



République Algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université A.MIRA-Béjaïa

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire

Présenté par :

DEGHIMA Amirouche

Pour l'obtention du diplôme de **Magister**

Filière : **Biologie**

Option : **Ingénierie Biochimique et biotechnologique**

Thème

Activités antioxydants et anti-inflammatoires des cucurbitacines et calystegines extraits d'*Ecballium elaterium* et de *Hyoscyamus albus*

Soutenu le 16/06/2015

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me} ZEBBOUDJ A. (Pr., U.A.M.B)

Rapporteur : M^{me} BEDJOU F. (Pr., U.A.M.B)

Examineurs : M^{me} KHETTAL B. (M.C.A., U.A.M.B)

M^r OUCHEMOUKH S. (M.C.A., U.A.M.B)

Année universitaire : 2014/2015

DEDICACES

À *ALLAH* le Glorieux, le Haut et à son Prophète
Muhammad, Paix et Salut sur Lui ainsi que sur
ses compagnons, sa famille et sur tous ceux qui
s'investissent sur la voie droite avec sincérité

Je dédie ce travail à ma **mère** la lumière de
ma vie Pour son soutien permanent

A mon cher père

A mes sœurs et mes frères

A tous mes amis

Amirouche

REMERCIEMENTS

Nous commençons par remercier dieu de nous avoir donné la force et la patience pour pouvoir mener ce travail.

Je remercie en premier lieu madame le professeur BEDJOU F. pour avoir accepté d'être ma directrice de mémoire, pour sa disponibilité, ses nombreux conseils et Encouragements, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie Madame le professeur ZEBBOUDJ A, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mes remerciements vont aussi aux docteurs KHETTAL B et OUCHEMOUKH S

Non seulement pour avoir accepté de donner de leur temps pour évaluer ce travail mais aussi pour leurs soutient et leurs conseils.

Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire de Biotechnologie végétale et ethnobotanique

Je remercie tous les membres du département BPC surtout, surtout Djamila

Je suis particulièrement reconnaissant à Mlle BOUREBABA L pour son aide et ses conseils tout au long de ce travail

Je remercie aussi tous les laborantins de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Bordj Bou Arreridj, pour leurs soutient tout au long de mes études.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin ...

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie bibliographique

Chapitre I

Généralités sur *Hyoscyamus albus* et *Ecballium elaterium*

I/ <i>Hyoscyamus albus</i>	2
I.1/ Généralités sur les Solanacées	2
I.2/ Le genre <i>Hyoscyamus</i>	2
I.3/ L'espèce <i>Hyoscyamus albus</i>	3
I.4/ Composition phytochimique	4
I.5/ Propriétés Pharmacologiques	6
II/ <i>Ecballium elaterium</i>	7
I.1/ Généralités sur les Cucurbitacées	7
I.2/ Le genre <i>Ecballium</i>	8
I.3/ L'espèce <i>Ecballium elaterium</i>	8
I.4/ Composition phytochimique	9
I.5/ Propriétés pharmacologiques	10

Chapitre II

Généralités sur les calystegines et les cucurbitacines

I/ Calystegines	13
I.1/ Historique	13
I.2/ Structure et Propriétés physico-chimiques	13
I.3/ Analyse chimique.....	17
I.4/ Distribution	18
I.5/ bio-Activité	18

II/ Cucurbitacines	19
I.1/ Historique	19
I.2/ Structure et Propriétés physico-chimiques	19
I.3/ Analyse chimique.....	22
I.4/ Distribution	22
I.5/ bio-Activité	23

Chapitre III

Stress oxydant, antioxydants et inflammation

I/ Activité antioxydants	24
I.1/ Le stress oxydant	24
I.2/ Les maladies liées au stress oxydant	24
I.3/ Les antioxydants	24
I.3.1/ Les antioxydants endogènes	25
I.3.2/ Les antioxydants exogènes	25
I.3.3/ Les antioxydants d'origine végétale	26
II/ Activité anti-inflammatoire	26
II.1/ L'inflammation	26
II.2/ Les types d'inflammation	26
II.2.1/ L'inflammation aiguë	26
II.2.2/ L'inflammation chronique.....	27
II.3/ L'inflammation et les neutrophiles	27
II.4/ L'inflammation et la dénaturation protéique.....	28

Partie Experimentale

Chapitre IV

Matériels et méthodes

I/ Préparation du matériel végétal	29
I.1/Récolte et identification des plantes	29
a) <i>Hyoscyamus albus</i>	29
b) <i>Ecballium elaterium</i>	30
I.2/ Séchage, broyage et tamisage	31
II/ Méthodes	32
II.1/ Extraction des substances bioactives	32
a) Extraction des Calystegines	32
b) Extraction des Cucurbitacines	35
II.2/ Evaluation de l'activité antioxydants	37
II.2.1/ Inhibition du radical libre DPPH	37
II.2.2/ Inhibition du radical cation ABTS	38
II.2.3/ Pouvoir réducteur	40
II.2.4/ Effet anti-hémolytique	41
II.3/ Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (<i>In-vitro</i>)	42
II.3.1/ Stabilisation membranaire par hémolyse hypotonique.....	42
II.3.2/ Inhibition de la dénaturation protéique (Albumine humaine)	45
III/ Traitement statistiques	46

Chapitre V

Résultats et discussions

I/ Rendements d'extraction	47
I.1/ <i>Ecballium elaterium</i>	47
I.2/ <i>Hyoscyamus albus</i>	48

II/ Activité antioxydants	49
II.1/ Inhibition du radical libre DPPH	49
I.1.1/ <i>Ecballium elaterium</i>	49
I.1.2/ <i>Hyoscyamus albus</i>	53
II.2/ Inhibition du radical cationique ABTS	56
II.2.1/ <i>Ecballium elaterium</i>	56
II.2.2/ <i>Hyoscyamus albus</i>	59
II.3/ Pouvoir réducteur	61
II.3.1/ <i>Ecballium elaterium</i>	62
II.3.2/ <i>Hyoscyamus albus</i>	64
II.4/ Effet anti- hémolytique	66
II.4.1/ <i>Ecballium elaterium</i>	66
II.4.2/ <i>Hyoscyamus albus</i>	68
III/ Activité anti-inflammatoire	70
III.1/ Stabilisation membranaire (hémolyse hypotonique)	70
III.1.1/ <i>Ecballium elaterium</i>	70
III.1.2/ <i>Hyoscyamus albus</i>	73
III.2/ Dénaturation des protéines	74
III.2.1/ <i>Ecballium elaterium</i>	74
III.2.2/ <i>Hyoscyamus albus</i>	75
Conclusion	78
Références bibliographiques	79
Résumés	

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
AAPH	2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride
ABTS	2,2'-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique
ADC	Arginine décarboxylase
AGPI	Acides gras polyinsaturés
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluene
CAT	Catalase
CG	Chromatographie en phase gazeuse
CG-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
DAO	Diamine oxidase
DPPH	2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle
GSH	Glutathion
GSH-Px	Glutathion peroxydase
HPLC	High performance liquide chromatography
HTA	Hypertension artérielle
IC₅₀	Inhibitory concentration 50= Concentration inhibitrice 50
IgG	Immuno-globuline G
MLCCC	Multilayer coil countercurrent chromatography
MS	Mass Spectrometry
NSAIDs	Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs= Médicament anti-inflammatoire non stéroïdien
ODC	Ornithine décarboxylase
PBS	Phosphat buffer salin = Tampon phosphate salin
PMNs	polymorphonuclear leukocytes=leucocyte polymorphe nucléaire
PMT	Putrescine N-methyltransferase
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Reactive oxygen species = Espèces réactifs de l'oxygène
SAM	S-adenosylmethionine
SD	Standard deviation = Ecart type
SM	Spectrométrie de masse
SOD	Superoxyde dismutase
TAC	Total antioxydant capacity = capacité antioxydant totale
TCA	Tri chlor acetic = Tri chlor acétique
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TR	Tropinone reductase
UV	Ultra-violet

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	<i>Hyoscyamus albus</i>	3
02	Principaux alcaloïdes tropaniques de <i>Hyoscyamus albus</i>	5
03	<i>Ecballium elaterium</i>	8
04	Structure des calystegines	14
05	Le squelette Cucurbitane	19
06	Structure de quelques cucurbitacines	21
07	<i>Hyoscyamus albus</i> : à gauche plante avec fleur, à droite plante avec graines	29
08	<i>Ecballium elaterium</i> en pleine floraison	30
09	Carte géographique des deux sites de récolte	31
10	Préparation des extraits bruts de <i>Hyoscyamus albus</i>	33
11	Purification des Calystegines	34
12	Préparation d'extrait brut d' <i>Ecballium elaterium</i>	35
13	Purification des cucurbitacines	36
14	Réduction du radical DPPH par un antioxydant	37
15	Protocole d'inhibition du radical DPPH	38
16	Protocole d'inhibition du radical ABTS	39
17	Mesure du pouvoir Réducteur	40
18	Effet anti-hémolytique	42
19	Stabilisation membranaire –hémolyse hypotonique-	44
20	Protocole d'inhibition de la dénaturation d'albumine	45
21	Rendement en cucurbitacines des différentes parties d' <i>Ecballium elaterium</i>	47
22	Rendement des différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i>	48
23	Pouvoir anti-DPPH des différentes parties d' <i>Ecballium elaterium</i>	50
24	Pouvoir anti-DPPH des standards utilisés (BHA et BHT)	51
25	IC50 des différentes parties d' <i>Ecballium elaterium</i> , BHA et BHT	52
26	Pouvoir anti-DPPH des différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i>	53
27	Activité anti-DPPH des différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i> , BHA et BHT	54
28	Inhibition du radical ABTS par les différentes parties d' <i>Ecballium elaterium</i>	56

29	Inhibition du radicale ABTS par les standards (BHA,BHT,Ac.Ascorbique)	57
30	Courbe d'étalonnage du TROLOX	58
31	Inhibition du radicale ABTS par les différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i>	59
32	Pouvoir réducteur des différentes parties d' <i>Ecballium elaterium</i>	62
33	Pouvoir réducteur du Trolox et de l'acide ascorbique	63
34	Courbe d'étalonnage du Trolox pour le pouvoir réducteur	63
35	Pouvoir réducteur des différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i>	65
36	Effet anti-hémolytique de différentes parties d' <i>Ecballium</i>	67
37	Effet anti-hémolytique de l'ac.ascorbique et du TROLOX	68
38	Effet anti-hémolytique de différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i>	69
39	Stabilisation membranaire par les différentes parties d' <i>Ecballium elaterium</i> et les standards (Aspirine et Voltarène)	71
40	Stabilisation membranaire par les différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i> et les standards (Aspirine et Voltarène)	73
41	Inhibition de la dénaturation d'albumine par les différentes parties d' <i>Ecballium elaterium</i> et les standards	74
42	Inhibition de la dénaturation d'albumine par les différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i> et les standards	75

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Classification taxonomique de <i>Hyoscyamus albus</i>	4
II	Classification taxonomique d' <i>Ecballium elaterium</i>	9
III	Quelques activités pharmacologiques d' <i>Ecballium elaterium</i>	12
IV	Propriétés physico-chimiques des calystegines	16
V	Modification chimique du squelette cucurbitane conduisant au différents cucurbitacines	20
VI	Données géographiques des sites de récolte	30
VII	TEAC des différentes parties EE et les standards	58
VIII	TEAC des différentes parties HA et les standards	60
IX	La TAC des différentes parties d' <i>Ecballium elaterium</i> et l'acide ascorbique	64
X	TAC des différentes parties de <i>Hyoscyamus albus</i> et l'acide ascorbique	65

Introduction

Introduction

La littérature biomédicale continue à supporter les suggestions indiquant que les radicaux libres et d'autres espèces réactives sont impliquées dans différentes maladies humaines. Elles sont impliquées dans plus de 100 désordres, s'étendant de la sclérodermie et du choc hémorragique à la cardiomyopathie et la mucoviscidose à l'ischémie gastro-intestinale, perte auditive et même calvitie masculine (**Davies et al., 2001**).

Les plantes ont été employées depuis les débuts de l'humanité et sont toujours employées dans le monde entier pour la préservation de la santé et le traitement des maladies. Les plantes et les sources naturelles forment la base de la médecine moderne d'aujourd'hui, 25% des médicaments prescrits sont d'origine végétale. On estime que le marché mondial annuel pour ces produits a approché 60 milliards de dollars. Les plantes sont employées comme thérapie complémentaire aux médicaments. Cependant, dans beaucoup de sociétés en développement, la médecine traditionnelle est le seul système des soins disponible et abordable (**Benzie et Galor, 2011**).

Actuellement, les plantes sont utilisées pour traiter divers maux et problèmes tels que les maladies cardio-vasculaires, dépression, inflammation, et pour stimuler le système immunitaire. Les plantes sont riches en composés actifs dont beaucoup sont des métabolites secondaires, incluant les substances aromatiques (polyphénols, flavonoïdes, tanins, tritèrpenes, alcaloïdes) plusieurs ont des propriétés antioxydants (**Benzie et Galor, 2011**).

Ecballium elaterium et *Hyoscyamus albus*, sont parmi les plantes qui possèdent en même temps des propriétés médicales. Les effets attribués à ces plantes sont dues principalement à leur production en cucurbitacines pour *Ecballium elaterium* et calystegines pour *Hyoscyamus albus* (**Rios et al., 2007**).

L'objectif de ce travail est :

- l'extraction des cucurbitacines d'*Ecballium elaterium*, et les calystegines de *Hyoscyamus albus*, des différentes parties de chaque plante (Feuilles, fleurs, fruits et graines)
- L'évaluation in-vitro des activités antioxydants (effet scavenger vis-à-vis du DPPH et ABTS, pouvoir réducteur), l'étude in vitro de l'effet protecteur des extraits contre

l'hémolyse oxydative des érythrocytes, étude préliminaire in-vitro de l'activité anti-inflammatoire (stabilisation membranaire et dénaturation protéique).

Partie
Bibliographique

Chapitre I

*Généralités sur Hyoscyamus
albus et Ecballium elaterium*

I/ *Hyoscyamus albus*

I.1/ Généralités sur les Solanacées

Les solanacées sont des plantes herbacées, arbres, arbustes ou lianes largement répandus dans les régions tropicales des deux hémisphères, très bien représentées dans l'Amérique du sud et tropicale, moins nombreuses dans les régions tempérées. Cette famille compte près de 147 genres et environs 2930 espèces, la plupart de ces membres étant toxiques en raison de la présence d'alcaloïdes de type tropaniques et stéroïdiques. Ces plantes sont largement utilisées en pharmacie et certaines espèces sont de puissants stupéfiants, notamment dans les genres *Nicotiana* (tabac), *Atropa* (belladone) et *Datura* (pomme épineuse). Il est cependant assez paradoxal que cette famille fournisse également de nombreuses plantes alimentaires telle que le poivre de Cayenne, les poivrons rouges et verts (*Capsicum* spp), les tomates (*Solanum lycopersicum*), les aubergines (*S. melongena*) et les groseilles du Cap (*Physalis ixocarpa*). Beaucoup de genres de la famille fournissent également des plantes ornementales, dont le genre *Brunfelsia*, *Cestrum*, *Datura*, *Pétunia*, *Physalis* (la lanterne chinoise) et le genre *Solanum* (Judd et al., 2002).

I.2/ Le genre *Hyoscyamus*

Le genre *Hyoscyamus* (Jusquiame) comporte des plantes herbacées annuelles ou bisannuelles, mesurant généralement de 30 à 100 cm de hauteur. Ces plantes sont une source naturelle d'alcaloïdes tropaniques telle que l'hyoscyamine, très recherché pour ses vertus médicales. Les espèces du genre produisent également des calystégines, puissants inhibiteurs des β -glucosidases en quantités importantes (Ebizuka et Nagata, 2002).

Les jusquiames se distribuent à partir des îles Canaries en Europe et Afrique du Nord à l'Asie. Comptant quelques 15 espèces centrées dans les régions méditerranéennes, les Jusquiames font partie des plantes toxiques les plus connus de la famille des Solanacées (Burrows et Tyrl, 2013).

Ce genre est une réserve importante de plantes médicinales dont l'utilisation remonte à l'histoire ancienne. Les espèces les plus étudiées sont *H. Niger*, *H. albus*, et *H. muticus*, qui contiennent des principes actifs ainsi que des propriétés pharmacologiques similaires. Selon de nombreuses pharmacopées, les molécules actives se concentrent essentiellement dans les parties aériennes des plantes, fraîches ou séchées (Baja, 2001).

I.3/ L'espèce *Hyoscyamus albus*

a) Description

Appelée Jusquiame blanche en Français ou bien white henbane en Anglais, sikrane en Arabe, c'est une espèce toxique de la famille des Solanacées.

La jusquiame blanche (**Figure n°1**) est une plante herbacée bisannuelle originaire d'Europe du sud ; légèrement nitrophile, on la retrouve essentiellement dans les champs, au bord des routes, sur les décombres et les endroits pierreux (**Minelli, 2004**) .

Hyoscyamus albus est une plante de 40 à 90 cm de hauteur, pubescente (portant des poils fins plus ou moins espacés) collante avec une tige ligneuse à la base. Son odeur est vireuse et nauséabonde ; ses feuilles sont larges, évasées, dentelées, visqueuses, d'un vert pâle, très velues, leur saveur est herbacée et très-peu âcre ; ses fleurs qui éclosent entre juillet et août sont en forme de cloches, jaunes tachetées de pourpre et non veinée contrairement à la fleur de la jusquiame noire ; Le fruit est une capsule entourée par un calice (**Gautier, 1822 ; Bojnanský et Fargašová, 2007 ; Paquereau, 2013**) .

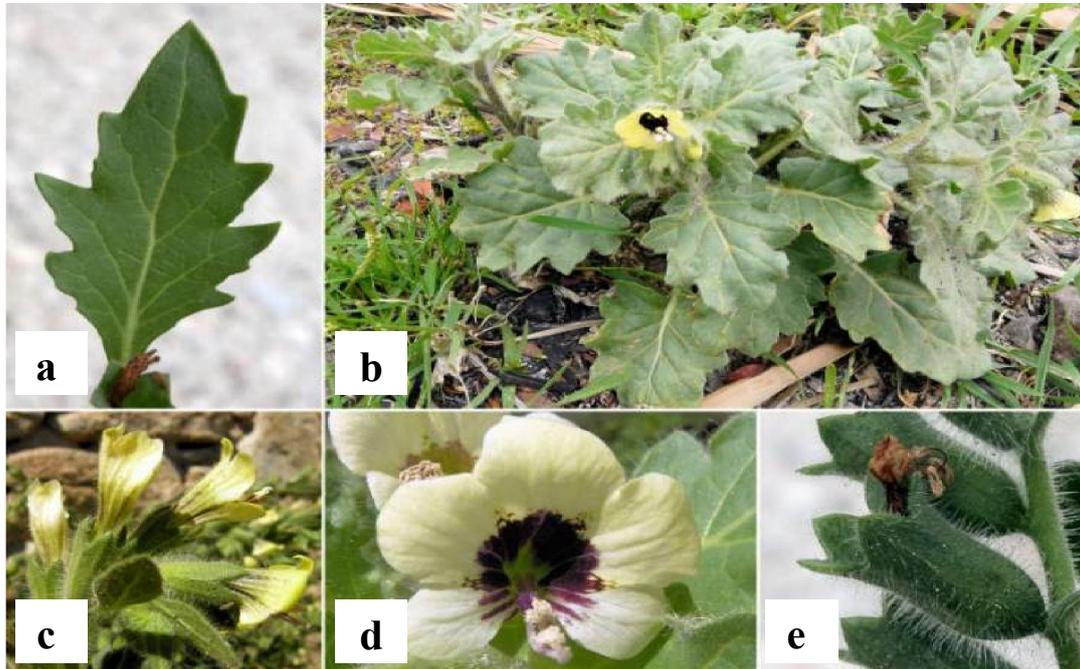


Figure 01 : *Hyoscyamus albus* (Andrea Moro)

a : feuille ; b : plante entière ; c : fleurs ; d : fleurs avec tache pourpre ; e : calisse

b) Classification systématique de l'espèce

La systématique de *Hyoscyamus albus* est présentée dans le **tableau N° I**.

Tableau n°I : Classification taxonomique de *Hyoscyamus albus* (Hoffmann, 2013)

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Solanales
Famille	Solanaceae
Genre	<i>Hyoscyamus</i>
Espèce	<i>Hyoscyamus albus</i>

I.4/ Composition phytochimique

En tant que membre de la famille des solanacées, la jusquiame blanche est très riche en alcaloïdes tropaniques caractéristique de cette famille. Quantitativement et qualitativement, la composition en alcaloïdes de la jusquiame blanche semble similaire à celle de *Hyoscyamus niger* (jusquiame noire) appartenant au même genre (Evans, 2002) .

La proportion en alcaloïdes totaux dans la poudre séchée de *Hyoscyamus albus* varie de 0,045% à 0,14%. Le principal constituant des feuilles de la jusquiame blanche est donc l'alcaloïde Hyoscyamine et ses dérivés ((-)-6-bêta-hydroxyhyoscyamine, N-Oxydes hyoscyaminiques et hyoscine-N-oxydes), mais on retrouve également de plus petites quantités d'atropine et de scopolamine (Figure n° 2), d'apoatropine, de tropine, de cuscohygrine, de skimmianine et d'alpha-et bêta-belladonine (Evans, 2002 ; Khare, 2004) .

Les graines de la jusquiame renferment quant à elles environ 0,5 à 0,6% d'alcaloïdes tropaniques, composés principalement de Hyoscyamine et d'une faible proportion de Hyoscine (Lunga et al., 2006) .

