculture*, **43** (6): 364–368.

**Miller, N.J & Rice-Evans, C.A. (1997).** The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink, *Food Chem* , **60** : 331-7.

**Morris, C.J., Earl, J.R., Trenam, C.W., & Blake, D.R. (1995).** Reactive oxygen species and iron--a dangerous partnership in inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, **27**: 109-122.

**Mpondo Mpondo, E., Dibong, S.D., Priso, R.J., Ngoye, A., & Ladoh Yemeda, C.F. (2012).** État actuel de la médecine traditionnelle dans le système de santé des populations rurales et urbaines de Douala (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*, **55**: 4036– 4045.

*-N-*

**Nacz, M., Shahidi, F., (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**: 95–111.

*-O-*

**Odabasoglu F., Aslan A., Cakir A., Suleyman H., Karagoz Y., Halici M, Bayir Y (2004) .** Comparison of Antioxidant Activity and Phenolic Content of Three Lichen Species. *Phytotherapy research*. ( **18**), p: 93 8–941.

*-P-*

**Packer, L; Tritschler, H.J; & Wessel ,K .(1997).** Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha – lipoic acid. *Free Radic Biol Med*, **22**: 359 – 378.

**Pastre, J. & Priymenko, N. (2007).** Intérêt des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Méd. Vét*, **158(4)** : 180-189.

**Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher , A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela-Raventos, R., Buxaderas, S. & Codina, C. (2006).** An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food chemistry*, **97** : 137-150.

**Pincemail, J., Lecomte, J., Collart, E., & Castiaux, J.P. (2001).** Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Medecine interne*, **6(5)** : 1-3.

**Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R. , & Defraigne, J.O. (1999).** Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Service de Chirurgie Cardiovasculaire*, **4** : 130-139.

**Polat, R., Satil, F. (2012).** An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir – Turkey). *Journal d'Ethnopharmacologie*, **139**: 626– 641.

**Popovici, C., Saykova, I. & Bartosz, T. (2009).**Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, **4** : 1313 - 8871.

-R-

**Re, R., Pellegrini, N., Proteggebnte, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Science Inc*, **26**:1231-1237.

**Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. & Zhang, L. (2003).**Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, **23(4)**: 519 - 534.

**Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., & Paganga, G. (1996).** Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med*, **20**: 933-956.

-S-

**Saad, H., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., Rode, K., Charrier, B. & Ayed, N. (2012).** Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products*, **40**: 239– 246.

**Salhab, A.S. (2013).** Human Exposure to Ecballium elaterium Fruit Juice: Fatal Toxicity and Possible Remedy. *Pharmacologie & Pharmacie*, **4**: 447-450.

**Sargm, S.A., Akçicek, E., Selvi, S. (2013).** An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, **150**: 860–874.

**Sasmakov, S.A., Putieva, Z.M., Azimova, S.S., & Lindequist, U. (2012).** In vitro screening of the cytotoxic, antibacterial and antioxidant activities of some Uzbek plants used in folk medicine. *Asian Journal of Traditional Medicines*, **7**: 73-80.

**Schaunberg, P. (2010).** Guide des plantes médicinales: Analyse, description et utilisation de 400p.

**Schofield, P., Mbugua, D.M. & Pell, A.N. (2001).** Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol*, **91**:21-40.

**Sies, H. (1991).** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, **91**: 315-385.

**Sommerhoff, C.P., Avrutina, O., Schmoltdt, H.U., Gabrijelcic-Geiger, D., Diederichsen, U., & Kolmar, H. (2010).** Engineered Cystine Knot Miniproteins as Potent Inhibitors of Human Mast Cell Tryptase $\beta$ . *Journal moléculaire biologique*, **395**: 167–17.

**Stalikas, D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci*, **30**: 3268–3295.

**Sultana, B., Anwar, F., & Przybylski, R. (2007).** Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. Trees. *Food Chemistry*, **104**: 1106–1114.

-*Œ*-

**Telli, A., Mahboub, N., Boudjeh, S., Siboukeur, O.E.K. & Moulti-mati, F. (2010).** Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera*) variété ghars. *Annales des Sciences et Technologie*, **2(2)**: 107 – 114.

**Toker, G., Memisoglu, M., Toker, M.C. & Yesilada, E. (2003).** Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. *Phytothérapie*, **74**: 618–623.

-U-

**Uslu, C., Karasen, R.M., Sahin, F., Taysi, S., & Akcay, F. (2006).** Effect of aqueous extracts of *Ecballium elaterium* rich, in the rabbit model of rhinosinusitis. *Journal international de l'otorhinolaryngologie pédiatrique*, **70**: 515—518.

-V-

**Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M. & Telser, J.(2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**: 44 - 84.

**Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., & Bast, A. (1996).** Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.*, **20**: 331-342.

**Viterbo, A., Yagen, B., Mayer, A.M. (1993).** Cucurbitacins, 'attack' enzymes and laccase in botrytis cinerea. *Phytochemistry*, **32**: 61-65.

-W-

**Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W. & Chen, F. (2006).** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, **97**: 705-711.

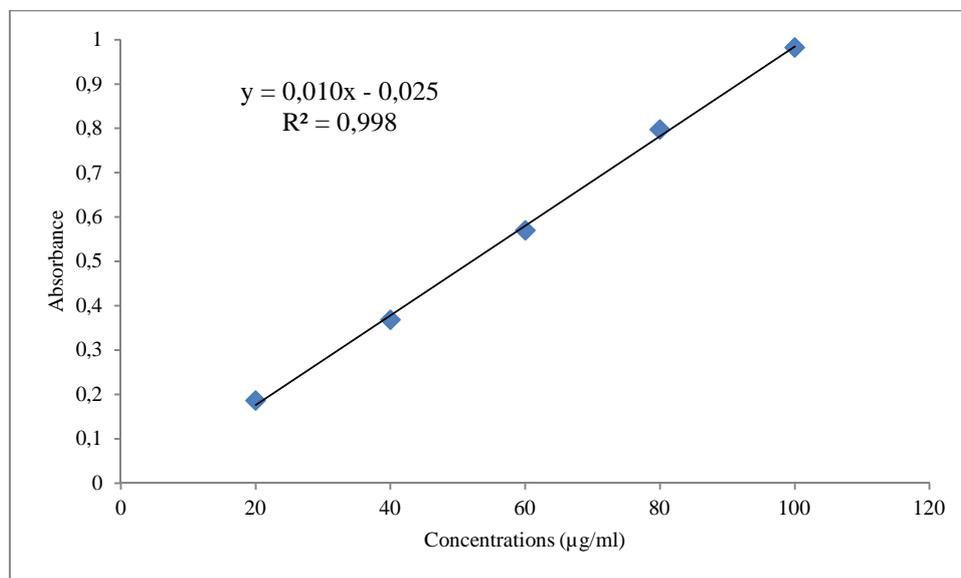
**Wu, S.J. & Ng, L.T. (2008).** Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT*, **41** : 323–330.