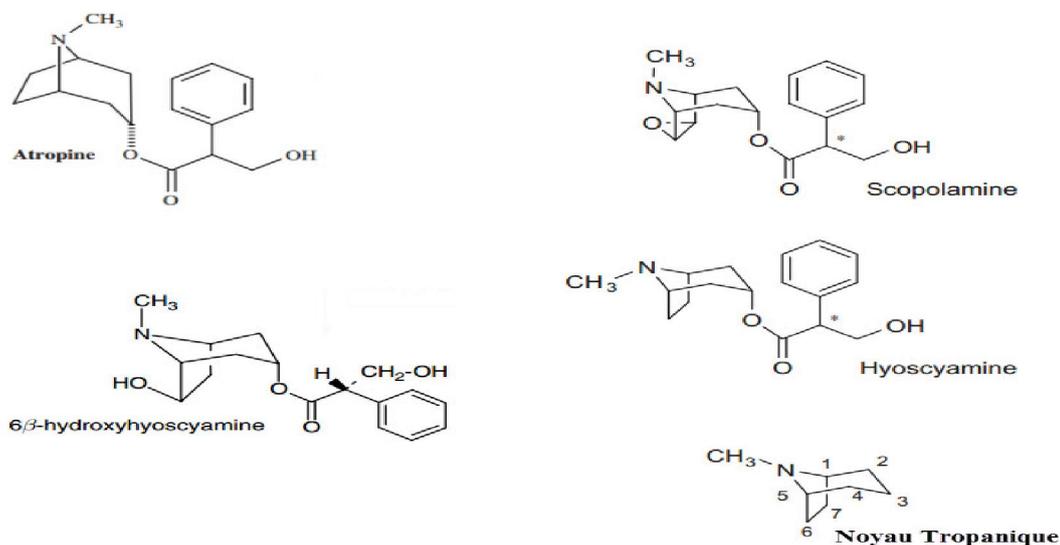


Figure 02 : Principaux alcaloïdes tropaniques de *Hyoscyamus albus* (Barceloux, 2008; Fattorusso et cafati, 2008)

En plus de sa richesse en alcaloïdes tropaniques, la jusquiame blanche synthétise également des alcaloïdes nortropaniques et des alcaloïdes de la classe des Calystégines. Ces derniers ont été découverts récemment par **Tepfer et ses collaborateurs en 1988**. La plupart des calystégines ont été isolés à partir de plantes appartenant à la famille des solanacées. (Bekkouche et al., 2001) Les calystégines ont été détectés à la fois dans les racines et les feuilles de ces végétaux. Les cultures cellulaires des racines de *Hyoscyamus albus* contiennent entre 30 et 160 µg de calystégine A₃/g de matière sèche. Il a été montré également que les feuilles de *H. albus* contiennent des concentrations plus élevées en calystégines du groupe B (Drager et al., 1994), mais également les calystégines A₃ (47 µg/g), B₁ (40 µg/g) , B₂ (75 µg/g), B₃ (47 µg/g), ainsi que calystégine N₁, détecté pour la première fois dans cette espèce (Bekkouche et al., 2001) .

Les autres constituants que produit cette plante sont essentiellement : un principe amer glucosidique appelé hyoscytricine, de la rutine, des stérols (environ 0.12%), de la choline, du mucilage, de l'albumine, de l'oxalate de calcium et du nitrate de potassium. Il y a aussi 20% d'huile fixe présente dans les graines de la jusquiame (Lunga et al., 2006 ; Azimova et Glushenkova, 2012) .

I.5/ Propriétés Pharmacologiques

Les jusquiames, notamment Noir (*Hyoscyamus Niger*) et blanche (*Hyoscyamus. albus*), ont longtemps été utilisés comme herbes médicinales, hallucinogènes et magiques en Europe et en Extrême-Orient. La jusquiame blanche était ainsi l'une des herbes les plus utilisées en médecine traditionnelle de nombreux pays, et fut même intégrée dans de nombreux ouvrages médicaux romains, Grecs et Anglo-saxons qui ont d'ailleurs constitué la base de la pharmacopée médicale européenne durant plus de 1500 ans (**Williams, 2013**) .

Les préparations à base de jusquiame exercent des actions périphériques sur le système nerveux autonome et les muscles lisses ainsi que sur le système nerveux central, les principales substances psychos-actives présentes dans les feuilles et les graines de la jusquiame sont les alcaloïdes tropaniques : atropine, hyoscyamine et scopolamine, de ce fait *Hyoscyamus albus* a été utilisé depuis l'antiquité à diverses fins thérapeutiques, mais également en tant qu'un puissant poison (**Blom, 2010 ; Khare, 2004**) .

- La jusquiame blanche est connue pour ses propriétés sédatives, elle donne ainsi de bons résultats dans le traitement de l'asthme bronchique, de la toux spasmodique, des affections pulmonaires, de l'intestin et des organes génito-urinaires (**Khare, 2004**).
- Elle est utilisée en tant qu'analgésique et particulièrement dans le cas des douleurs affectant les voies urinaires dues à des calculs rénaux (**Khare, 2004**).
- Elle possède des effets antispasmodiques qui soulagent les tremblements et la rigidité observés dans les stades précoces de la maladie de Parkinson et permet également la relaxation des organes gastro-intestinaux. Les recherches ont montré que les préparations de jusquiame produisent un effet anti-cholinergique ou parasympholytique par inhibition compétitive de l'acétylcholine. Cette inhibition affecte l'action muscarinique de l'acétylcholine, mais pas son effet nicotinique (**Khare, 2004**).
- Cette plante combine l'action thérapeutique de l'hyoscyamine et de la scopolamine et est donc très efficace dans le traitement de différents types d'irritations nerveuses ou névralgies comme les névralgies cervico-brachiales et les névralgies faciales (**Baja, 1990**) .

- L'huile extraite à partir des graines de *Hyoscyamus* est utilisée pour le traitement des Otites chez l'enfant, des névralgies, de la sciatique, et des rhumatismes (**Roberts et Wink, 1998 ; Khare, 2004**) .
- La jusquiame Blanche présente aussi une activité antibactérienne importante contre des espèces bactériennes comme *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Klebsiella pneumoniae* (**kadi et al., 2013**) .

La jusquiame est également une plante toxique. Les symptômes d'une intoxication sont assez semblables à ceux observés avec la belladone et l'intoxication par l'atropine. Ils comprennent une mydriase, des troubles de la vision, de la tachycardie, des vertiges, une sensation d'étouffement, un assèchement de la gorge, une constipation, une rétention urinaire, des hallucinations, du délire aboutissant au coma puis la mort. Tous ces symptômes sont dus à l'inhibition de l'action de l'acétylcholine au niveau de ses récepteurs dans la synapse nerveuse, bloquant de ce fait la fonction physiologique du système nerveux parasymphatique. Les premiers effets ont tendance à durer pendant 3 à 4 h, mais les effets hallucinatoires peuvent continuer plus de 3 jours (**Blom, 2010**) .

II/ *Ecballium elaterium*

II.1/ Généralités sur les Cucurbitacées

Les cucurbitacées sont des plantes herbacées ou sous-ligneuse et grimpantes largement distribuées dans les régions tropicales et subtropicales, quelques espèces se rencontrent dans les régions tempérées. Cette famille est constituée de 118 genres et de 825 espèces. Ces végétaux constituent une famille très importante pour leur fruits et leur graines comestibles, appartenant à des genres comme *Cucurbita* (le potiron, la courge et la courgette), *Cucumis* (le melon, le concombre, le cornichon) et *Citrullus* (la pastèque). Les fruits séchés de *Lagenaria* (la calebasse) sont utilisés comme des poteries et les fruits secs de *luffa* constituent l'éponge végétale. Certaines comme *Mornordica*, ont des propriétés médicinales (**Judd, 2002**) .

II.2/ Le genre *Ecballium*

Ce sont des plantes monoïques ou dioïques, annuelles à vivaces. Ce genre n'a pas beaucoup de valeur horticole. C'est un genre d'une seule espèce, *Ecballium elaterium*, avec une sous-espèce monoïque et une sous-espèce dioïque. On les trouve dans les régions Méditerranéennes de l'Afrique du Nord et en Asie du Sud-ouest (Kubitzki, 2011) .

II.3/L'espèce *Ecballium elaterium*

a) Description

Appelé aussi Concombre sauvage, Momordique élatère, ou Concombre d'âne, c'est une plante vivace, un peu glauque, fétide et nauséabonde, hérissée de poils rudes qui croit dans le sud-ouest de l'Europe et en Afrique du Nord en terrains caillouteux, dans les décombres et sur des talus. La Momordique est un végétal qui demeure proche du sol par ses tiges épaisses, succulentes, mais dépourvus de vrilles. Ses feuilles assez charnues, triangulaires et cordiformes, sont sinuées, dentées et blanchâtres au-dessous. 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 (se distinguant bien du Cornichon qu'il mime). En effet, à maturité, sous la pression de son contenu, il se détache assez soudainement de son pédoncule et projette alors, par l'orifice ainsi créé, ses graines tenues à plusieurs décimètres, méritant bien son nom latin de Genre (du grec Ecballô: je lance au dehors) (Boullard, 2001) (Figure n°3) .



Figure 03 : *Ecballium elaterium* (Ryan et James , 2008)

b) Classification systématique de l'espèce

La systématique de cette espèce est présentée dans le **tableau n° II**.

Tableau n° II : Classification taxonomique d'*Ecballium elaterium* (Lindley, 1836 ; Quézel et Santa, 1963)

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Cucurbitale
Famille	Cucurbitaceae
Genre	<i>Ecballium</i>
Espèce	<i>Ecballium elaterium</i>

II.4/ Composition phytochimique

Les plantes de la famille des cucurbitacées, sont connues pour leur production de Triterpénoïdes de type Cucurbitane. Certains de ces triterpénoïdes présentent des activités cytotoxiques, anti-tumorale, hépatoprotectrice et anti-inflammatoire (Xu et al., 2011) .

Le concombre d'âne a été la première plante de la famille dans la quelle une cucurbitacine fut isolé. A cette époque, le composé fut nommé élaterine (α – elaterine) identifié plus tard comme étant la cucurbitacine E (Gry et al., 2006) .

Les cucurbitacines sont des triterpénoïdes principalement tétracycliques, très oxygénés au goût amer, ces substances dérivent du squelette cucurbitane (Miro, 1995) .

Les cucurbitacines E, B, D et I peuvent être retrouvées dans tous les tissus végétaux de la plante (racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits). Des quantités appréciables sont retrouvées dans les fruits, mais seulement des traces dans les autres tissus (**Gry et al., 2006**).

Deux cucurbitacines glycosidiques ont été isolées et caractérisées à partir du jus de fruit de la plante, il s'agit des cucurbitacines B et D avec le glucose comme partie glycosidique, de plus, l'analyse du contenu en cucurbitacine B dans ce même extrait par HPLC a détecté jusqu'à 24,8 g / kg de matière sèche (**Gry et al., 2006**).

Le jus de fruit d'*E. elaterium* a un pH légèrement acide ($5,62 \pm 0,21$) et l'elaterine (cucurbitacine E) représente approximativement $2,1 \pm 0,1\%$ (w/w) du jus de fruits frais, il est exempt de fibres et contient principalement des glucides réducteurs et des minéraux (**Greige-Gerges et al., 2007**).

En plus des triterpénoïdes, *Ecballium elaterium* produit un certain nombre d'autres métabolites secondaires, représentés principalement par des caroténoïdes (Carotène) et des tannins (Précurseurs de tannins phénoliques) mais à des concentrations moindres (**Zellagui et al., 2012**).

II.5/ Propriétés pharmacologiques

Le concombre d'âne est depuis longtemps utilisé comme remède à de nombreux maux. Les utilisations de cette plante sont relativement anciennes, et la méthode utilisée pour sa préparation aujourd'hui est la même que celle décrite à l'époque grecque (mélange de poudre des fruits et de lait appliqué dans les narines) (**Attard et Attard, 2008**).

Les peuples de la Méditerranée orientale, actuellement la Turquie et la Grèce, sont assez familiers avec le concombre sauvage. Carolus Linnaeus a donné à la plante son nom scientifique moderne, *Ecballium elaterium*; elaterium est un nom du médicament tiré de la sève (appelé aussi elaterine), et ekballios est un nom grec et signifie l'avortement. Ainsi, le nom donné par Linné est «drogue de l'avortement».

- Le traité d'Hippocrate sur les problèmes des femmes a affirmé que le concombre sauvage était «un puissant abortif pour l'utérus" et l'auteur a ajouté que c'était la pilule abortive de choix.

Des Essais récents sur les animaux appuient l'idée que le concombre sauvage a un effet abortif. Lorsque des souris reçoivent des doses quotidiennes de 20 à 100 mg/Kg d'extraits de la plante entière ou des fleurs seules, on constate une absence d'ovulation chez elles (**Riddle, 1997**).

- Dans la médecine traditionnelle arabe et Hindoue, *Ecballium* est utilisée comme laxatif, et le jus des fruits pour le traitement de l'otite et comme remède pour nettoyer le cerveau des substances toxiques
- En médecine populaire géorgienne, la plante est utilisée comme remède à la fièvre paludéenne.
- Dans la médecine traditionnelle turque, la Momordique est utilisée dans le traitement de la jaunisse ainsi que des maux de tête.
- *Ecballium elaterium* en poudre (précipité à partir du jus de fruit) mélangé avec du lait est utilisé comme application nasale pour soigner l'ictère et guérir les maux de tête persistants. Elle est également utilisée dans le traitement de la sinusite (**Preedy et al., 2011**).
- En homéopathie, *Ecballium* est utilisée contre la diarrhée ou le cholera infantiles. Mais ses plus intéressantes potentialités relèvent peut-être de son effet antiviral (**Boullard, 2001**).
- *E. elaterium* est utilisé pour traiter la constipation, les rhumatismes et dans le cas de certaines intoxications de par son effet émétique (**Attard et Attard, 2008**).

En raison de ses propriétés toxiques, *Ecballium elaterium* n'est plus utilisé en médecine. Le jus de fruit de la plante a une longue histoire d'utilisation comme purgatif « drastique », et des cas d'œdème de la lèvre et du voile du palais dû à l'administration nasale de jus de fruits ont été rapportés (**Gry et al., 2006**).

Ecballium elaterium est fortement purgatif et le contenu de son fruit se révèle violemment diurétique. Le fruit vert renferme un glucoside spécifique qui se compose de glucose et d'elaterine, c'est ce composé néoformé qui confère à l'*Ecballium* son pouvoir purgatif très marqué, irritant pour les muqueuses, ce qui explique ses actions ; gastro-intestinale (face à une atonie de l'intestin par exemple) (**Boullard, 2001**).

Plusieurs études ont été menées pour prouver et mettre en évidence les différentes activités biologiques d'*Ecballium elaterium*. Parmi les activités étudiées on a l'activité anticancéreuse

(**Bohlooli et al., 2012**), l'activité antitrypsique (**Attard et Attard, 2008**), l'activité antimicrobienne (**Adwan et al., 2011**), l'activité anti-inflammatoire (**Uslu et al., 2006 ; Ahmad et al, 1995 ; Yesilada et al 1988**), activité anti-ictérique et hépato-protectrice (**Greige-Gerges et al., 2007 ; Saleh, 2007**) et l'activité analgésique et antipyréique (**Ahmad et al, 1995**)

Chapitre II

Généralités sur les calystegines et les cucurbitacines

I/ Calystegines

I.1/ Historique

En 1988, afin d'isoler des métabolites secondaires hydrophiles produits dans les racines des végétaux en tant que signaux écologiques influençant la rhizosphère, les scientifiques ont étudié près de 105 espèces de plantes, représentant 26 familles. A cette effet, les extraits bruts des organes végétaux souterrains et aériens ont été préparés et les composés séparés par électrophorèse à haute tension et visualisés par coloration au nitrate d'argent (**Andersson, 2002**).

Parmi les composés chimiques identifiés, un intérêt particulier a été donné à une paire de substances désignées comme calystegines A et B, isolés la plante *Calystegia sepium* (liseron des haies), une plante appartenant à la famille des Convolvulacées. Les calystegines ont également été détectés dans *Convolvulus arvensis* (liseron des champs, Convolvulaceae) et *Atropa belladonna* appartenant à la famille des Solanaceae (**Andersson, 2002**).

Les structures des ces nouveaux alcaloïdes ont été élucidées en tant que squelettes à noyau nortropane non-estérifiés, avec trois ou quatre groupes hydroxyle, et ont été désignés comme calystegines A3, B1, et B2. Les calystegines ont reçu leur nom de la plante, *Calystegia sepium*. L'activité inhibitrice de la Glycosidase a été déterminée pour les calystegines peu de temps après leur détection, et ceci a intensifié l'intérêt pour ces alcaloïdes.

I.2/ Structure et Propriétés physico-chimiques

❖ Structure

Les calystegines possèdent trois caractéristiques structurelles en commun : un cycle nortropane, une fonctionnalité aminocétale qui génère un groupe hydroxyle tertiaire en tête de pont du noyau bicyclique, et deux à quatre groupes hydroxyle supplémentaires variant en position et en stéréochimie. Ces composés ont été subdivisées en trois groupes ; calystegine A, B et C sur la base du nombre de groupes hydroxyle présents (**Andersson, 2002**).

Les calystegines du groupe A ont chacun trois groupes hydroxyles, les calystegines du groupe B en ont quatre, et les calystegines du groupe C en ont cinq. La numérotation des calystegines individuelles au sein de chaque classe suit généralement la date du premier isolement et identification. Cependant, les calystegines A1, A2 et A4 ont été numérotés en tant que pics

HPLC et leurs structures ne sont pas encore élucidées. Par conséquent, les calystegines du groupe A ont été numérotés comme A5, A6 et A7 (Drager et Biastoff, 2007).

Après étude de nombreuses espèces de la famille des solanacées, des Convolvulaceae, et des genres *Morus* dans la famille des Moraceae, on a distingué 14 alcaloïdes différents nommés comme calystegines, en plus de deux glycosides de calystegine, leurs structures sont illustrées dans la **figure 4** (Drager et Biastoff, 2007) .

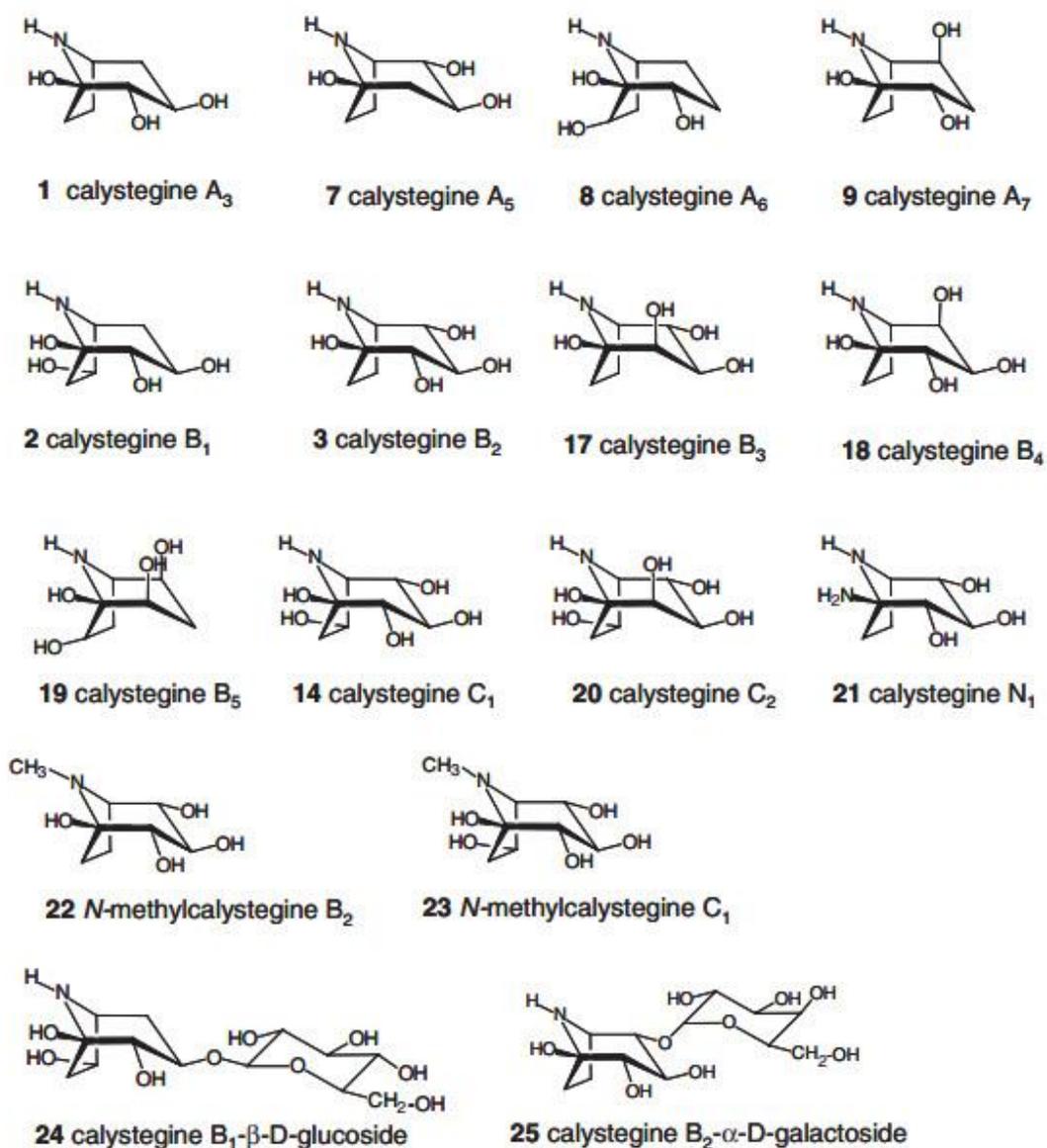


Figure 04: Structure des calystegines (Drager et Biastoff, 2007)

Quelques calyslegines échappent à la structure caractéristique générale décrite ci-dessus. Le calystegine N porte un substituant amine à la place d'un groupe hydroxyle sur le carbone 1 de la structure nortropane (position de tête de pont), en plus de trois groupes hydroxyle sur les atomes de carbone 2,3 et 4 de la structure bicyclique (**Andersson, 2002**).

Il est à noter que le calystegine N subit une conversion d'environ 40% en calystegine B2 (ayant un groupe hydroxyle sur le carbone 1) après stockage de six mois à 4 ° C. Ceci suggère que les alcaloïdes nortropaniques avec un substituant amine en position de tête de pont peuvent être très labiles à des températures ambiantes, ou peuvent subir une conversion facile pour les dérivés hydroxylés au cours de l'isolement (**Andersson, 2002**).

Le calystegine N peut être un artefact ou produit secondaire formé à partir du calystegine B2 au cours de l'échange d'ions lors de la purification chromatographique en utilisant de l'hydroxyde d'ammonium comme éluant lors de la purification des calystegines (**Andersson, 2002**).

❖ Propriétés physico-chimiques

A température ambiante, la plupart des calysiegines sont des poudres incolores, qui se dissolvent facilement dans l'eau en raison des nombreux groupes hydroxyle qu'ils portent (**Andersson, 2002**).