-Z-

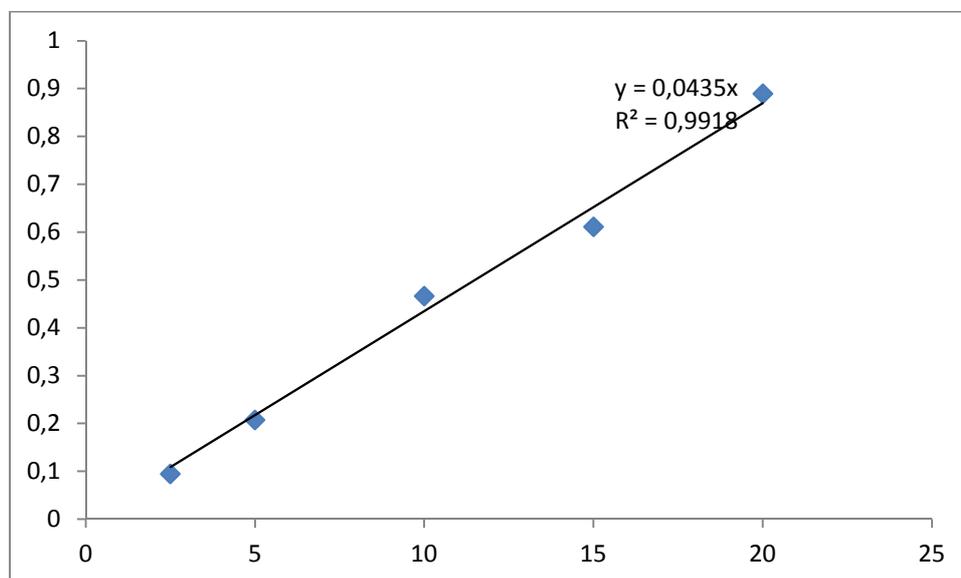
**Zhang, L.B., Simmons, M.P., Kocyan, K., & Renner, S.S. (2006).** Phylogeny of the Cucurbitales based on DNA sequences of nine loci from three genomes: Implications for morphological and sexual system evolution. *Phylogenetic molecular and evolution*, **39**: 305–322.

# ***Annexes***

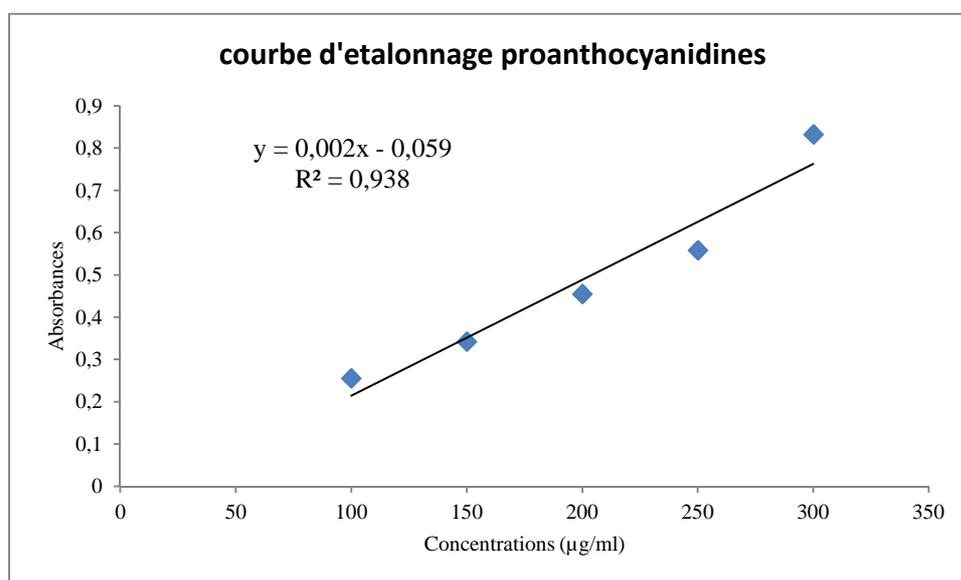
**Annexes n° 1: Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.**