Le **tableau IV** résume quelques propriétés physico-chimiques des calystegines.

Tableau IV : Propriétés physico-chimiques des calystegines. (Drager et Biastoff, 2007)

Alcaloïdes	Formule Chimique	masse Moléculaire	Pka	Solubilité dans (H ₂ O) ^b	K _{OW}
Calystegine A3	C ₇ H ₁₃ O ₃ N	159.18	8.27±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.091±0.427
Calystegine A5	C ₇ H ₁₃ O ₃ N	159.18	8.27±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.162±0.415
Calystegine A6	C ₇ H ₁₃ O ₃ N	159.18	8.00±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.213±0.429
Calystegine A7	C ₇ H ₁₃ O ₃ N	159.18	8.10±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.241±0.416
Calystegine B1	C ₇ H ₁₃ O ₄ N	175.18	7.22±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.715±0.462
Calystegine B2	C ₇ H ₁₃ O ₄ N	175.18	7.34±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.072±0.488
Calystegine B3	C ₇ H ₁₃ O ₄ N	175.18	7.34±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.072±0.488
Calystegine B4	C ₇ H ₁₃ O ₄ N	175.18	7.30±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.072±0.488
Calystegine B5	C ₇ H ₁₃ O ₄ N	175.18	7.06±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.580±0.469
Calystegine C1	C ₇ H ₁₃ O ₅ N	191.18	6.30±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.585±0.525
Calystegine C2	C ₇ H ₁₃ O ₅ N	191.18	6.30±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.585±0.525
Calystegine N1	C ₇ H ₁₃ O ₄ N	174.20	9.72±0.70	H ₂ O pH10 ts	-1.483±0.570
N-Methyl-calystegine B2	C ₈ H ₁₅ O ₄ N	189.21	7.28±0.70	H ₂ O pH10 s	-1.108±0.465
N-Methyl-calystegine C1	C ₈ H ₁₅ O ₅ N	205.21	6.24±0.70	H ₂ O pH10 s	-1.498±0.506

La constante de dissociation est exprimée comme des valeurs PK_a

La solubilité dans l'eau à 25° : ts= très soluble ≥ 1mol/L; s= soluble 0.1-1 mol/L

K_{ow}: Constante de partage Octanol-eau exprimé en Log P

Les alcaloïdes de la **figure 4** portant un groupement hydroxyle sur le carbone 1 (1-hydroxy aminocétal) sont des bases fortes. Ils ont dans la plupart du temps des valeurs calculé de pKa supérieur à 9, et approchent ceux du pseudotropine (PKa = 10.80) et du norpseudotropine (PKa = 10.86) qui sont des bases fortes. Tous les calystegines naturels ont une structure bicyclique (**Drager et Biastoff, 2007**).

Tous les calystegines et d'autres alcaloïdes Di ou tri-hydroxynortropaniques sont hydrophiles, leur coefficient de partage octanol-eau est bien en-dessous de zéro (**Tableau IV**). Dans les systèmes d'extraction liquide-liquide entre l'eau et une phase organique ils resteront dans la phase aqueuse, même si le pH est supérieur à 7. Cette propriété a empêché leur détection auparavant, car l'analyse classique des alcaloïdes inclut l'extraction liquide des bases libres

d'alcaloïdes par les solvants organiques d'un extrait alcalinisé d'eau (**Drager et Biastoff, 2007**).

I.3/ Analyse chimique :

L'isolement des calystegines a suivi des méthodes d'enrichissement qui ont été développées pour l'isolement d'autres polyhydroxy alcaloïdes, tels que le swainsonine et le 1- deoxynojirimycin qui sont aussi des alcaloïdes hydrosolubles (**Drager et Biastoff, 2007**).

Les calystegines sont fortement hydrosolubles et ne peuvent pas être isolé par les techniques conventionnelles de séparation des alcaloïdes qui utilisent la séparation acide-base avec des solvants organiques non-polaire. La chromatographie d'échange d'ions est intensivement utilisée pour la séparation de la fraction alcaloïdique des composés neutres et acides présent dans l'extrait (**Drager et Biastoff, 2007**).

La chromatographie sur couche mince n'est pas bien adaptée pour l'analyse des calystegines, cela est dû à leur polarité élevée et à leur forte hydrophilie. Ce qu'on reproche à cette technique est la faible séparation des différents composés et la difficulté de les visualisés. La chromatographie sur couche mince permet la séparation des calystegines A, B et C, mais ne peut pas séparer les diverses formes dans chaque groupe de composés. Les groupes de calystegines séparés sont visualisés par coloration avec des révélateurs de sucres tels que le nitrate d'argent (**Drager et Biastoff, 2007**).

D'autres méthodes pour la détection et l'analyse des alcaloïdes sont : La chromatographie liquide à haute performance, et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS). La résolution obtenue par CG, combinée avec l'information structurale de la MS fait de la CG-MS une méthode analytique de choix. La CG-MS exige une procédure pénible de dérivation, c'est pour ça qu'on a exploré la possibilité de séparer les divers calystegines par l'électrophorèse capillaire après leur complexation avec du borate. Contrairement aux calystegines libres, les complexes entre les calystegines et le borate absorbent la lumière UV et peuvent être détectés à l'UV.

I.4/ Distribution

Au début, on pensait que les calystegines ne se trouvaient pas dans les parties aériennes des plantes, mais ceci n'est plus vrai. En effet presque toutes les plantes qui ont montré des calystegines dans les racines, en contiennent des proportions plus élevées dans les parties aériennes. On ne connaît pas encore si les alcaloïdes sont produits dans les tissus aériens, ou transportés à ces tissus à partir des racines. La concentration des calystegines dans les fruits et légumes comestibles, cependant, semble être relativement basse mais cette conclusion est basée sur un ensemble de données très limité. Le poivron doux, les aubergines et les patates douces sont les plantes comestibles contenant le taux total le plus élevé de calystegines allant jusqu'à 80 mg/kg de poids frais. Les pommes de terre et les tomates contiennent moins de ces composés, au total 1-10 mg du calystegine A3, B1, B2 et C1. Le piment piquant, Tomatille, coquerets comestibles, tamarillo et airelles, contiennent de faibles quantités de calystegines. **(Andersson, 2002)**

I.5/ Bio-Activité

Les calystegines présentent une variété d'activités biologiques, qu'on peut résumer dans les points suivants :

- 1- Inhibition des glycosidases par leur similitude avec les monosaccharides.
- 2- Effet cytotoxiques, antivirale, antidiabétique.
- 3- Activité allelopathique (inhibe la croissance des autres plantes)
- 4- Activité répulsive des insectes. **(Drager et Biastoff, 2007)**

II/ Cucurbitacines

II.1/ Historique

Le premier cucurbitacine a été isolé sous forme de substance cristalline en 1831. La substance isolée a été nommée α -elaterine. Les tentatives pour déterminer sa structure chimique ont été entreprises dès le début du 20^{ème} siècle, mais sans aucun succès jusqu'aux années 60 du même siècle. L'élucidation de la structure chimique était la percée qui a déclenché l'identification des cucurbitacines dans la famille des cucurbitacées et dans d'autres familles de plantes (Gry et al., 2006).

II.2/ Structure et Propriétés physico-chimiques

❖ Structure

Les Cucurbitacines sont des triterpènes tétracycliques avec un squelette cucurbitane (Figure 05). Ils diffèrent de la plupart des autres triterpènes tétracycliques car ils sont fortement insaturés et contiennent de nombreux céto-, hydroxy- et acetoxy-groupes (Gry et al., 2006)

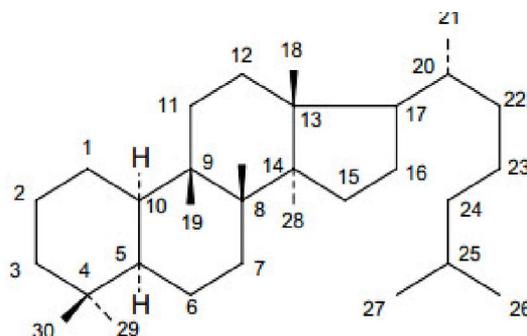


Figure 05 : Le squelette Cucurbitane (Gry et al., 2006)

La structure de base des triterpènes est formée par six unités d'isoprène. Les Cucurbitacines sont des dérivés de l'hydrocarbure triterpène cucurbitane dont le nom est 19 (10-9 β)-abeo-5 α -lanostane; (Figure 05), qui une fois modifié par des substituants contenant l'oxygène et les doubles liaisons produit les divers cucurbitacines. Quelques cucurbitacines couramment rencontrés dans les plantes sont décrits dans le Tableau V et sur la Figure 06 (Gry et al., 2006).

Les Cucurbitacines sont les triterpénoïdes les plus oxygénés avec un groupe diméthyle à C4 et trois groupes méthyliques à C9, C13, et C14, respectivement. Certains d'entre eux sont les substances les plus amères connues. À la différence des stéroïdes communs, ils ne sont pas méthylés en C-10. Les cucurbitacines sont généralement isolés en tant que glycosides (**Gry et al., 2006**).

Tableau V : Modification chimique du squelette cucurbitane conduisant au différents cucurbitacines (Gry et al., 2006)

Cucurbitacine	Groupe Chimique sur Carbone									Double liaisons	
	2	3	11	16	19	20	22	24	25		
A	OH _β	=O	=O	OH _α	OH	OH _β	=O		OAc	Δ ⁵	Δ ²³
B	OH _β	=O	=O	OH _α		OH _β	=O		OAc	Δ ⁵	Δ ²³
C		OH	=O	OH _α	OH	OH _β	=O		OAc	Δ ⁵	Δ ²³
D	OH _β	=O	=O	OH _α		OH _β	=O		OH	Δ ⁵	Δ ²³
E	OH _β	=O	=O	OH _α		OH _β	=O		OAc	Δ ¹	Δ ⁵
I	OH _β	=O	=O	OH _α		OH _β	=O		OH	Δ ¹	Δ ⁵
J	OH _β	=O	=O	OH _α		OH _β	=O	OH _α	OH	Δ ¹	Δ ⁵
K	OH _β	=O	=O	OH _α		OH _β	=O	OH _β	OH	Δ ¹	Δ ⁵
L	OH _β	=O	=O	OH _α		OH _β	=O		OH	Δ ¹	Δ ⁵

Les glycosides de cucurbitacines, ont généralement le saccharide lié à l'atome du carbone 2 (2-O-β-glycosides). À l'exception des cucurbitacines A, J, et K, les cucurbitacines cités dans le **tableau V** ont tous été rencontrés dans les plantes comestibles de la famille des cucurbitacées. Les cucurbitacines les plus communs dans cette famille sont le cucurbitacine B et D (**Gry et al., 2006**).

Les positions chimiquement réactives des molécules de cucurbitacines sont les nombreux groupes de cétone et d'alcool présent dans leurs structures (Gry *et al.*, 2006) .

II.3/ Analyse chimique :

Les cucurbitacines sont généralement extraits de la matière végétale avec du méthanol ou de l'éthanol. Les aglycones ont une faible solubilité dans l'eau, mais leur solubilité est très importante dans le chloroforme. La partition entre ces deux solvants est fréquemment employée pour une purification partielle des cucurbitacines des extraits alcooliques des plantes (Gry *et al.*, 2006 ; Rios *et al.*, 2007) .

La purification des cucurbitacines est réalisée par chromatographie sur colonne avec gel de silice ou alumine ou par chromatographie sur couche mince avec les mêmes gels. Actuellement on utilise la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), et la spectrométrie de masse (SM), ou une combinaison de ces méthodes. Les élucidations les plus récentes de structure des cucurbitacines ont été effectuées par des méthodes basées sur la MS et la RMN, alors que les analyses quantitatives courantes sont habituellement exécutées avec des méthodes basées sur l'HPLC. Une chromatographie sur couche mince en phase inverse et une HPLC toujours en phase inverse, ont été développées pour déterminer spécifiquement le niveau des glycosides du cucurbitacine E. Dans les plantes en croissance, les cucurbitacines sont généralement présents comme glycosides (2 β -O-glucosides). Ceux-ci sont fréquemment hydrolysés par l'élaterase avant extraction pour donner l'aglycone. Les cucurbitacines libres sont produits naturellement dans les graines des plantes (Gry *et al.*, 2006; Rios *et al.*, 2007) .

II.4/ Distribution :

Les cucurbitacines sont trouvés dans beaucoup de plante de la famille des cucurbitacées. Ils sont plus communs dans les genres, Bryonia, Cucumis, cucurbita, Luffa, Coccinia, Echinocystis, Lagenaria et Citrullus, et dans l'espèce *Ecballium elaterium*. Les cucurbitacines sont responsables du goût amer de ces plantes (Gry *et al.*, 2006 ; Rios *et al.*, 2007) .

Le niveau des cucurbitacines varient entre les différents tissus. Ils peuvent être concentrés dans les fruits et les racines des plantes mûres mais ne produisent que des feuilles et des tiges légèrement amères. Dans beaucoup de plantes, les racines sont le seul tissu amer. Généralement les cucurbitacines atteignent leurs concentrations maximales à maturité de la

plante. Les graines contiennent généralement des concentrations très basses en cucurbitacines (**Gry et al., 2006 ; Rios et al., 2007**) .

Les plantes produisant les cucurbitacines ont été également identifiées en dehors de la famille des cucurbitacées. Parmi ces derniers, les diverses espèces du genre *Gratiola* (Scrophulariaceae), *Bégonia tuberhybrida* (Begoniaceae), *Anagallis arvensis* (Primulaceae), *Phormium tenax* (Liliaceae), *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae), et *Purshia tridentata* (Rosaceae). Les graines de certaines plantes crucifères, comme diverses espèces *Iberis* et *Lepidium sativum* contiennent aussi des cucurbitacines (**Gry et al., 2006 ; Rios et al., 2007**) .

II.5/ Bio-Activité

L'activité pharmacologique des plantes médicinales, des extraits bruts, et leurs fractions purifiées obtenues à partir des plantes produisant des cucurbitacines a été rapportée dans différentes revues. Les cucurbitacines semblent être responsables des effets pharmacologiques et biologiques principaux de ces plantes et de leurs extraits (**Rios et al., 2007**) .

Parmi les différentes activités on peut citer :

- ✓ Activités anti-inflammatoire et analgésique
- ✓ Activités cytotoxique et anticancéreuse
- ✓ Inhibition de la tyrosinase et de la synthèse de la mélanine
- ✓ Activité hépato-protectrice et anti ictérique
- ✓ Activité antimicrobienne (**Rios et al., 2007**)

Chapitre III

***Stress oxydant,
antioxydants et
inflammation***

I/ Activité antioxydants

I.1/ Le stress oxydant :

Les réactions d'oxydation et de réduction dans les systèmes biologiques (réactions redox) représentent la base pour de nombreux mécanismes biochimiques. Un agent réducteur, ou antioxydant, est une substance qui donne des électrons, tandis qu'un oxydant, ou agent pro-oxydant, est une substance qui accepte des électrons. Les cellules sont constamment exposées aux oxydants produits par des processus physiologiques, tels que la respiration mitochondriale et physiopathologique telles que l'inflammation, le métabolisme de composés étranger, et les radiations (**Toro et Rodrigo, 2009**).

Le stress oxydant est un nouveau concept qui regroupe les effets biologiques des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans les mécanismes conduisant à plusieurs maladies. Ces espèces réactives, principalement des radicaux libres, sont produits naturellement dans les cellules en état physiologique et peuvent être bénéfiques à basse concentration. Cependant, elles sont nocives aux concentrations élevées. On parle de stress oxydant lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), et la capacité du système biologique à les détoxifier ou de réparer les dommages qui en résultent (**Toro et Rodrigo, 2009**).

I.2/ Maladies liées au stress oxydant :

Le stress oxydant a été largement étudié durant les 20 dernières années. Il joue un rôle important dans les dommages cellulaires, et il est impliqué de manière significative dans plusieurs physio-pathologies de maladies fortement répandues. Parmi les maladies liées au stress oxydant on peut citer ; les maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle (HTA), athérosclérose, accident vasculaire cérébral), les Syndromes métaboliques, Les diabètes type I et type 2, les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), toxémie gravidique, vieillissement, cancer, glaucome et insuffisance rénale. (**Toro et Rodrigo, 2009**)

I.3/ Les antioxydants

Toutes les formes de vie maintiennent un environnement réducteur dans les cellules. L'entretien de cet environnement est réalisé par le système de défense antioxydant, qui

protège l'homéostasie cellulaire contre les ROS nocifs produits normalement par le métabolisme cellulaire, ou dans les états physiopathologiques.

Les substances antioxydants sont des petites molécules qui peuvent neutraliser les radicaux libres en acceptant ou en donnant un électron. Typiquement, ceci signifie que la molécule antioxydant neutralise un ROS en une molécule plus stable et moins réactive. **(Toro et Rodrigo, 2009)**

Les molécules antioxydants peuvent être produites de manière endogène ou apportées à l'organisme de manière exogène à travers le régime alimentaire.

I.3.1/ Antioxydants endogènes :

Les principales enzymes antioxydants endogènes sont la superoxyde dismutase (SOD) , la catalase (CAT), et la glutathion peroxydase (GSH-Px). La SOD convertit l'anion super oxyde en eau oxygénée (H_2O_2), qui est un substrat pour la CAT et le GSH-Px. La catalase métabolise H_2O_2 en H_2O et oxygène et la GSH-Px réduit H_2O_2 et les hydroperoxydes organiques en réagissant avec le glutathion (GSH). Le glutathion réduit est présent à des concentrations élevées dans toutes les cellules des mammifères, particulièrement dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Ce tripeptide protège les groupes thiols des protéines contre l'oxydation non-enzymatique ou agit comme Co-substrat de GSH-Px. **(Toro et Rodrigo, 2009)**

I.3.2/ Antioxydants exogènes :

Les antioxydants exogènes, tels que les vitamines E et C, sont localisés dans le milieu intracellulaire et extracellulaire. Ils réagissent avec les ROS et les neutralisent. L'intérieur lipidique hydrophobe des membranes exige un éventail différent d'antioxydants. La vitamine E liposoluble est l'antioxydant le plus important dans cet environnement et qui preserve l'intégrité membranaire. **(Toro et Rodrigo, 2009)**

Les antioxydants liposoluble sont importants, ils empêchent les acides gras polyinsaturés membranaire (AGPI) de subir la peroxydation lipidique. Les antioxydants hydrosolubles comprenant la vitamine C qui jouent un rôle principal dans la neutralisation des ROS dans la phase hydrophile. **(Toro et Rodrigo, 2009)**

D'autres petites molécules antioxydants sont également naturellement présentes dans le plasma, tel que l'acide urique et la bilirubine. Récemment, on a constaté que les poissons, les huiles de poisson, et quelques légumes contiennent les acides gras furannes qui neutralisent les radicaux libres. (Toro et Rodrigo, 2009)

I.3.3/ Antioxydants d'origine végétale :

Les herbes et les épices ont été identifiées comme sources de divers composés phytochimiques, dont certains possèdent une puissante activité antioxydant. Les antioxydants d'origine végétale existent sous diverses formes, avec les polyphénols et les caroténoïdes comme les plus grands groupes de composés. Ceux-ci ont différentes fonctions et sont produits par les plantes pour protéger leurs cellules contre des dommages oxydants. (Toro et Rodrigo, 2009)

II/ Activité anti-inflammatoire :

II.1/ L'inflammation :

L'inflammation est une réponse physiopathologique constituée d'un système inné cellulaire et humorale qui se déclenche après des lésions tissulaires (exposition à la chaleur ou exposition au froid, réperfusion, ischémie, traumatisme, etc.). L'inflammation est caractérisée par la chaleur, rougeur, douleur, gonflements et des fonctions perturbées. Les médicaments les plus utilisés généralement pour le traitement des pathologies inflammatoires sont les médicaments anti-inflammatoires nonstéroïdiens (NSAIDs pour Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs), qui ont plusieurs effets secondaires particulièrement l'irritation gastrique menant à la formation des ulcères gastriques (Charles et al., 2003).

II.2/ Les types d'inflammation :

II.2.1/ Inflammation aiguë :

La réponse inflammatoire aiguë est définie comme une série de réponses tissulaires qui se produit dans les premières heures qui suivent les lésions tissulaires. C'est une orchestration complexe d'événements comportant une fuite d'eau, de sels, et protéines du compartiment vasculaire vers le site d'inflammation ; activation des cellules endothéliales ; interactions adhésives entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire ; recrutement des leucocytes ; activation des macrophages tissulaires ; activation des plaquettes et de leur agrégation ;

activation du complément ; coagulation et systèmes fibrinolytiques ; et libération des protéases et des oxydants des cellules phagocytaires. Le premier signe in vivo de la réponse inflammatoire aiguë est l'adhérence des neutrophiles (leucocytes polymorphe nucléaires, PMNs) à l'endothélium vasculaire (margination) (Charles et al., 2003).

II.2.2/ Inflammation chronique :

L'inflammation chronique n'est pas une persistance de l'inflammation aiguë mais elle est définie morphologiquement par la présence des lymphocytes, des macrophages, et des cellules de plasma dans les tissus. Le terme chronique n'est par conséquent pas lié à la durée de la réponse inflammatoire. Dans beaucoup de cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pour de longues périodes (mois ou années). Elle est provoquée par l'enclenchement persistant de réactions immunitaires innées et acquises, comme dans le rhumatisme articulaire (Charles et al., 2003).

II.3/ L'inflammation et les neutrophiles :

Les neutrophiles jouent un rôle durant les deux phases de l'inflammation : dans la première phase, les neutrophiles répondant aux agents chimiotactiques s'accumulent dans le tissu enflammé ; dans la seconde, elles essayent d'éliminer l'agent étranger en sécrétant les enzymes lysosomales et les anions superoxydes (Horst, 1991).

Les neutrophiles accumulés dans le tissu enflammé, après phagocytose des agents étrangers subissent une dégradation ce qui libère une masse d'enzymes lysosomales dans le site de l'inflammation. Les enzymes Lysosomales incluent environ 40 hydrolases acides (cathepsines, protéases d'hydrolyse, ribonucléases acides, phosphatases, enzymes de décomposition des mucopolysaccharides,...etc.). Ces enzymes sont enveloppées dans des membranes lysosomales qui empêchent leur libération dans les cellules saines (Horst, 1991).

Ces enzymes assurant le nettoyage du site inflammatoire des débris cellulaires peuvent eux même endommager les cellules normales dans le site inflammatoire. Parfois, dans des inflammations chroniques provoquées par des perturbations immunologiques, les cellules non-dégradées peuvent également libérer les enzymes lysosomales qui attaquent ces cellules. (Horst, 1991).

II.4/ L'inflammation et la dénaturation protéique :

Les peroxydes et les radicaux hydroxyles formés pendant l'inflammation peuvent causer l'oxydation, la décarboxylation, la désamination, et les dommages structurels aux acides aminés tels que le clivage et la modification des chaînes polypeptidiques (**Fuchs et Packer, 2005**). La modification des protéines par des médiateurs de l'inflammation peut mener à leur dénaturation ce qui peut potentiellement rendre ces protéines non fonctionnelles. Par exemple, la carbonylation de la lysine affecte les fonctions de ces protéines pendant le processus de signalisation. On observe souvent ces protéines modifiées chez les patients présentant la maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer et le cancer (**Roy et al., 2013**). Durant l'inflammation, l'élastase sécrétée par les neutrophiles activés peut causer des dommages considérables aux tissus. In vivo, les inhibiteurs tels que l' α -antitrypsine sont présents pour contrôler l'activité de l'élastase. Cependant, dans les maladies inflammatoires telles que l'Arthrite rhumatoïde, l' α -antitrypsin peut devenir inactivé par le clivage protéolytique par des metalloprotéinases (**Fuchs et Packer, 2005**).

Des suggestions ont été faites que la dénaturation protéique les rend antigéniques, induisant une immuno-réaction et produisant les changements biochimiques tissulaires, qui mènent finalement au rhumatisme articulaire (**Lemk et williams, 2013**). Le facteur rhumatoïde est un anticorps dirigé contre l'IgG du soi et qui est régulièrement retrouvé dans les sérums des patients présentant les maladies auto-immunes. L'antigénicité du soi de l'IgG est provoquée par un changement dans la structure de l'immunoglobine (**Fuchs et Packer, 2005**).

Partie Expérimentale

Chapitre IV
Matériel et Méthodes

❖ Matériels et méthodes

I. Préparation du matériel végétal :

I.1 Récolte et identification des plantes :

a) *Hyoscyamus albus*:

Hyoscyamus albus est une plante rare qui pousse dans des endroits inaccessibles, pour préserver la plante on a évité de travailler sur les racines et on a veillé à ne pas récolter toutes les feuilles d'une même plante, pour permettre à la plante de se régénérer.

Les graines de *Hyoscyamus albus* L. ont été récoltées au mois d'Octobre 2013 dans la région de Rabta située au sud de la wilaya de Bordj Bou Arreridj. Les parties aériennes de la plante (Feuilles, Fleurs) ont été récoltées au mois d'Avril 2014 dans la même région (**Figure 07**), l'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du laboratoire de Biotechnologie végétale et ethnobotanique, Université de Béjaia en se référant à la flore de **Quézel et Santa, 1963** (Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales).



Figure 07 : Photographie de *Hyoscyamus albus* : A gauche plante avec fleurs, à droite plante avec graines

b) *Ecballium elaterium*:

Ecballium elaterium L. a été récoltée au mois de Novembre 2013 dans la région de El Anasser au Sud-est de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, L'identification botanique de la plante a été réalisée au niveau du laboratoire de Biotechnologie végétale et ethnobotanique, Université de Béjaia en se référant à la flore de de **Quézel et Santa, 1963** (Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales) (**Figure 08**).



Figure 08 : *Ecballium elaterium* en pleine floraison

Le **Tableau VI** résume les détails géographiques relatifs aux sites de récolte.

Tableau VI : Données géographiques des sites de récolte

Espèce	Site de récolte	Altitude	Latitude	Longitude	Date de récolte
<i>Hyoscyamus albus</i>	Rabta	1100 m	4° 44' 48.86" E	35° 55' 32.65" N	12/10/2013
<i>Ecballium elaterium</i>	Anasser	900 m	4° 48' 12.46" E	36° 3' 0.684" N	07/11/2013

La carte dans la **Figure 09** montre les sites de récolte des deux plantes.

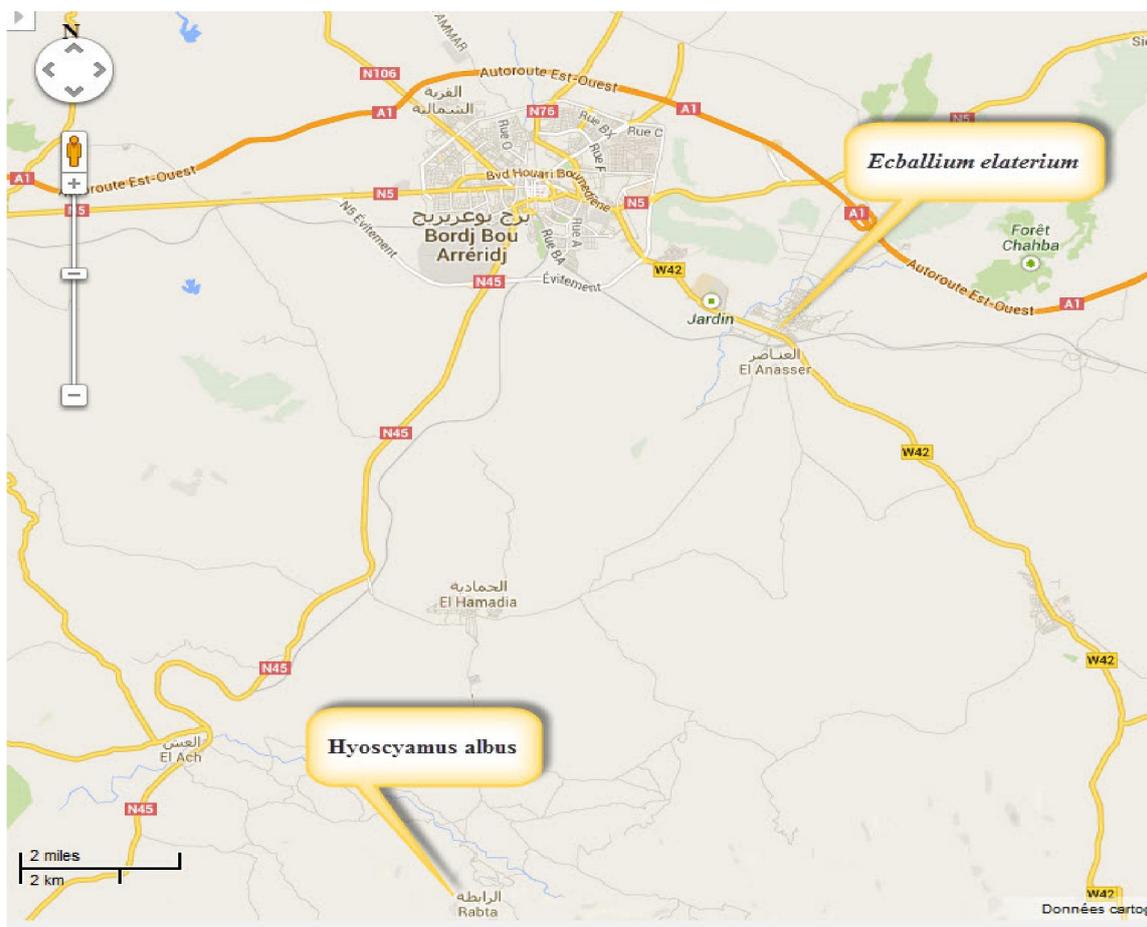


Figure 09 : Carte géographique des deux sites de récolte

I.2 Séchage, broyage et tamisage :

Après la récolte les différentes parties (fleurs, feuilles, fruits, graines) de chaque plante, elles ont été séparé et séchées dans une pièce aérée à l'abri de la lumière et de l'humidité. Pour éliminer toute trace d'eau les plantes ont été mises dans une étuve à 40° pendant 24h avant le broyage.

Les différentes parties des plantes (feuilles, fleurs, fruits, graines) ont été broyées avec un broyeur électrique et tamisées avec un tamiseur automatique pour obtenir une poudre fine homogène qui a été conservé dans des buccaux en verre à l'abri de la lumière.

II. Méthodes

II.1 Extraction des substances bioactives

a) Extraction des Calystegines

o Principe de la méthode

Les calystegines sont des substances très Hydrosolubles et de nature basique. Elles sont extraites du matériel végétal avec du méthanol aqueux à 50% (v/v). Les calystegines sont séparés du reste des composés neutres et acides en fonction de leurs charges par chromatographie échangeuse d'ions, **Figure 10 (Kato et al., 1997 ; Drager et Biastoff, 2007)**

o Mode opératoire

a) Préparation de l'extrait brut :

La préparation des extraits bruts de chaque partie de *Hyoscyamus albus* est représentée dans **la figure 10**.

La méthode est la même pour les différentes parties de la plante, sauf que les graines sont délipidées avec de l'éther de pétrole avant l'extraction hydro-méthanolique.

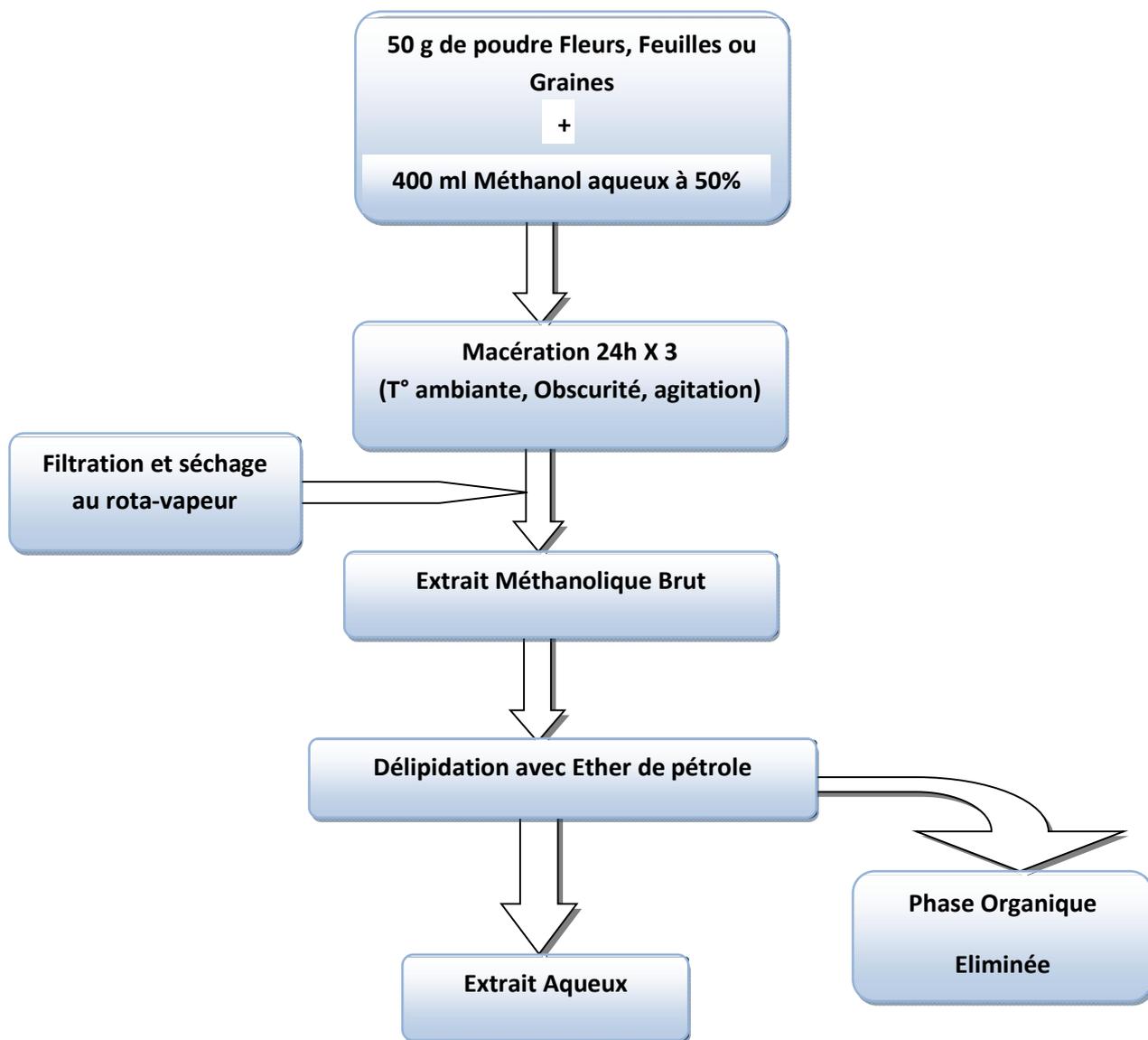


Figure 10 : Préparation des extraits bruts de *Hyoscyamus albus* (Bekkouche et al., 2001; Drager et Biastoff, 2007)

b) Purification des calystégines:

Pour purifier les calystégines on a suivi le protocole de **Bekkouche et collaborateurs, 2001** figure 11.

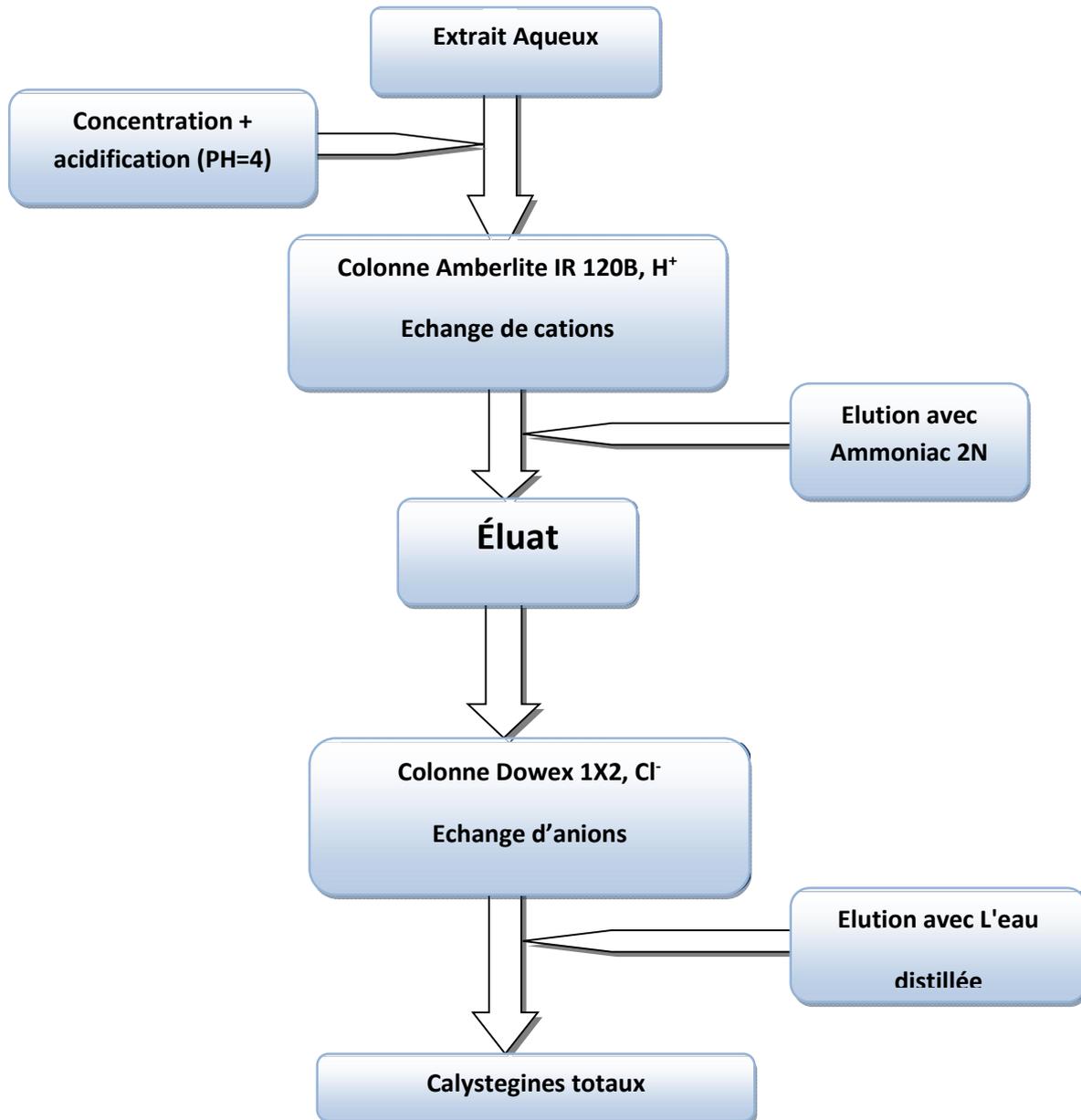


Figure 11 : Purification des Calystégines (Bekkouche et *al.*, 2001; Drager et Biastoff, 2007)

b) Extraction des Cucurbitacines

○ Principe de la méthode

L'extraction des cucurbitacines est principalement basée sur leur solubilité dans les différents solvants. Ils sont généralement extraits à partir de la matière végétale avec de l'éthanol. Les aglycones ont une basse hydro-solubilité, mais sont très solubles dans le chloroforme. La partition entre ces deux solvants est fréquemment employée pour séparer partiellement les cucurbitacines des extraits alcooliques des plantes. La purification des extraits a été généralement réalisée par chromatographie sur colonne de gel de silice (Figure 12). (Gry et al., 2006 ; Wen-li et al., 2012)

○ Mode opératoire :

a) Préparation de l'extrait Brut :

La figure 12 montre le protocole utilisé.

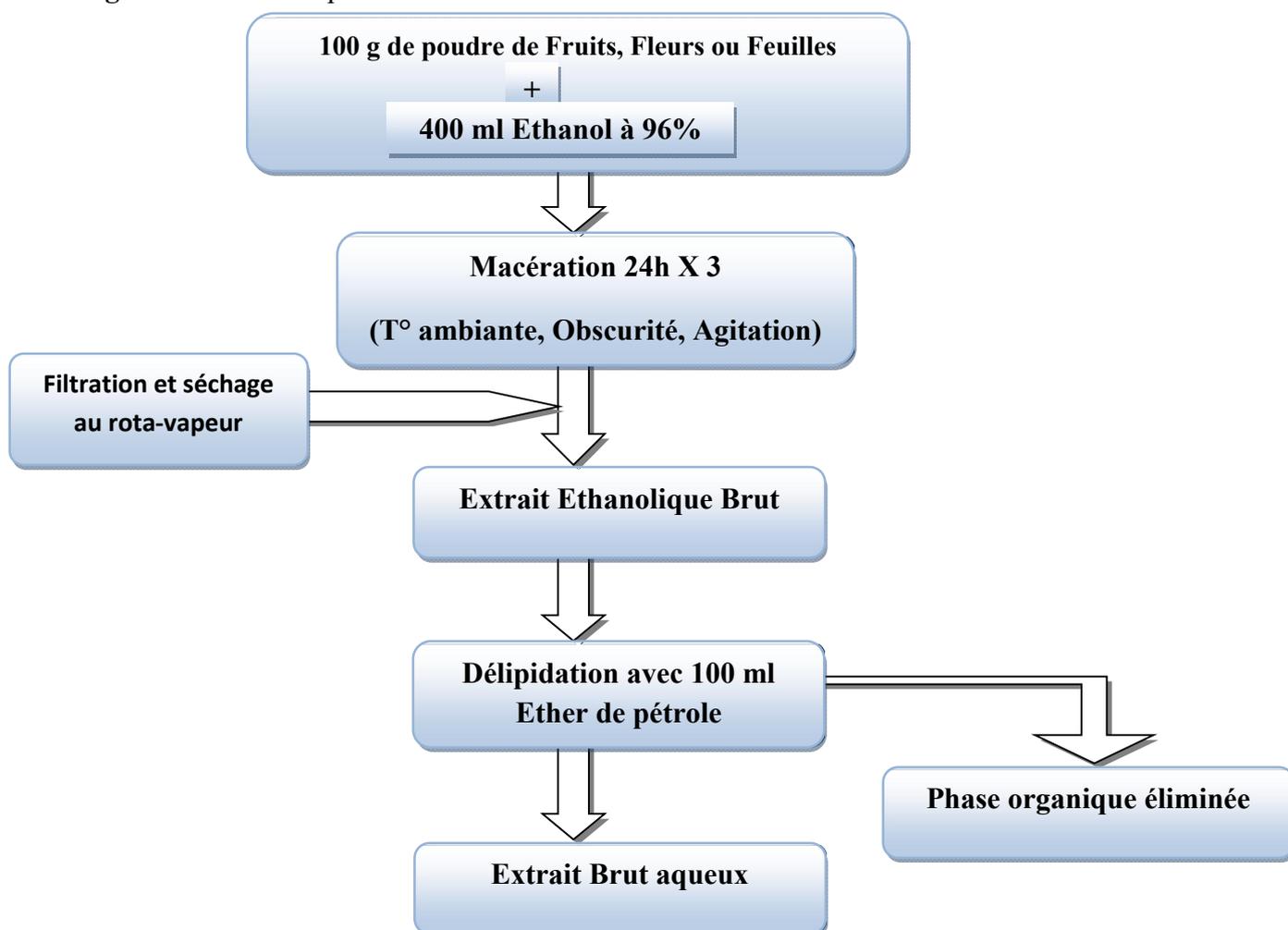


Figure 12 : Préparation des extraits bruts d'*Ecballium elaterium* (Gry et al., 2006)

c) Purification des cucurbitacines:

Pour la purification des cucurbitacines nous avons suivi le protocole préconisé par **Wen-li et al., 2012 (figure13)** :