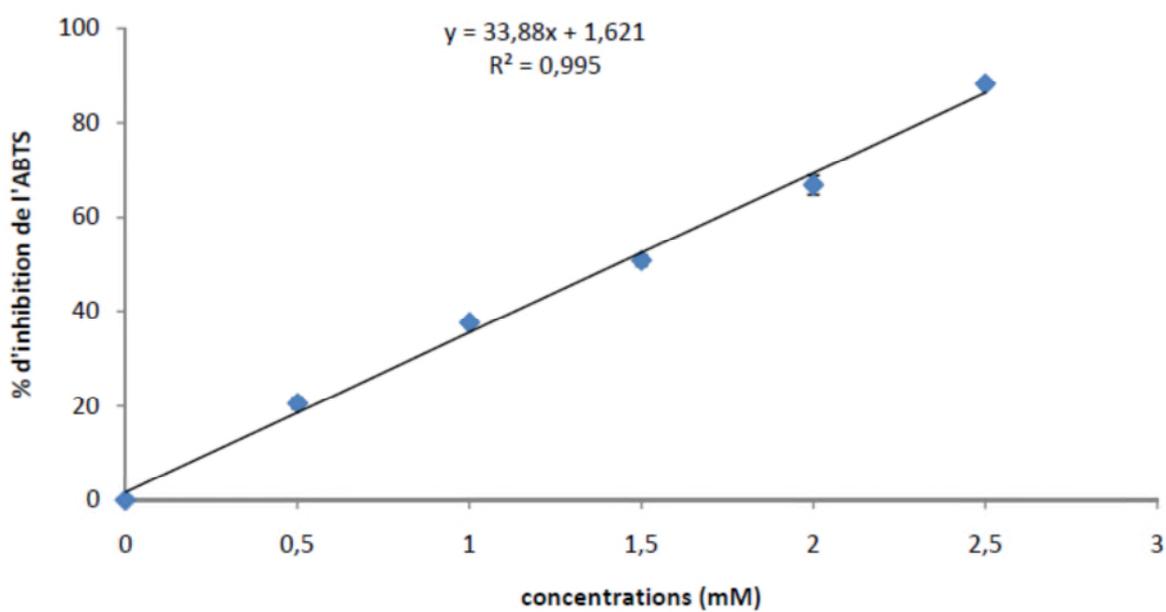
**Figure n° 1 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux



**Figure n° 2 :** Courbe d'étalonnage de la Quercétine pour le dosage des flavonoïdes



**Figure n° 3:** Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins condensé



**Figure n° 4:** courbe d'étalonnage du Trolox

## Annexes n° 2 : Courbes de calcul de l'EC<sub>50</sub> des cinq extraits

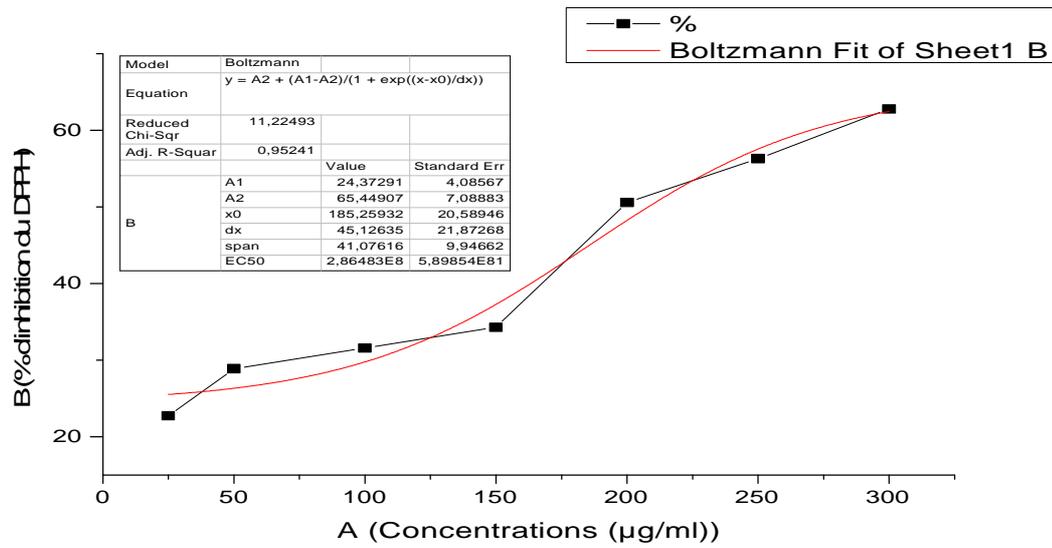


Figure n° 5: Calcul de l'EC<sub>50</sub> de l'extrait aqueux

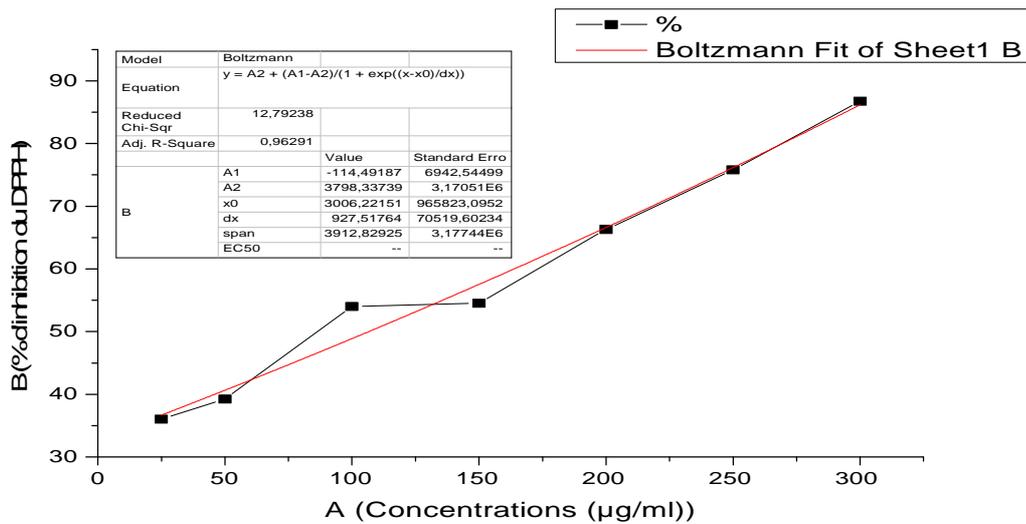