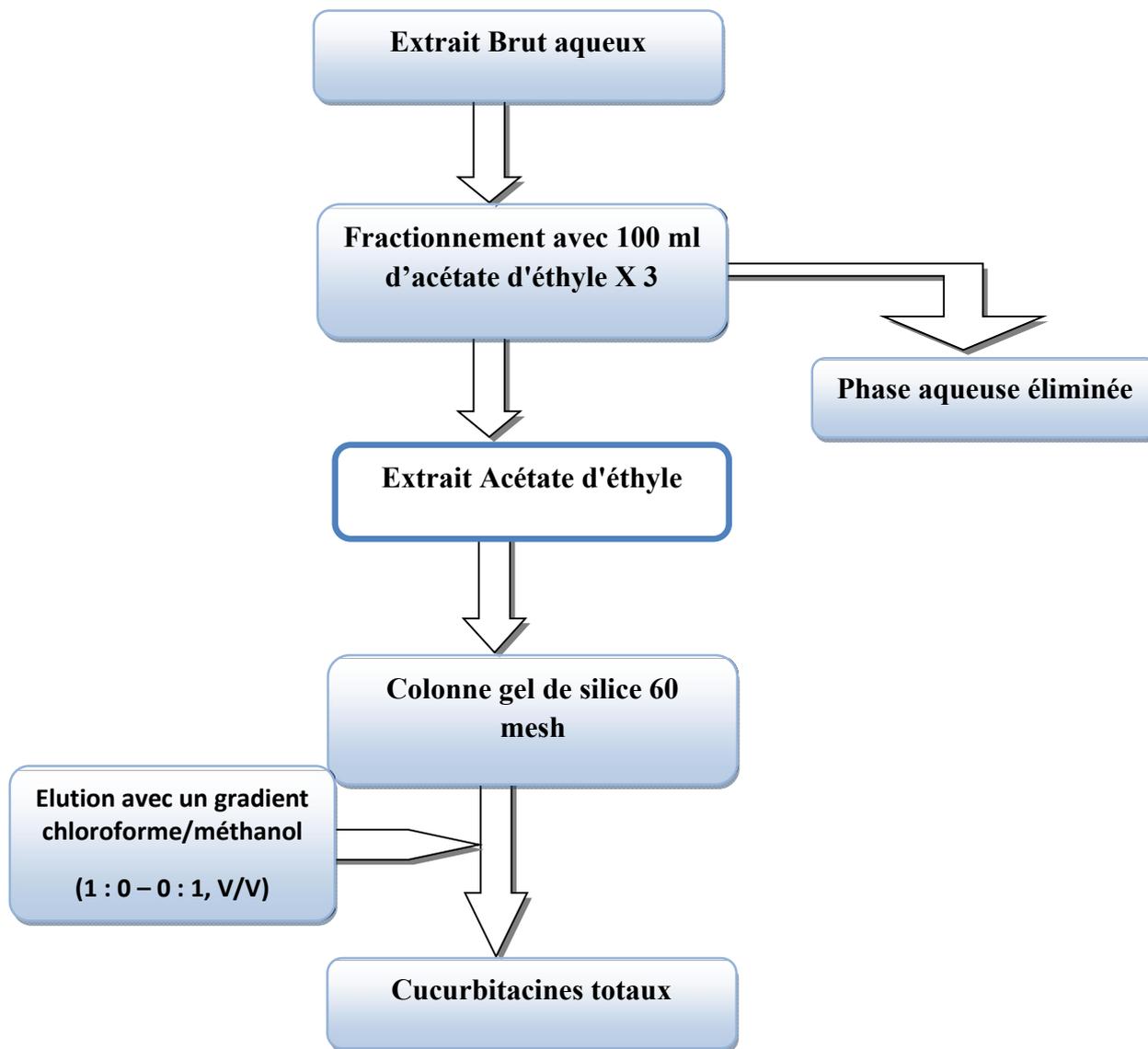


Figure 13 : Purification des cucurbitacines (Gry et al., 2006; Wen-li et al., 2012)

II.2 : Evaluation de l'activité antioxydants

II.2.1 : Inhibition du radical libre DPPH

a) Principe de la méthode

L'inhibition du radical libre 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH[•]) est effectuée selon la méthode développée par **Blois en 1958**. Cette méthode permet de mesurer le pouvoir piègeur et de calculer la concentration inhibitrice médiane IC₅₀ des substances antioxydants.

Le DPPH est un radical libre de couleur violette (Forme oxydée), qui devient jaune (Forme Réduite) sous l'effet des substances antioxydants qui lui cède un proton (Figure 14).

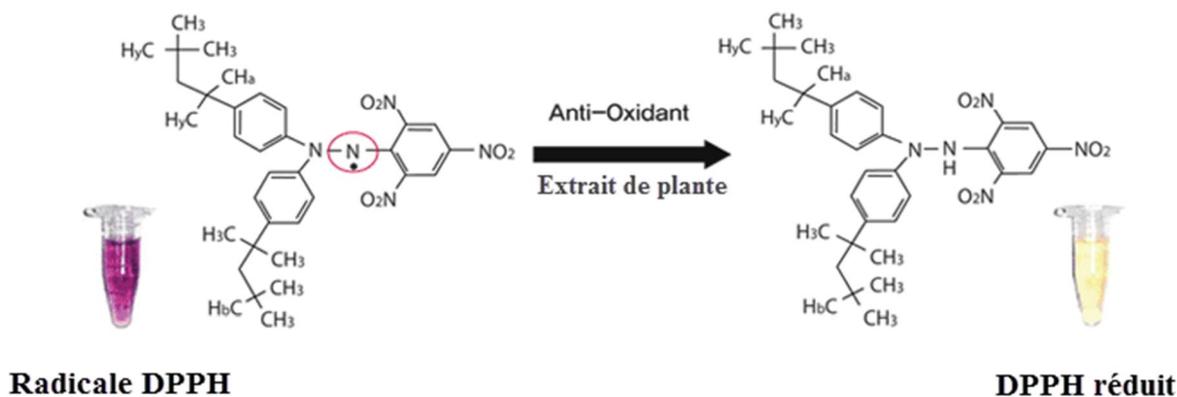


Figure 14 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant

b) Mode opératoire :

Une solution méthanolique de DPPH à 0,1 mM est mélangée avec différentes concentrations des extraits ou avec des standards, Butylhydroxyanisole (BHA) Butylhydroxytoluène (BHT) avec une gamme de concentration de 2 à 10 µg/ml (Figure 15).

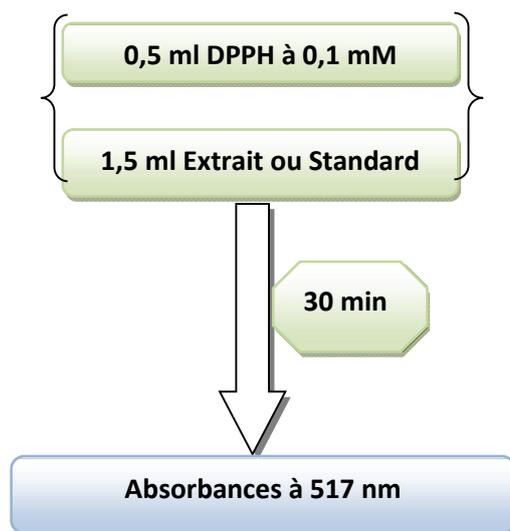


Figure 15 : Protocole d'inhibition du radicale DPPH (Blois, 1958)

NB : - Le contrôle contient du méthanol à la place de l'extrait

- Un Blanc pour chaque concentration d'extrait est préparé en remplaçant le DPPH par du méthanol.

- Tous les tests sont réalisés en triplicata.

c) Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et le calcul est effectué selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition } DDPH = \left(\frac{Ac - At}{Ac} \right) \times 100$$

Ac= Absorbance du contrôle. At= Absorbance du test - Absorbance du blanc du test

Les IC50, qui représentent les concentrations d'extraits qui neutralisent 50% de DPPH, sont calculées à partir des graphes : Inhibition en fonction de la concentration.

II.2.2 : Inhibition du radical cation ABTS

a) Principe de la méthode :

En réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)) forme le radical $ABTS^{\bullet+}$, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est

proportionnelle à la concentration en antioxydants. La méthode est généralement standardisée par rapport au TROLOX. Cette méthode est applicable à la fois pour les antioxydants lipophiles et hydrophiles (**figure 16**) (Re et al., 1999) .

b) Mode opératoire :

Le protocole utilisé est montré dans la **figure 16**.

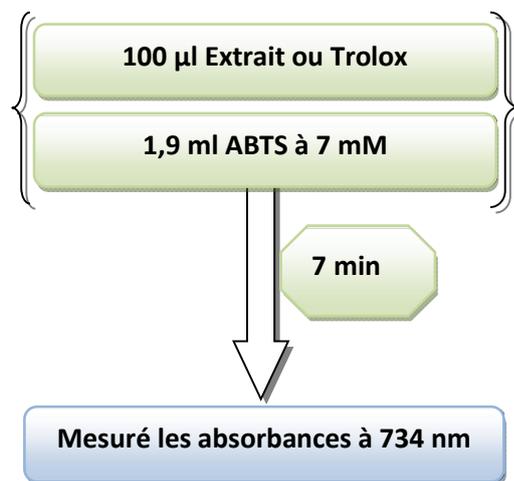


Figure 16 : Protocole d'inhibition du radical ABTS (Re et al., 1999)

NB: - Le contrôle contient du méthanol à la place de l'extrait

-Tous les tests sont réalisés en triplicata.

c) Expression des résultats :

Les résultats de l'estimation de l'activité antioxydants par la réaction de décoloration de l'ABTS sont exprimés en pourcentage d'inhibition et le calcul est effectué selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition ABTS} = \left(\frac{Ac - At}{Ac} \right) \times 100$$

Ac= Absorbance du contrôle. At= Absorbance du tes

La capacité antioxydants équivalente au trolox TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) correspond à la concentration de trolox (μmol) donnant la même activité qu'un gram de l'extrait testé. Le TEAC a été calculé à partir de la courbe d'étalonnage réalisé avec le trolox (Re et al., 1999)

II.2.3 : Pouvoir réducteur

a) Principe de la méthode :

Le pouvoir réducteur est évalué avec la méthode originalement développée par **Oyaizu en 1986**, c'est une méthode directe et rapide pour la mesure du pouvoir des antioxydants non enzymatiques dans un milieu neutre.

Cette méthode est basée sur la réduction du Fer (III) (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fer (II) (Fe^{2+}). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés (**figure 17**) (**Oyaizu, 1986**).

Mode opératoire :

Le protocole est montré dans **la figure 17**.

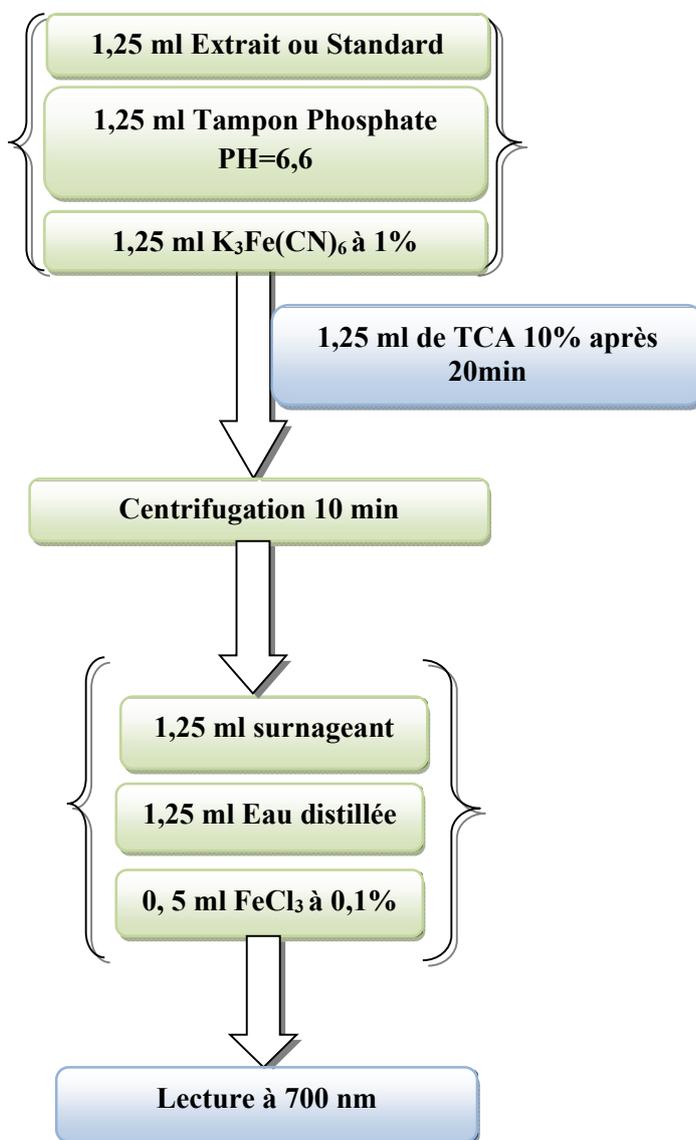


Figure 17 : Mesure du pouvoir Réducteur (Oyaizu, 1986)

NB: Le contrôle contient du méthanol à la place de l'extrait.

b) Expression des résultats :

Pour chaque concentration testée, une absorbance est enregistrée et les résultats sont exprimés sous forme graphique. La capacité antioxydants totale (TAC) est calculée à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec du trolox.

II.2.4 : Effet anti-hémolytique

Les globules rouges humains constituent un très bon système qui peut être employé comme modèle expérimental in-vitro pour étudier le potentiel antioxydant des différents extraits de plantes. C'est une méthode biologique qui est peu coûteuse, dynamique, et facile à appliquer, ne demandant que des réactifs et instrumentations simples. Cependant on doit garder en esprit, que les variations génétiques entre les individus mènent à divers effets sur les défenses antioxydants. (**Arbos *et al.*, 2008**)

a) Principe de la méthode

La protection des hématies par les extraits contre l'hémolyse oxydative, est évaluée par la méthode décrite par **Yuan *et al* (2005)**. Des globules rouges sont mis en contact avec du AAPH (2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride). La décomposition thermique de ce composé génère des radicaux libres à vitesse constante qui attaquent la membrane des globules rouges et lorsque les antioxydants endogènes sont consommés, la membrane des globules rouges éclate et de l'hémoglobine se retrouve dans le surnageant. Le suivi de l'hémolyse se fait par spectrophotométrie à 540 nm. L'ajout dans le milieu d'incubation d'extraits à différentes concentration retarde l'apparition de l'hémolyse. La méthode est étalonnée en fonction des concentrations connues en acide ascorbique ajoutées dans le milieu réactionnel (**Yuan *et al.*, 2005**).

b) Mode opératoire

Le protocole suivi est montré dans la figure 18.

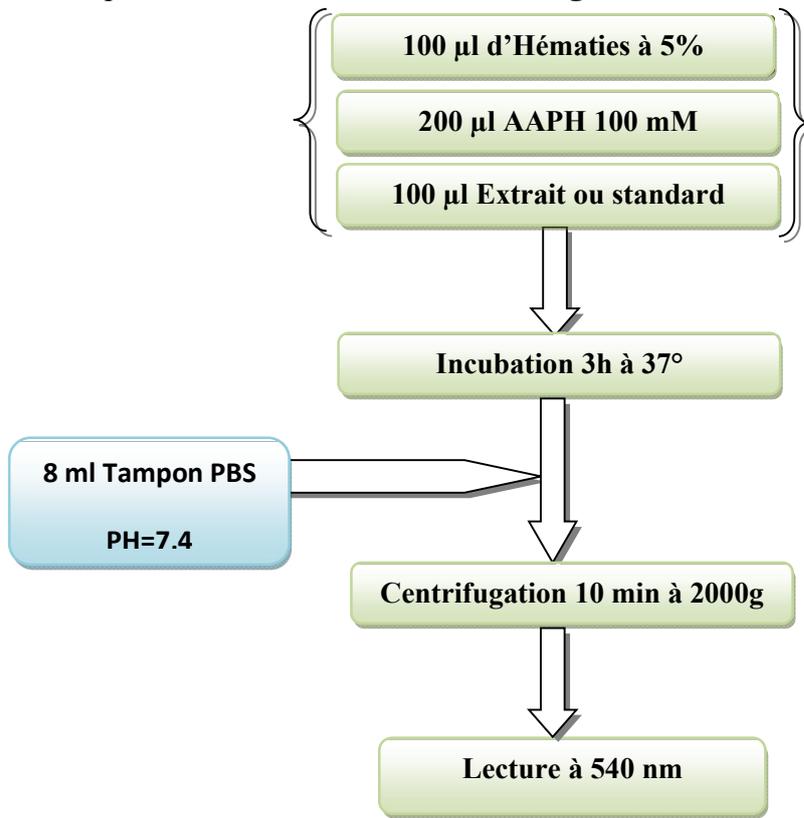


Figure 18 : Effet anti-hémolytique (Yuan *et al.*, 2005)

NB : Le contrôle contient 100 µl d'érythrocytes + 200 µl AAPH +

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, le calcul est effectué selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = \left[1 - \left(\frac{At}{Ac} \right) \right] \times 100$$

II.3 : Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (*In-vitro*) :

II.3.1 : Stabilisation membranaire (hémolyse hypotonique) :

En général il y a plusieurs avantages à choisir les érythrocytes comme modèle pour étudier le mécanisme de la stabilisation membranaire, la surface de la membrane des érythrocytes peut être exactement estimée, et l'érythrocyte est exempt de membranes et d'organelles intracellulaires. Donc, tout effet d'une substance sur l'hémolyse osmotique pourrait d'une manière justifiable être interprété comme effet sur la membrane elle-même (Seeman et Weinstein, 1966).

a) Principe de la méthode :

La capacité de nos extraits à stabiliser la membrane des globules rouges humains est évaluée par la méthode d'hémolyse hypotonique décrite par **Seeman et Weinstein (1966)**. Les globules rouges constituent un bon modèle pour suivre les mouvements d'eau. Placés dans une solution hypotonique, leur éclatement (hémolyse) laisse seulement un fantôme membranaire et de l'hémoglobine en solution, transformant la suspension opaque de cellules en une solution rouge translucide d'hémoglobine. L'hémolyse est estimée en suivant le taux d'hémoglobine libérée à 540 nm (**Seeman et Weinstein, 1966**).

a) préparation des globules rouge humains :

Les globules rouges sont prélevées au-dessus du coude d'un volontaire sain qui n'a pas pris d'anti-inflammatoire non stéroïdien dans les 48h qui précèdent le prélèvement.

- Centrifugation du sang à 3000 g pendant 10 min,
- Lavage des érythrocytes 3 fois dans 10 mM de tampon PBS PH=7,4
- Les globules rouges sont reconstitués sous forme de suspension à 10% toujours dans le PBS, la solution est conservée à 4°C et utilisée au maximum dans les 6h suivant sa préparation.

d) Mode opératoire :

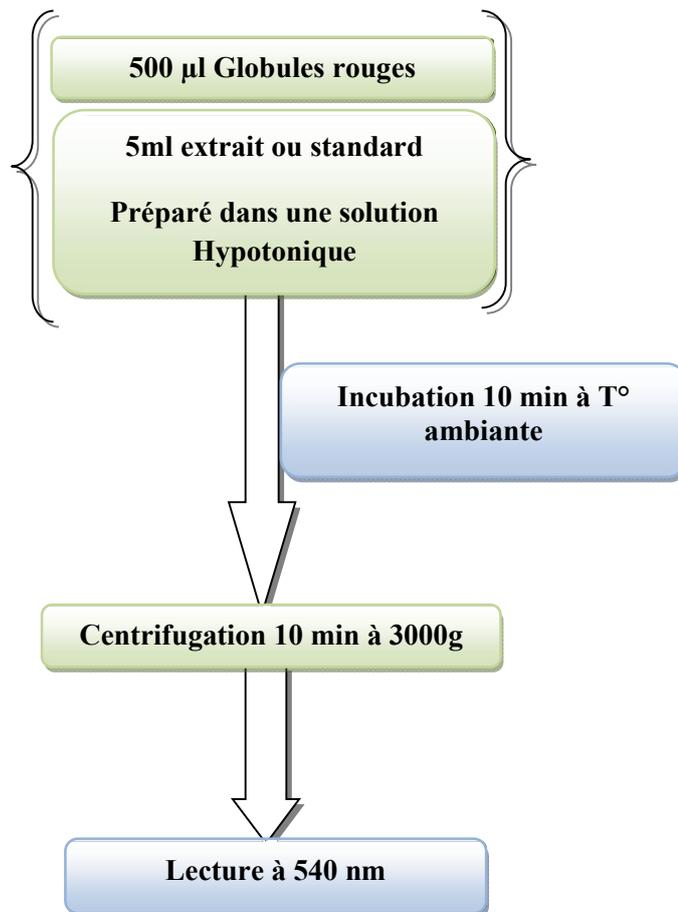


Figure 19 : Stabilisation membranaire -hémolyse hypotonique-(Seeman et Weinstein, 1966)

c) Expression des résultats :

$$\% \text{ d'Inhibition} = \left[\left(\frac{Ac - At}{Ac} \right) \right] \times 100$$

NB : Le contrôle contient une solution saline hypotonique à la place des extraits et des standards

II.3.2 : Inhibition de la dénaturation protéique (Albumine)**a) Principe de la méthode :**

L'inhibition de la dénaturation de l'albumine est évaluée par la méthode de **Mizushima et Kobayachi (1968)**. L'albumine est mise en contact avec les extraits dans un milieu légèrement acide, la dénaturation est suivie en observant la turbidité de la solution d'albumine à 416 nm. L'acide acétyl salicylique et le diclofénac sont utilisés comme standards.

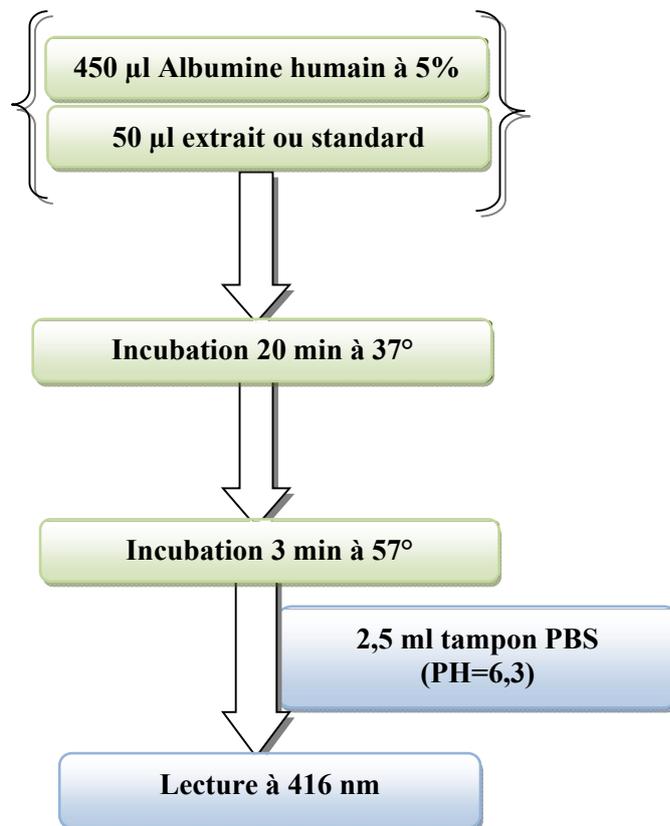
b) Mode opératoire :

Figure 20 : Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine (Mizushima et Kobayachi, 1968)

NB : - Dans le contrôle l'extrait est remplacé par de l'eau distillée

- Dans le blanc du test l'albumine est remplacée par de l'eau distillée

Le contrôle représente 100% de dénaturation

c) Expression des résultats :

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$\% d'Inhibition = 100 - \left[\left(\frac{Ac - At}{Ac} \right) \times 100 \right]$$

Ac= Absorbance du contrôle. At= Absorbance du test - Absorbance du blanc du test

III. Traitement statistique :

Les traitements des données obtenues fait appel à des approches statistiques. Les résultats obtenus pour chaque paramètre seront interprétés statistiquement à l'aide du logiciel «ORIGIN PRO version 9.0.0 SR2 B87 - copyright 1991-2013 OriginLab corporation».

Les résultats des tests effectués in-vitro sont exprimés en moyenne \pm SD (Standard Deviation).

Les valeurs IC 50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par l'équation de boltzman à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)].

Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA suivi du test de Tukey/ LSD Fisher.

Les différences sont considérées comme étant statistiquement significatives au seuil de 0,05.

Chapitre V

Résultats et discussions

Résultats et discussion

I. Rendements des extractions

I.1 *Ecballium elaterium* :

Les rendements ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$Rdt\% = \frac{PF}{MS} \times 100$$

Rdt : rendement en %

PF : produit final

MS : Matière sèche

Les fleurs ont donné le rendement le plus élevé avec 0,54% suivi des fruits avec 0,226% et en fin les feuilles avec 0,17%, les rendements obtenus pour les différentes parties d'*Ecballium elaterium* sont représentés dans la **figure 21**.

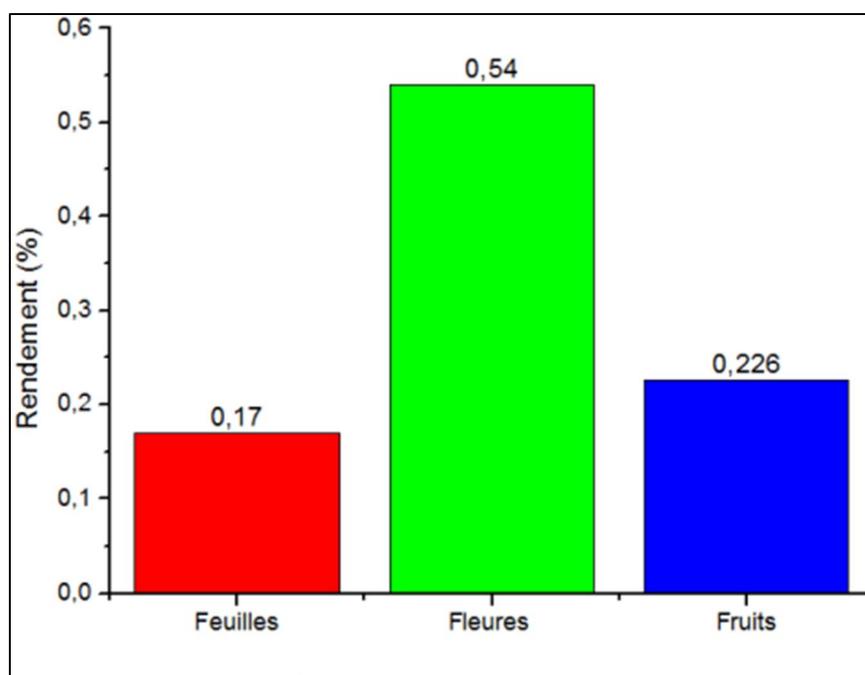


Figure 21 : Rendement en cucurbitacines des différentes parties d'*Ecballium elaterium*

Selon Attard, (2002) les différences de rendement entre les différents organes sont dues à la période de récolte, la teneur des fruits en cucurbitacines est faible pendant la période de floraison et varie entre 0 et 0,297% ce qui est en accord avec les résultats qu'on a trouvé, alors qu'elle augmente jusqu'à 1,42% pendant les périodes fruitières. Les feuilles ne contiennent que peu de cucurbitacines, en moyenne, elles contiennent jusqu'à 0,34%. La même étude a montré que l'accumulation des cucurbitacines dans les feuilles est température dépendante, plus la température augmente et plus les cucurbitacines s'accumulent dans les feuilles.

Le taux de cucurbitacines a été étudié pour *Trichosanthes cucumerina*, une plante de la même famille. L'étude a confirmé que le taux de cucurbitacines varie avec la période de récolte et la température, les fruits peuvent contenir jusqu'à 3,7 mg/100g de matière sèche, les feuilles peuvent contenir jusqu'à 0,8 mg/100g, alors que les tiges contiennent jusqu'à 1,7 mg/100g. Selon cette étude les tiges ne servent que pour le transport des cucurbitacines alors que les fruits constituent le site de stockage de ces métabolites. (Devendra et al., 2011)

1.2 *Hyoscyamus albus*

Les rendements en calystegines sont calculés de la même façon que pour *Ecballium elaterium*. Le rendement le plus élevé est obtenu pour les graines avec 0,53% suivi des Feuilles avec 0,3266% et en fin les fleurs avec 0,275%. La figure 22 montre les différents rendements obtenus pour les différentes parties de *Hyoscyamus albus*.

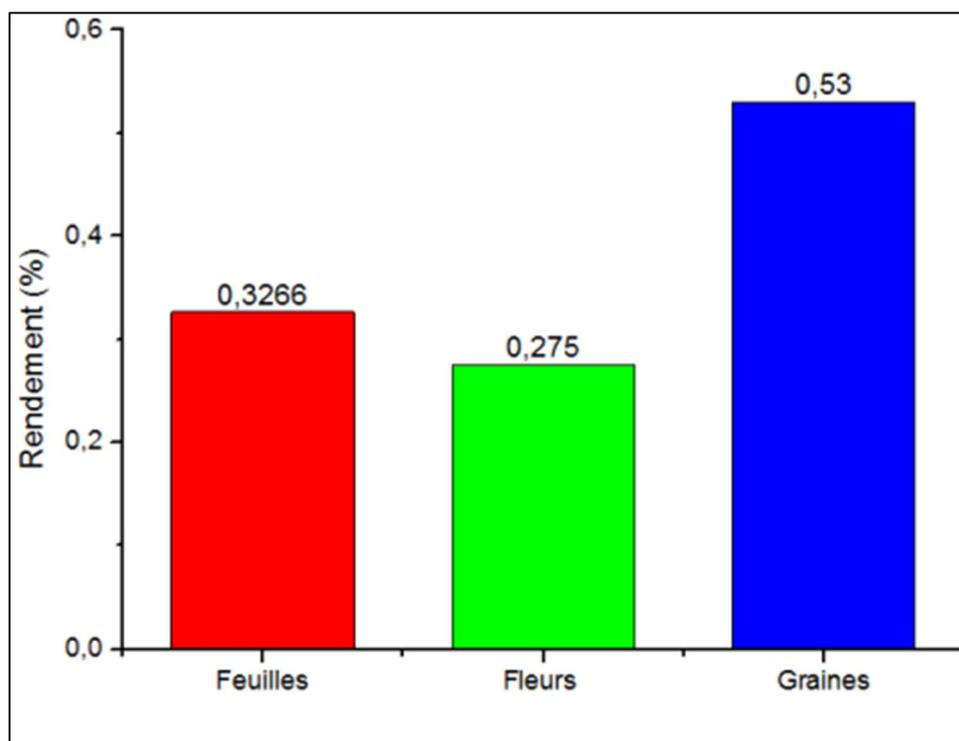


Figure 22 : Rendement en calystegines des différentes parties de *Hyoscyamus albus*

Selon **Keiner et Drager, (2000)** le contenu en calystegines totaux de *Solanum tuberosum* (Pomme de terre) est de 0,074% de matière sèche dans les nouveaux bourgeons des tubercules, les feuilles et les fleurs en contiennent une quantité moins importante que les bourgeons des tubercules. Dans les fleurs le taux de calystegines totaux est de 0,015% alors que dans les feuilles on peut trouver 0,0055% de ce fait *Hyoscyamus albus* est plus riche en calystegines que le *Solanum tuberosum* (**Keiner et Drager, 2000**).

Le taux de calystegines varie largement entre les différentes parties des plantes, et varie même au sein du même organe en fonction de sa position et de sa maturation, par exemple, les feuilles proches du sol contiennent moins de calystegines que celles au sommet de la plantes (**Keiner et Drager, 2000**)

Bekkouche et collaborateurs (2001) ont étudié la distribution des calystegines dans plusieurs espèces de la famille des solanacées, dans les feuilles de *Brunfelsia nitida* ils ont détecté les calystegines suivants : calystegine C1, B1, B2 et B3 au taux de 0,00545%, dans les parties aériennes d'*Atropa belladonna* ils ont détecté les calystegines B1, B2, B3 et A3 au taux de 0,022%. Dans les feuilles *Hyoscyamus albus* ils ont détecté les mêmes calystegines qu'*Atropa belladonna* et au même taux. (**Bekkouche et al., 2001**)

II. Activité antioxydants

II.1 Inhibition du radical libre DPPH

II.1.1 *Ecballium elaterium*

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits de la partie aérienne d'*Ecballium elaterium* ont une activité anti-radicalaire concentration dépendante (**Figure 23**).

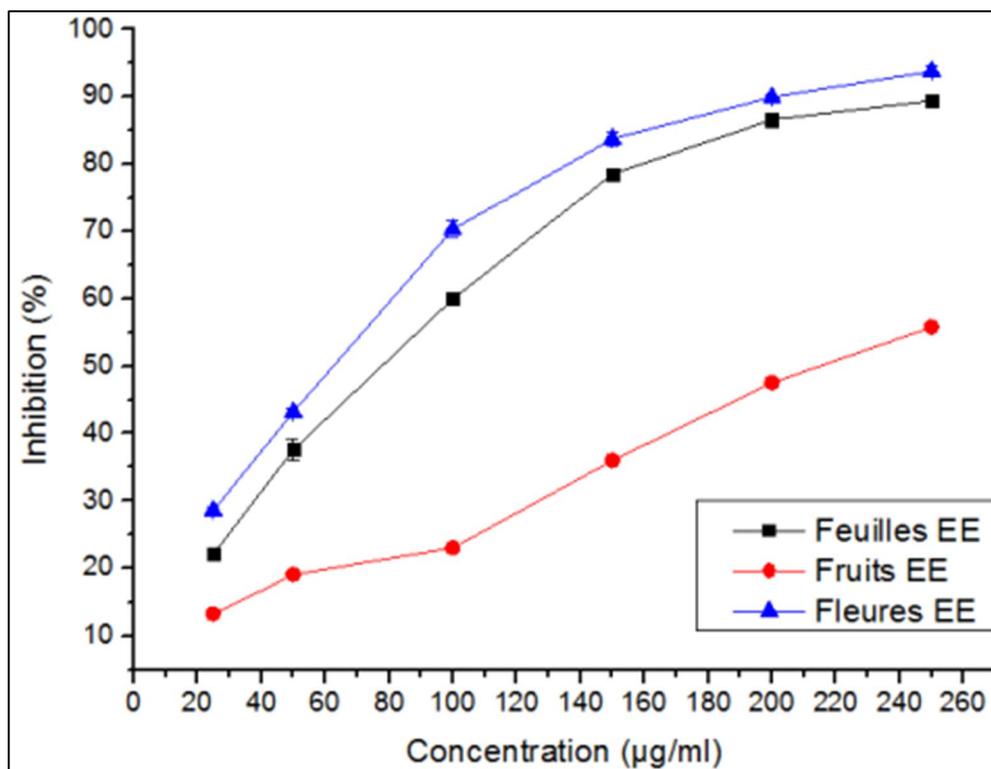


Figure 23 : Pouvoir anti-DPPH des différentes parties d'*Ecballium elaterium*

Une inhibition maximale de 93,79% est exercée par les fleurs à une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$, les feuilles à la même concentration ont donné 89,43% alors que les fruits n'ont donné que 55,77%. Le BHA et BHT utilisés comme standards à des fins comparatives ont montré un effet anti radicalaire bien plus puissant que les extraits, ils ont donné des inhibitions maximales de 95,26% et 79,13% respectivement à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ seulement (**Figure 24**).

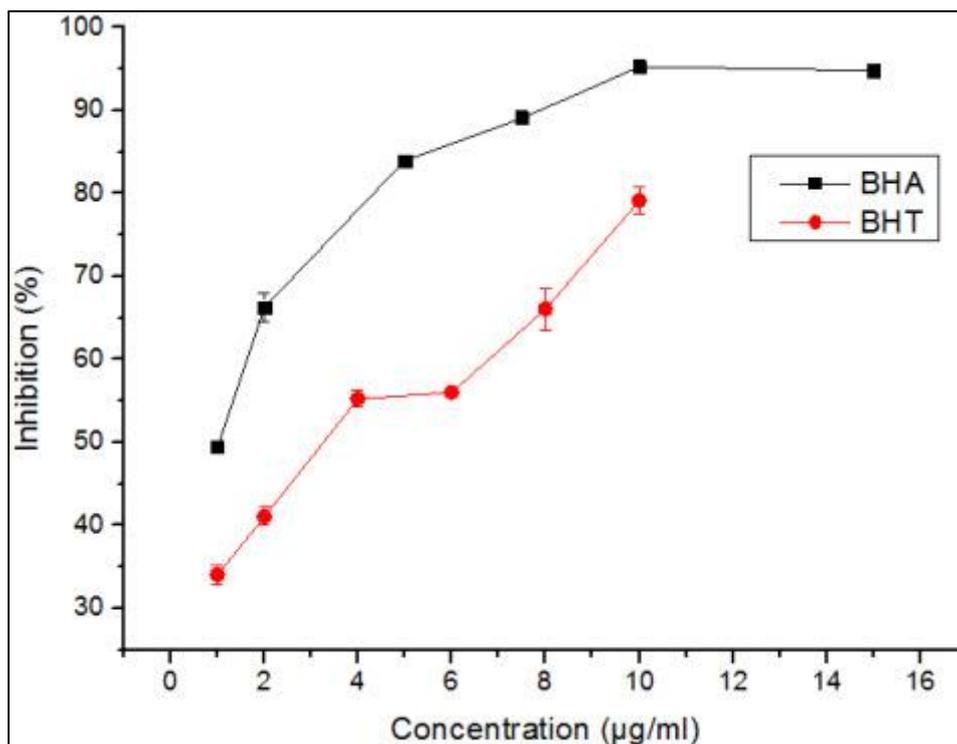


Figure 24 : Pouvoir anti-DPPH des standards utilisés (BHA et BHT)

L'activité antioxydants des différents extraits ainsi que des standards utilisés est exprimée en IC_{50} (Concentration inhibitrice 50). C'est la concentration d'extrait qui neutralise (réduit) 50% du radical libre (DPPH), plus la IC_{50} est faible et plus l'antioxydants est puissant, cette concentration est calculée à partir des graphes de la **figure 23** et la **figure 24** pour les standards. **La figure 25** montre les différentes IC_{50} Obtenues pour nos extraits et les standards.

Les fleurs ont eu la plus faible IC_{50} de 61,42 $\mu\text{g/ml}$, suivie des feuilles avec 80,68 $\mu\text{g/ml}$ et en fin les fruits avec 210,83 $\mu\text{g/ml}$. Cela signifie que les fleurs sont les plus actives parmi les différentes parties d'*Ecballium elaterium*, mais cette activité reste faible par rapport aux standards utilisés qui ont donné des IC_{50} égales à 0,97 $\mu\text{g/ml}$ et 3,98 $\mu\text{g/ml}$ pour le BHA et le BHT respectivement. Le BHA est 62 à 63 fois plus actif que les fleurs d'*Ecballium elaterium* alors que le BHT l'est de 15 à 16 fois.

L'activité du BHA est significativement supérieure à celle du BHT, et les deux sont significativement supérieurs à l'activité des 3 extraits.

Les effets des feuilles et des fleurs ne sont pas significativement différents, et sont tous les deux significativement supérieurs à l'effet des fruits.

La différence entre les extraits est probablement due à leurs compositions différentes et à leurs contenus différents en cucurbitacines. La réduction du DPPH n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais elle est due aux interactions entre plusieurs composés (synergie, antagonisme, addition). Vu la différence de composition des différents extraits, ces interactions peuvent exister dans un extrait et pas dans un autre, conduisant ainsi à cette différence d'activité entre les extraits (Elhajji et al., 2006) .

Certains triterpènes étudiés ont montré des IC_{50} de 163 $\mu\text{g/ml}$ (Pereira et al., 2012) alors que l'étude de l'activité anti radicalaire de 5 triterpènes (Lupeol, Lupeol acetate, β amyryn, β -amyryn acetate) a donné des $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g/ml}$ pour les 5 composés étudiés. (Shan et al., 2014) Une autre étude sur des triterpènes (Acide ursolique, germanicol et germanicol acetate) a donné des inhibitions très faibles à 100 $\mu\text{g/ml}$ et les IC_{50} n'ont pas pu être calculé. (Topçu et al., 2007) Les triterpènes extraits de la plante *Momordica charantia* (cucurbitacées) ont aussi donné de faibles inhibitions du radical DPPH (Liu et al., 2010). Les extraits des fleurs et des feuilles d'*Ecballium elaterium* ont donné une excellente activité antiradicalaire par rapport aux autres triterpènes étudiés. Des triterpènes de type cucurbitane ont aussi été isolés à partir de *Cucurbita pepo* (cucurbitacées), les IC_{50} obtenus étaient de l'ordre de 100 $\mu\text{g/ml}$, ce qui est proche des résultats qu'on a trouvé (Gill et bali, 2011) On peut dire que les triterpènes à squelette cucurbitane (cucurbitacines) montrent une meilleure activité anti-radicalaire que les autres types de triterpènes.

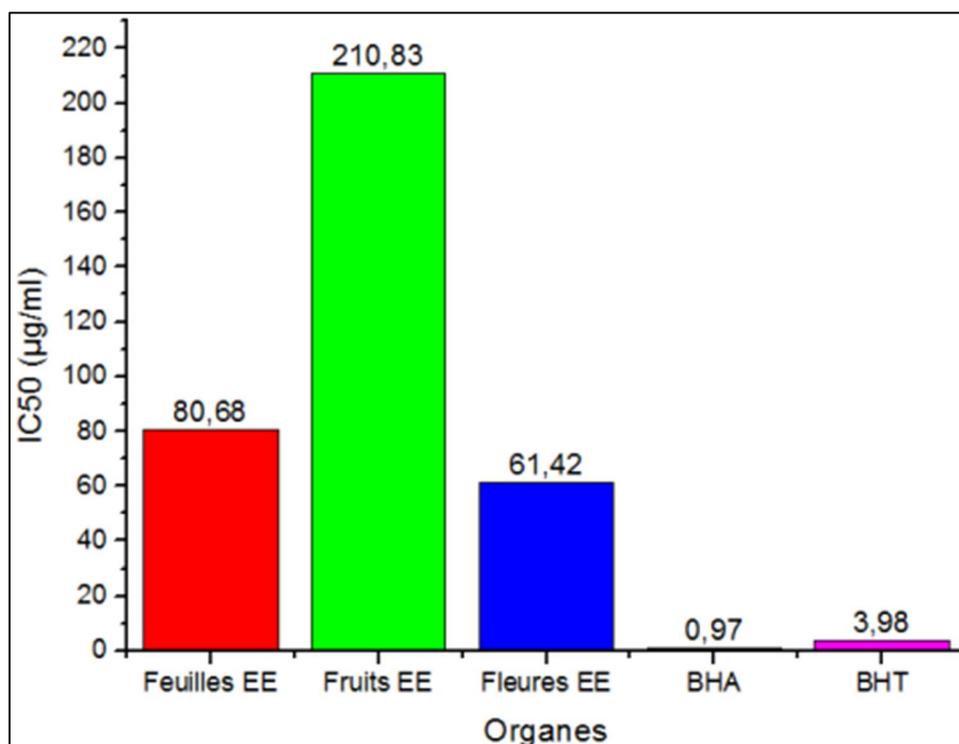


Figure 25 : IC_{50} des différentes parties d'*Ecballium elaterium*, BHA et BHT

II.1.2 *Hyoscyamus albus*

Tout comme *Ecballium elaterium*, l'effet anti-radicalaire des différentes parties de *Hyoscyamus albus* est concentration dépendant (**Figure 26**)

Les graines HA ont donné la plus grande inhibition : 93,61% à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$, tandis que les fleurs ont eu une inhibition maximale de 70,6 % à une concentration de 350 $\mu\text{g/ml}$, à la même Concentration les feuilles ont donné 65,82%.

Les concentrations auxquelles les différentes parties de *Hyoscyamus albus* atteignent leurs inhibitions maximales (200 $\mu\text{g/ml}$ et 350 $\mu\text{g/ml}$) sont toujours beaucoup plus élevées par rapport aux concentrations auxquelles les standards utilisés atteignent leurs inhibitions maximales (10 $\mu\text{g/ml}$).

L'inhibition maximale des graines HA (93,61%) est assez proche de celle du BHA (95,26%) et est supérieure à celle du BHT (79,13%).

Les graphes de la **figure 26** sont utilisés pour le calcul de la CI50 des différentes parties de *Hyoscyamus albus*.