Figure n° 6: Calcul de l'EC<sub>50</sub> de l'extrait éthanolique

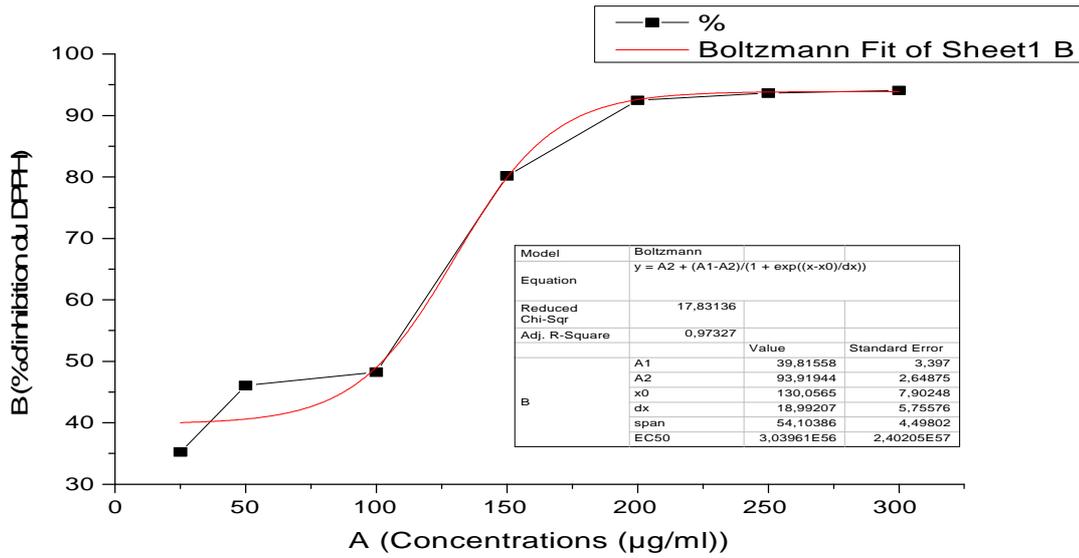


Figure n° 7: Calcul de l'EC<sub>50</sub> de l'extrait éthanolique à 70%

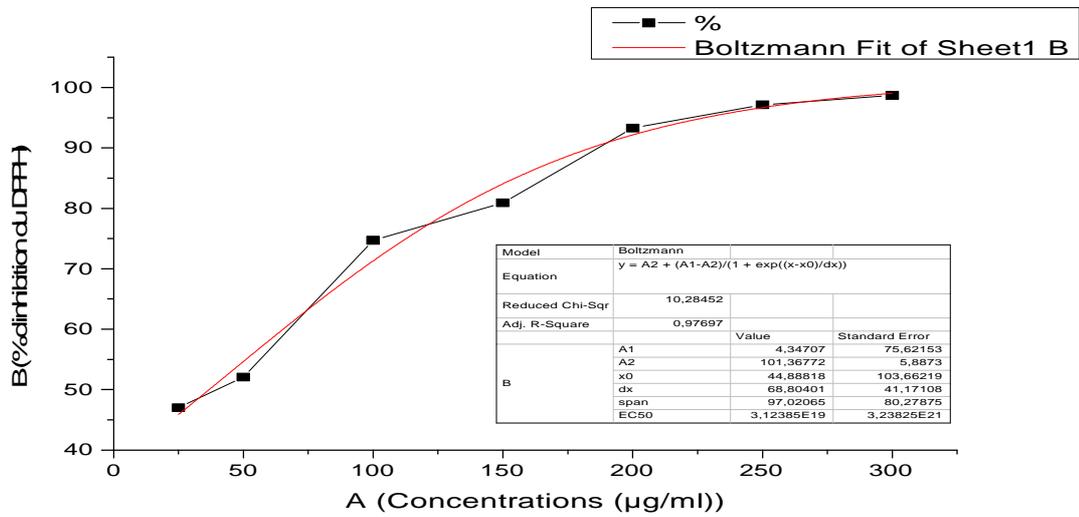


Figure n° 8: Calcul de l'EC<sub>50</sub> de l'extrait acetonique

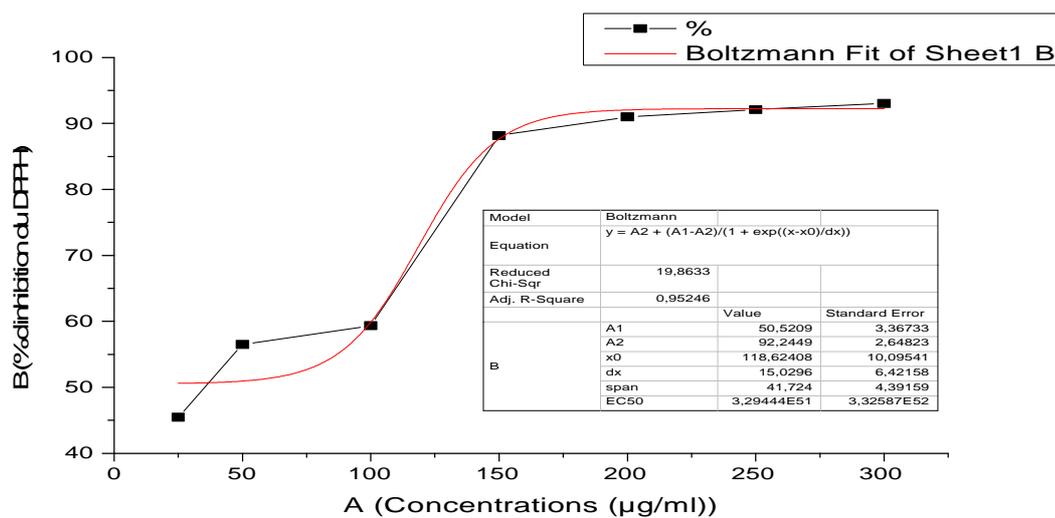


Figure n° 9: Calcul de l'EC<sub>50</sub> de l'extrait acétonique à 70%