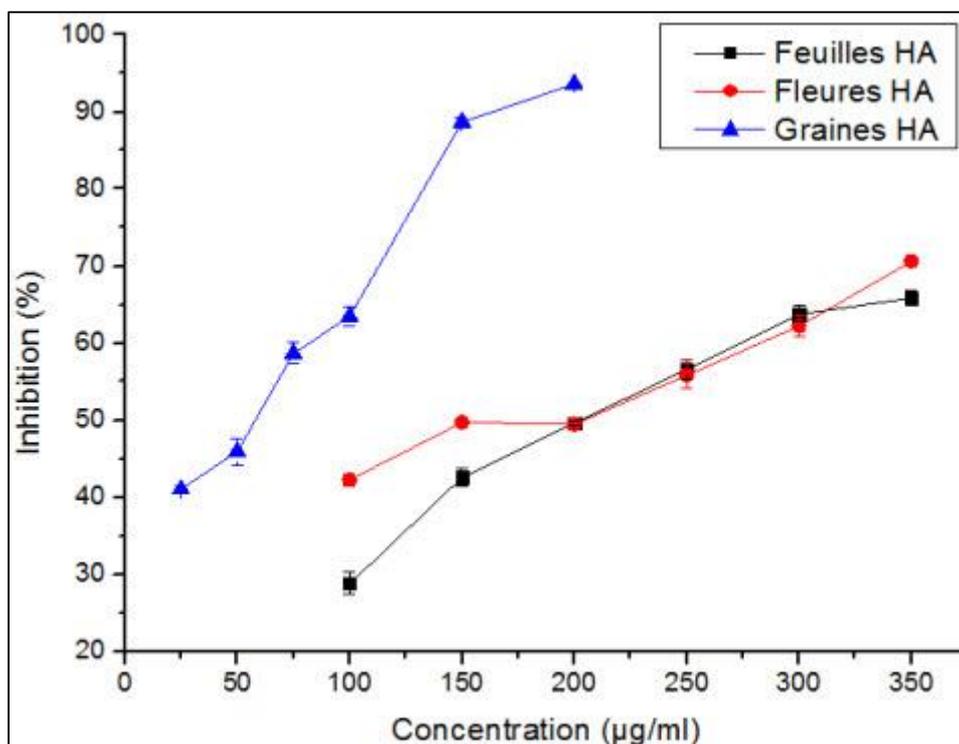


Figure 26 : Pouvoir anti-DPPH des différentes parties de *Hyoscyamus albus*

On utilise toujours l'IC₅₀ pour exprimer le pouvoir anti-radicalaire des différentes parties de *Hyoscyamus albus*. Les résultats obtenus sont montrés dans la **figure 27**.

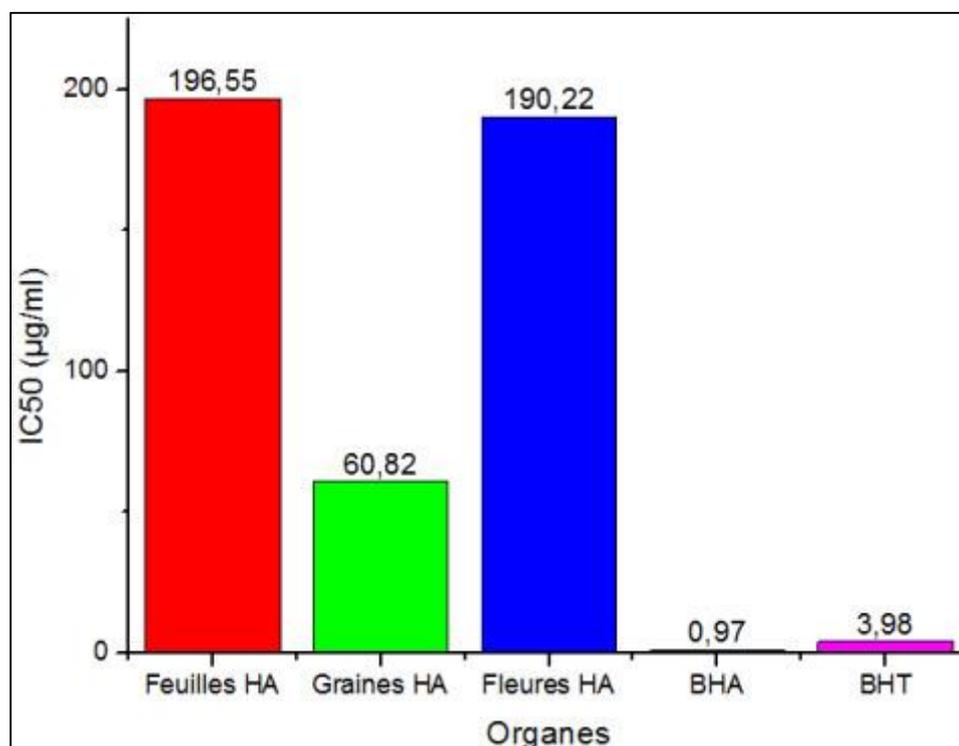


Figure 27 : Activité anti-DPPH des différentes parties de *Hyoscyamus albus*, BHA et BHT

Les graines HA sont les plus actives avec une IC₅₀ égale à 60,82% et qui est la plus faible parmi les différentes parties de *Hyoscyamus albus*, Les fleurs et les feuilles ont des IC₅₀ assez proches : 190,22 et 196,55 µg/ml. Mais les extraits restent toujours moins actifs que les standards utilisés dont les IC₅₀ sont de 0,97 et 3,98 µg/ml pour les BHA et BHT respectivement. Le BHA est 61 à 62 fois plus actif que les graines HA (l'extrait le plus actif) alors que le BHT l'est que de 15 à 16 fois.

L'effet des graines est significativement supérieur à l'effet des fleurs et des feuilles et qui eux même donnent un effet similaire. Cette différence entre les extraits peut être due à leurs contenus différents en calystegines, comme les calystegines ne sont pas tous de bon inhibiteurs de la β-glucosidase, les calystegines ne sont pas forcément tous de bon agents anti-radicalaire, cela revient aux nombres et aux positions des différents groupements hydroxyles portés par les calystegines. (Asano et al., 1997)

L'étude de l'activité anti-DPPH de certains alcaloïdes (Heamanthamine, crinamine, lycorine, hamayne) a montrée des activités entre 0,59% et 8,24% à 250 µg/ml pour ces composés isolés **(Oloyede et al., 2010)**. A la même concentration les feuilles et les fleurs de *Hyoscyamus albus* ont donné 55 et 56 %, alors que les graines ont dépassé 90% à 200 µg/ml.

L'activité antioxydants des alcaloïdes extraits de différentes parties (feuilles, fleurs, graines) de 4 plantes de la famille des solanacées a été étudiée. Pour la plante *Nicotiana glauca* : concentration de 3000 µg/ ml les activités anti-DPPH suivantes ont été obtenues, Les feuilles ont donné 28%, les fleurs : 19% et les graines ont donné 10%. **(Gutiérrez et al., 2014)**

Pour *Solanum rostratum* ils ont a obtenu des inhibitions entre 13 et 93% pour les différentes parties de la plante et toujours à 3 mg/ml. Les Inhibitions obtenues pour *Nicotiana trigonophylla* étaient de 10 à 21% à 3mg/ml pour les différentes parties de la plante et enfin, les différentes parties de la plante *Solanum nigrescens* ont donné des inhibitions entre 20 et 40 % à la même concentration. **(Gutiérrez et al., 2014)** L'activité des différentes parties de *Hyoscyamus albus* est excellente par rapport aux fractions alcaloïdiques des différentes plantes déjà citées, Les inhibitions maximales (65% à 93%) sont atteintes à des concentrations bien plus basses (200 µg/ml et 350 µg/ml).

La réduction du DPPH est faite par don de protons, ou bien par don de protons suivie de don d'électrons, alors que certains antioxydants comme les caroténoïdes le réduisent par réaction d'addition à une double liaison. **(Niki, 2010)**

La réduction du DPPH par les extraits est probablement due aux nombreux groupements Hydroxyles que présentent les cucurbitacines dans leurs structures et peut aussi revenir aux doubles liaisons. Les cucurbitacines existent généralement sous forme glycosylée, on peut donc attribuer l'effet anti-radicalaire des cucurbitacines à leurs parties glycosidiques. **(Nguelefack et al., 2011)**

Pour les calystegines, l'activité des extraits est probablement due aux groupements hydroxyles que présente la structure des calystegines et à leurs positions, ou bien à leurs parties glycosidiques, ou bien les deux ensembles. **(Asano et al., 1997)** cela est appuyé par le fait que les alcaloïdes hydroxylés montrent des activités anti-radicalaires 3 fois plus élevées que leurs analogues non hydroxylés. **(Rackova et al., 2007)**

En dépit de son utilisation courante pour l'évaluation de l'activité antioxydants des extraits de plantes, le test DPPH a quand même certaines limites. L'accessibilité stérique au radical DPPH est une cause déterminante et importante de la réaction, puisque les petites molécules ont un meilleur accès à l'emplacement du radical, elles présentent une capacité antioxydants relativement plus élevée, alors que les grands composés antioxydants réagissent lentement ou peuvent même être inertes dans ce test, donnant ainsi une mauvaise estimation de leur activité anti radicalaire (Pereira *et al.*, 2012).

II.2 Inhibition du radical cationique ABTS

II.2.1 *Ecballium elaterium*

L'inhibition du radical cationique $ABTS^{\cdot+}$ a été évaluée à plusieurs concentrations. Les extraits de toutes les parties des plantes étudiées ont inhibé l'ABTS de façon concentration dépendante, comme le montre la **Figure 28**.

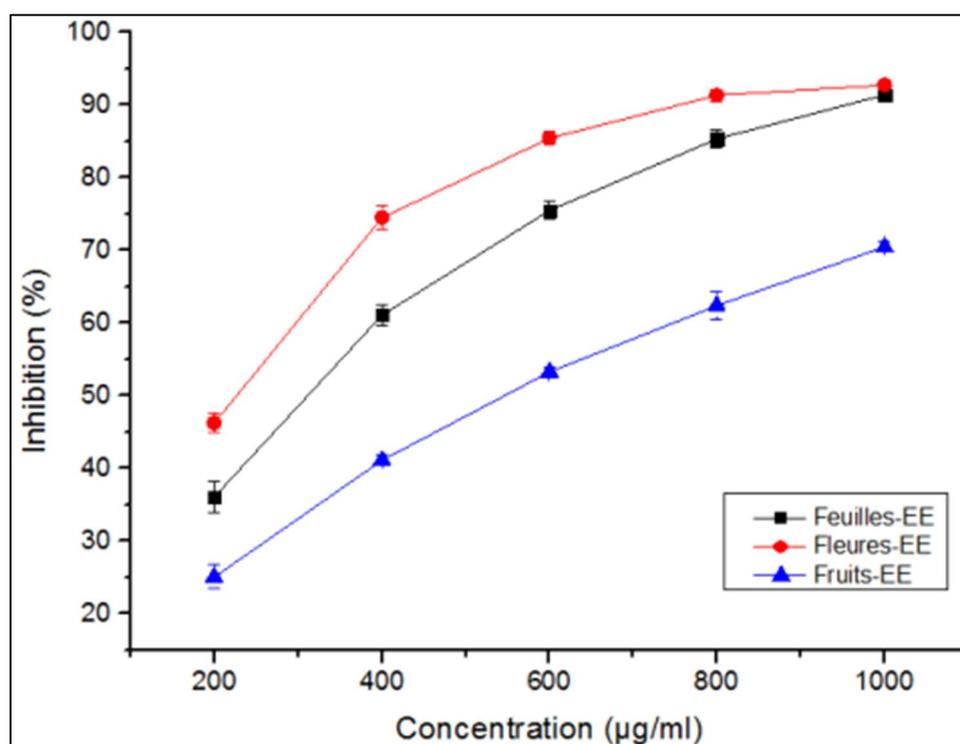


Figure 28 : Inhibition du radical ABTS par les différentes parties d'*Ecballium elaterium*

Les fleurs d'*Ecballium elaterium* ont la plus grande inhibition de 92,74 % à 1 mg/ml par rapport aux feuilles qui ont donné une inhibition de 91,41 % et les fruits qui ont donné 70,50 % à la même concentration. Les fleurs ont une activité significativement supérieure à

l'activité des fruits alors que la différence entre l'activité des fleurs et des feuilles n'est pas significative.

La différence observée entre les extraits est probablement due à une différence de composition entre les trois extraits pas seulement quantitativement mais aussi qualitativement. Comme le montre le **Tableau n°III**, chaque cucurbitacine ou groupe de cucurbitacines peut être responsable d'une activité donnée, donc il faut contenir les cucurbitacines responsables de l'activité recherchée pour obtenir un bon effet. La différence entre les extraits peut revenir aux différentes activités spécifiques des cucurbitacines.

Vue leur activité très élevée les standards sont testés à des concentrations inférieures à celles utilisées pour tester les extraits. Le BHA et le BHT ont donné un maximum d'inhibition de 92,99 % et de 89,96 % à 80 µg/ml respectivement alors que la vitamine C (Acide ascorbique) a donné 86,39% à la même concentration (**Figure 29**). On peut conclure ici que les 3 standards ont donné un effet similaire et significativement différent de l'effet des 3 extraits.

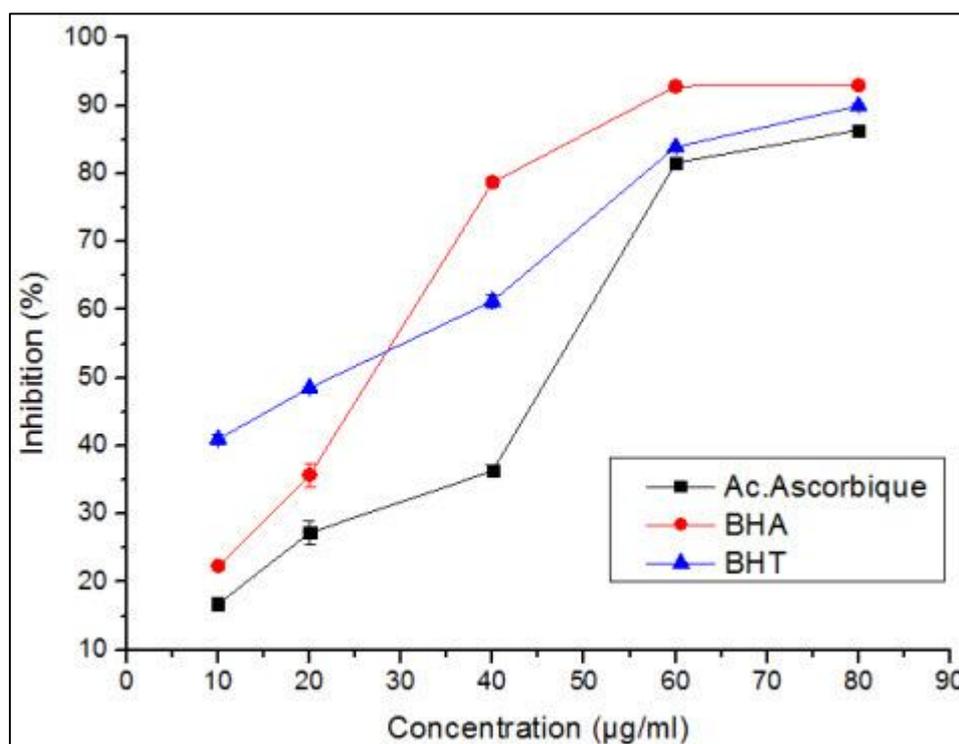


Figure 29 : Inhibition du radical ABTS par les standards (BHA,BHT,Ac.Ascorbique)

La capacité antioxydants pour ce test est exprimée en équivalent TROLOX (TEAC), qui correspond à la concentration du TROLOX en µmol donnant la même activité qu'un gramme de la substance testée, plus le TEAC est élevée est plus la substance est efficace. Pour pouvoir calculer le TEAC, une courbe d'étalonnage est réalisée avec le TROLOX (**Figure 30**).

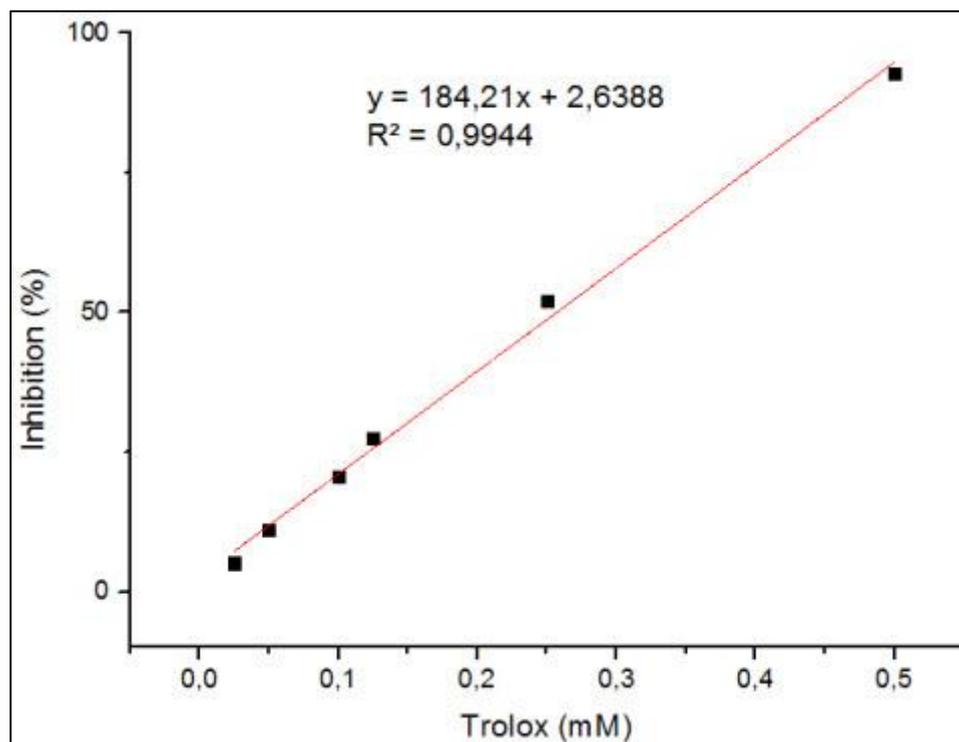


Figure 30 : Courbe d'étalonnage du TROLOX pour l'inhibition du radical ABTS

Les résultats obtenus sont donnés en équivalent TROLOX/g d'extrait (Tableau VII)

Tableau VII : TEAC des différentes parties EE et les standards.

Extrait/ Standard	Concentration μmol trolox/g d'extrait
Feuilles	481,89
Fruits	369,74
Fleurs	489,11
BHA	6130
BHT	5950
A.ascorbique	5680

Les fleurs présentent le TEAC le plus élevé (489,11 μmol T/g d'extrait), et sont considérées comme étant les plus efficaces pour l'inhibition du radical cationique ABTS parmi les différentes parties d'*Ecballium elaterium*, suivie des feuilles avec un TEAC de 481,89 μmol T/g d'extrait, et en fin les fruits avec 369,74 μmol T /g d'extrait.

Les standards ont donné des TEAC plus importants que ceux des extraits, le BHA est le plus actif et efficace avec un TEAC de 6130 puis le BHT avec 5950 et en dernier la vitamine C avec 5680. En comparant les standards avec les fleurs et les feuilles on trouve qu'ils sont de 11 à 13 fois plus actifs que ces dernières, alors qu'ils sont 15 à 17 fois plus actifs que les fruits.

L'étude des triterpènes totaux d'une plante a donné une inhibition du radical ABTS de 65,25% à la concentration de 1,6 mg/ml (Wei et al., 2014). A des concentrations plus faibles (1mg/ml) tous nos extraits ont dépassé les 70% d'inhibition, donc nos extraits sont plus actifs. Alors que les triterpenes de la plante *Agrimonia Pilosa*, ont donné une inhibition de 35% à la concentration de 100 µg/ml tandis que les feuilles d'*Ecballium elaterium* ont donné le même pourcentage mais à la concentration de 200µg/ml, cela veut dire que les extraits de la plante *Agrimonia Pilosa* sont plus actifs que les extraits des feuilles d'*Ecballium elaterium* (Liu et al., 2014).

II.2.2 *Hyoscyamus albus*

On a évalué la capacité antioxydants des différentes parties de *Hyoscyamus albus* et des standards (BHA, BHT, A. Ascorbique) à différentes concentrations, les inhibitions exercées sont données dans la **figure 31**.

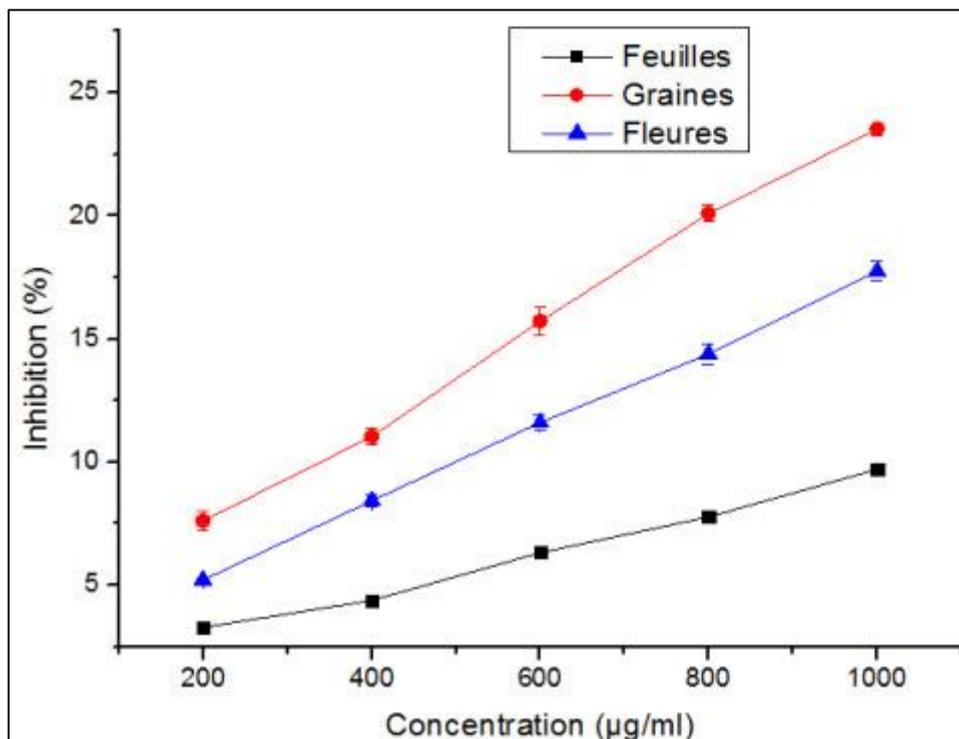


Figure 31 : Inhibition du radical ABTS par les différentes parties de *Hyoscyamus albus*

Les graines ont exercé une inhibition maximale de 23,51 % c'est la plus grande inhibition par rapport aux fleurs qui ont donné 17,75 % et les feuilles qui ont donné un pourcentage faible de 9,7 % seulement. L'effet des graines est significativement supérieur à celui des feuilles alors qu'il n'est pas significativement différent de celui des fleurs. La différence entre les fleurs et les feuilles n'est pas significative. Les standards ont donné des inhibitions assez proches les unes des autres et elles varient entre 86,39 et 92,99 %. A partir de la courbe d'étalonnage de la **figure 32** réalisée avec du TROLOX on calcule les TEAC correspondantes. Les résultats sont présentés dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : TEAC des différentes parties HA et les standards.

Extrait/ Standard	Concentration $\mu\text{mol TROLOX/gr d'extrait}$
Feuilles	38,33
Graines	111,4
Fleurs	82,03
BHA	6130
BHT	5950
A.ascorbique	5680

Avec un TEAC de 111,4 $\mu\text{mol Trolox/gr d'extrait}$, les graines HA sont les plus efficaces contre le radical cationique ABTS, suivies des Fleurs avec 82,03 puis viennent les feuilles en dernier avec 38,33. Le BHA, le plus actif des standards est 55 fois plus actif que les graines HA, alors qu'il est 74 fois plus actif que les fleurs et 159 fois que les feuilles HA.

Les 3 extraits contiennent différentes quantités de calystegines, et peuvent même contenir différents types de calystegines (**Bekkouche et al., 2001**). Les calystegines sont des alcaloïdes poly-hydroxylés qui contiennent entre 3 à 5 groupements hydroxyles, mais leurs activités changent probablement en fonction de la position des groupements hydroxyles. (**Asano et al., 1997**)

Gutiérrez et collaborateurs, 2014 ont étudié l'inhibition du radical ABTS par les alcaloïdes extraits de 4 plantes de la famille des solanacées. Les alcaloïdes extraits des différentes parties de *Nicotiana glauca*, ont donné des inhibitions entre 20 et 25% à 1mg/ml, pour *Nicotiana trigonophylla*, les inhibitions étaient entre 23 et 30 %, les différentes parties de *Solanum nigrescens* ont donné des inhibitions entre 20 et 27%. Les meilleures inhibitions ont

été obtenues avec *Solanum rostratum*, elles étaient entre 18 et 98% toujours à 1 mg/ml. (Gutiérrez et al., 2014) A la même concentration nos extraits ont donné des inhibitions entre 9 et 23%. L'activité de *Hyoscyamus albus* est comparable à celle des 3 premières plantes mais elle est faible par rapport la dernière plante.

Le radical cation, $ABTS^{\bullet+}$, est un radical stable utilisé de la même façon que le DPPH pour l'estimation du pouvoir piègeur des radicaux libres. Au contraire du DPPH, l' $ABTS^{\bullet+}$ doit être généré à partir de l'ABTS avant la réaction.

L' $ABTS^{\bullet+}$ peut être réduit par don de protons, ou par don d'électrons, Tannin-Spitz et ses collaborateurs, 2007, ont étudié la capacité d'un mélange de glucosides de cucurbitacines B et E à réduire le radical cation $ABTS^{\bullet+}$ à sa forme initiale, et ont trouvé que cette réduction est faite par don d'électron, et que l'effet des cucurbitacines est probablement due à leur interaction direct avec les radicaux libres.

Les cucurbitacines portent dans leur structure en moyenne 3 groupements hydroxyles qui sont d'excellents donneurs de protons, ce qui explique la bonne activité des extraits, Il a été démontré que l'activité antioxydants des diterpènes est due à la présence des doubles liaisons dans les méthylènes exo-cycliques dans leurs squelettes. Il est donc possible que l'activité antioxydants des triterpènes (cucurbitacines) puisse être attribuée aux doubles liaisons (C=O, C=C) dans leur squelette, sans oublier la partie glycosydique des cucurbitacines. Les différentes combinaisons et positions des groupements fonctionnels peuvent aussi influencer l'activité des cucurbitacines. (Nguelefack et al., 2011)

Les nombreux groupements hydroxyles portés par les calystegines sont probablement responsables de l'activité que les extraits ont montré, la partie glycosidique des calystegines glycosylés peut aussi être impliquée dans l'activité des extraits. La position des groupements hydroxyles et le glycosyle sur le calystegine contribuent à l'augmentation ou à la diminution de leur activité. (Kato et al., 1997)

II.3 Pouvoir réducteur

Les propriétés antioxydants de nos extraits ont été aussi mesurées par réduction des ions métalliques. La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) mesure la capacité de

nos extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) à son état de valence inférieure, le fer ferreux (Fe^{2+}). C'est une méthode simple, rapide et reproductible qui mesure la capacité des extraits à libérer les électrons (Niki, 2010) .

II.3.1 *Ecballium elaterium*

Pour chaque concentration utilisée, une absorbance a été enregistrée, les résultats obtenus montrent que Les différentes parties d'*Ecballium elaterium* exercent un pouvoir réducteur concentration dépendant comme le montre la **figure 32**.

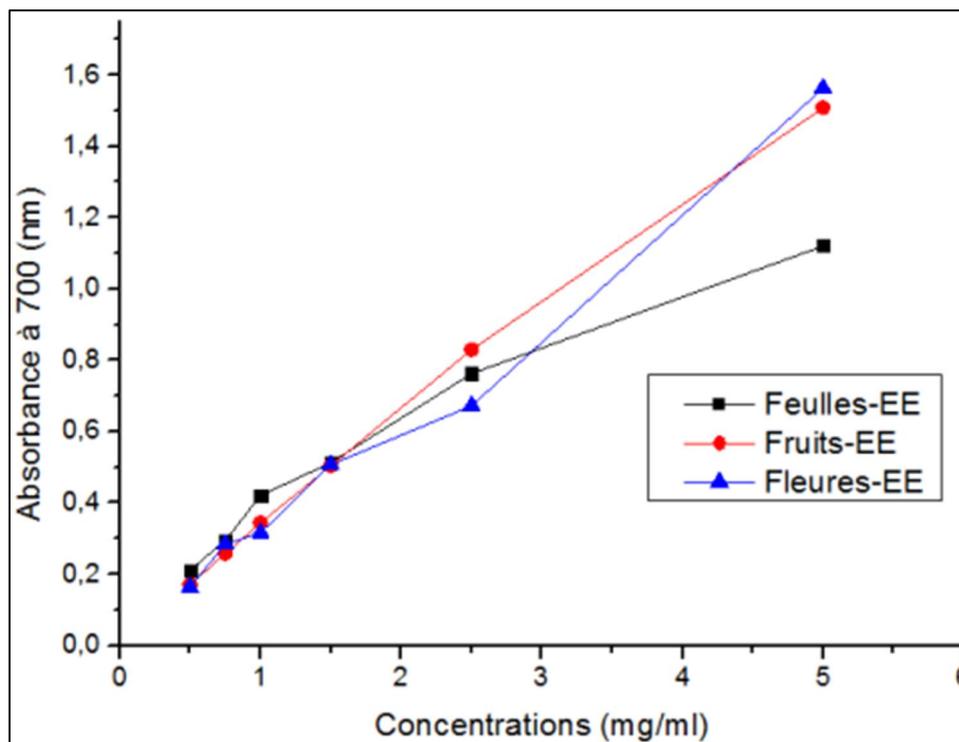


Figure 32 : Pouvoir réducteur des différentes parties d'*Ecballium elaterium*

A une concentration de 5 mg/ml les fleurs-EE ont donné la plus grande absorbance (1,56), suivies des fruits-EE (1,50) et enfin les feuilles-EE avec une absorbance de 1,12. L'acide ascorbique (vitamine C) et le Trolox ont été utilisés comme contrôles positifs, ils ont donné une absorbance maximale de 2,24 et 0,75 respectivement à une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ **Figure 33**.

L'acide ascorbique a un pouvoir réducteur plus puissant que celui du trolox, et les deux standards ont montré un pouvoir réducteur bien plus puissant que les extraits et cela a une concentration bien plus basse.

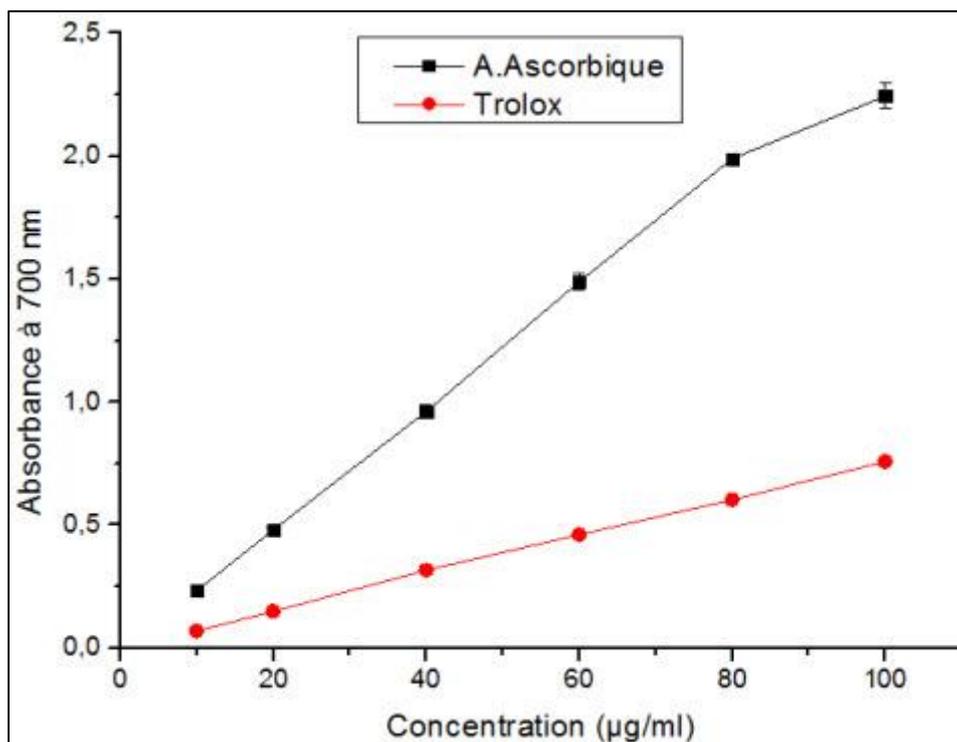


Figure 33 : Pouvoir réducteur du Trolox et de l'acide ascorbique

Pour une meilleure comparaison entre les différents extraits et les contrôles utilisés on a exprimé le pouvoir réducteur en TAC (Total Antioxydant Capacity) ou CAT (Capacité antioxydant Totale), le Trolox est utilisé comme référence et les résultats sont exprimés en équivalent Trolox (Niki, 2010). Pour ceci on utilise la courbe d'étalonnage réalisée avec le TROLOX (figure 34). Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau IX

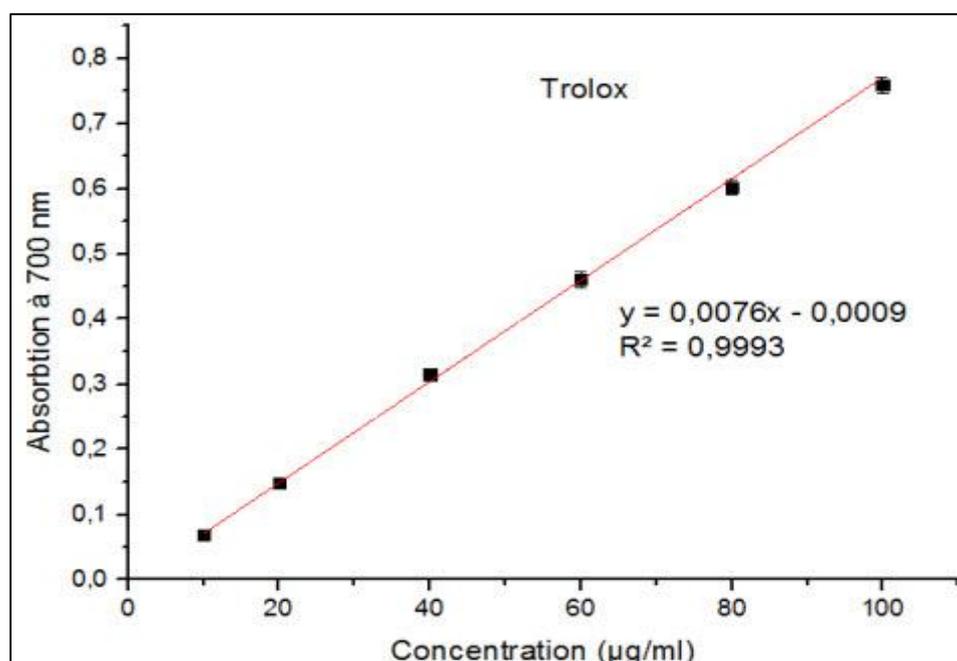


Figure 34 : Courbe d'étalonnage du Trolox pour le pouvoir réducteur

Tableau IX : La TAC des différentes parties d'*Ecballium elaterium* et l'acide ascorbique

Extraits/Standards	TAC ($\mu\text{mol trolox/gr d'extrait}$)
Feuilles-EE	115,60
Fruits-EE	154,70
Fleurs-EE	160,97
Acide ascorbique (Vit C)	11564,18

D'après le **tableau IX**, les fleurs montrent la plus grande TAC parmi les différents organes d'*Ecballium elaterium* et qui est égale à 160,97, suivie des Fruits avec 154,7 et enfin les feuilles avec 115,6, mais en général la différence entre les 3 organes est considérée comme étant non significative. L'acide ascorbique a montré une TAC très élevée de 11564,18 comparée à nos extraits, cette valeur très élevée peut être expliquée par le fait que l'acide ascorbique a un pouvoir réducteur bien supérieur à celui du Trolox qui a été utilisé pour le calcul des différentes valeurs de la TAC.

L'étude du pouvoir réducteur du triterpène, Lantadene A, a montré que son activité n'augmente pas en fonction de la concentration utilisée, à 5 mg/ml l'absorbance n'a pas dépassé 0,5. (**Grace-Lynn et al., 2012**) Alors que pour nos extraits, à 5 mg/ml, ils ont tous dépassé l'absorbance 1 et leur activité augmente en fonction de la concentration utilisée.

Le 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin (triterpène glycoside) a montré un excellent pouvoir réducteur qui dépasse celui de nos extraits, à 30 $\mu\text{g/ml}$ l'absorbance était de 0,71. (**Gülçin et al., 2006**)

II.3.2 *Hyoscyamu albus*

Le pouvoir réducteur des différents organes de *Hyoscyamus albus* a été mesuré de la même façon que l'*Ecballium elaterium*, les résultats montrent que ce pouvoir est concentration-dépendant (figure 35).

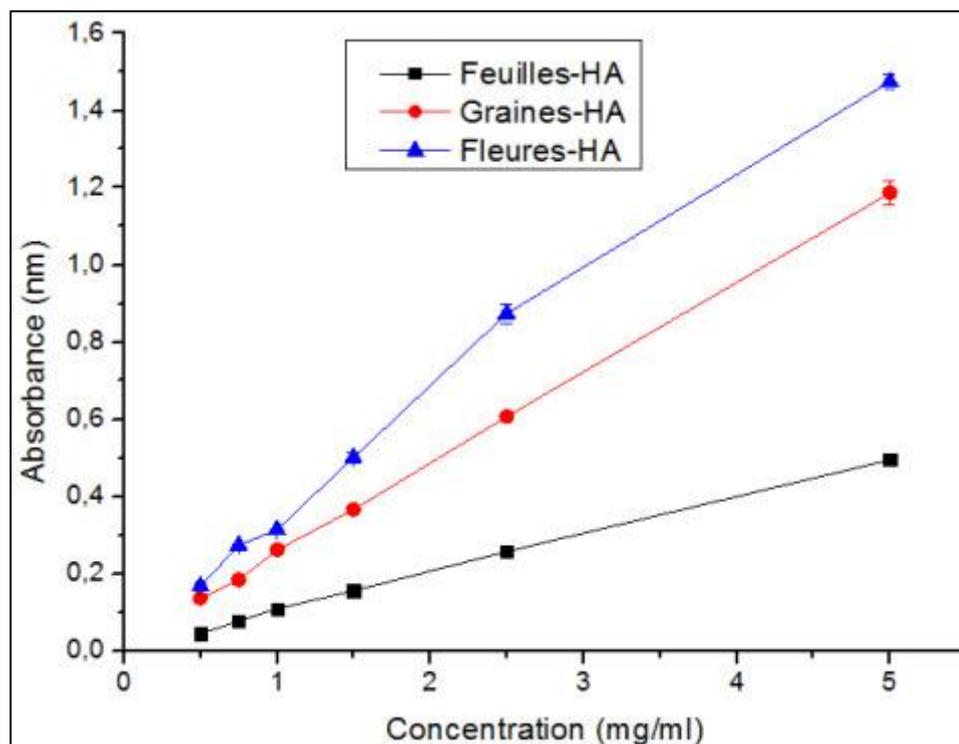


Figure 35 : Pouvoir réducteur des différentes parties de *Hyoscyamus albus*

A 5 mg/ml les fleurs donnent une absorption maximale de 1,47, les graines quand a elles donnent une absorbance maximale de 1,18 à la même concentration, alors que les feuilles ne donnent que 0,49 (toujours à 5mg/ml)

L'acide ascorbique (vitamine C) et le Trolox ont été utilisés comme molécules de références, ils ont donné une absorbance maximale de 2,24 et 0,75 respectivement à une concentration de 100 μ g/ml (**figure 33**). L'acide ascorbique a un pouvoir réducteur plus puissant et significativement différent de celui du trolox, et les deux standards ont montré un pouvoir réducteur bien plus puissant que les extraits et cela a une concentration bien plus basse. En calculant la TAC avec la courbe d'étalonnage de la **Figure 34** nous obtenons les résultats montrés dans le **Tableau X**

Tableau X : TAC des extraits des différentes parties de *Hyoscyamus albus* et de l'acide ascorbique :

Extraits/Standards	TAC (μ mol E trolox/gr d'extrait)
Feuilles-HA	49,9
Graines-HA	145,70
Fleurs-HA	178,6
Acide ascorbique (Vit C)	11564,18

La TAC des Fleurs (178, 6) est supérieur à celles des graines et des feuilles qui on donné 145,7 et 49,9 respectivement. La vitamine C a une TAC très élevée par rapport aux extraits.

Les calystegines présentent dans leurs structures au moins 3 groupements hydroxyles qui peuvent servir comme donneur d'électrons et expliquer l'activité observée des trois extraits testés.

Maiza-Benabdesselam et ses collaborateurs (2007) ont étudié le pouvoir réducteur des alcaloïdes de deux plantes algériennes, ces alcaloïdes ont montré un faible pouvoir réducteur, avec une absorbance qui n'a pas dépassé 0,5 même à 25 mg/ml, contrairement à nos extraits qui ont tous dépassé cette absorbance à 5 mg/ml.

Les alcaloïdes extraits de *solanum aculeastrum* (solanacées) ont montré un très bon pouvoir réducteur qui dépasse celui de nos extraits, ces alcaloïdes ont donné des absorbances proches de 0,5 à 50 µg/ml (**Koduru et al., 2007**) alors que les nôtres n'ont atteint cette absorbance qu'a 5 mg/ml.

Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydants potentielle. L'activité des extraits est due à leur capacité à donner des électrons aux radicaux libres réactifs, les convertissant en espèces non-réactives et, par conséquent, mettant un terme à la réaction en chaîne des radicaux libres. Les groupements hydroxyles qu'ils soient portés par la molécule elle-même ou par la partie glycosidique, là aussi peuvent jouer le rôle de donneur d'électrons et contribuer ainsi à l'activité que présentent les extraits. (**El-haci et Atik-Bekkara, 2011**)

II.4 Effet anti-hémolytique

II.4.1 *Ecballium elaterium*

Pour toutes les parties de la plante, la protection des hématies augmente avec la concentration utilisée. Cette activité est présentée dans la **Figure 36**.

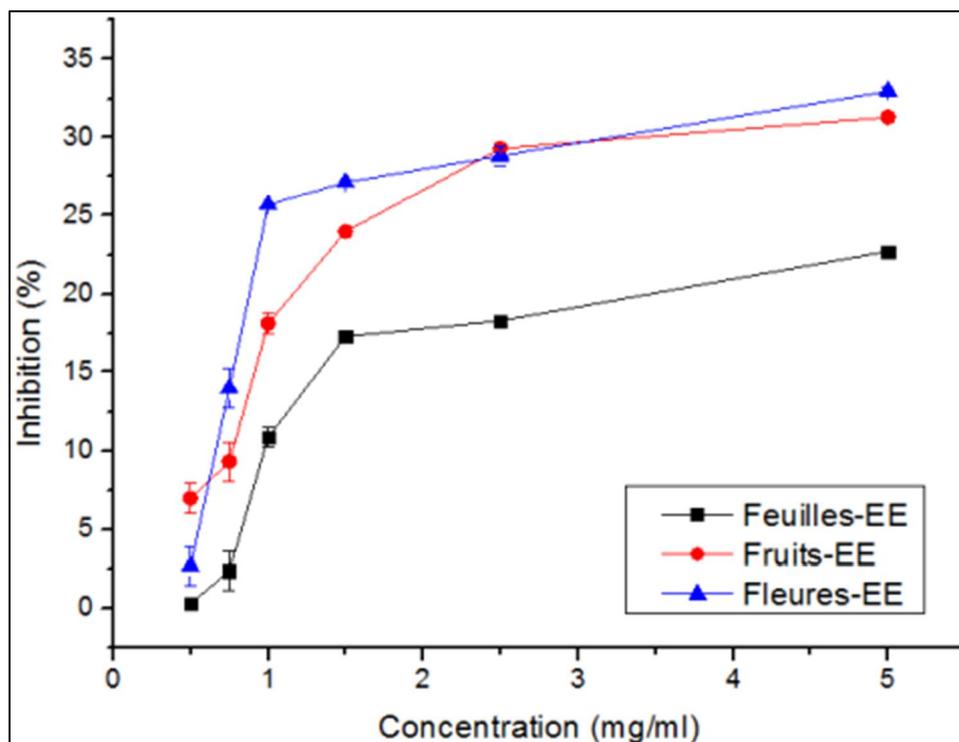


Figure 36 : Effet anti-hémolytique de différentes parties d'*Ecballium elaterium*

Les fleurs ont donné la plus grande inhibition (32,96%), suivies des fruits avec une inhibition de 31,29% et enfin les feuilles avec 22,7%. La différence entre les trois extraits n'est pas significative.

Les standards utilisés sont le Trolox et la vitamine C, leur activité est bien plus puissante que celle des extraits. La vitamine C a donné la plus grande inhibition (58,11%) à la concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$ alors que le trolox a donné 53,80% (**Figure 37**). Dans l'ensemble la différence entre l'activité des deux standards n'est pas significative.

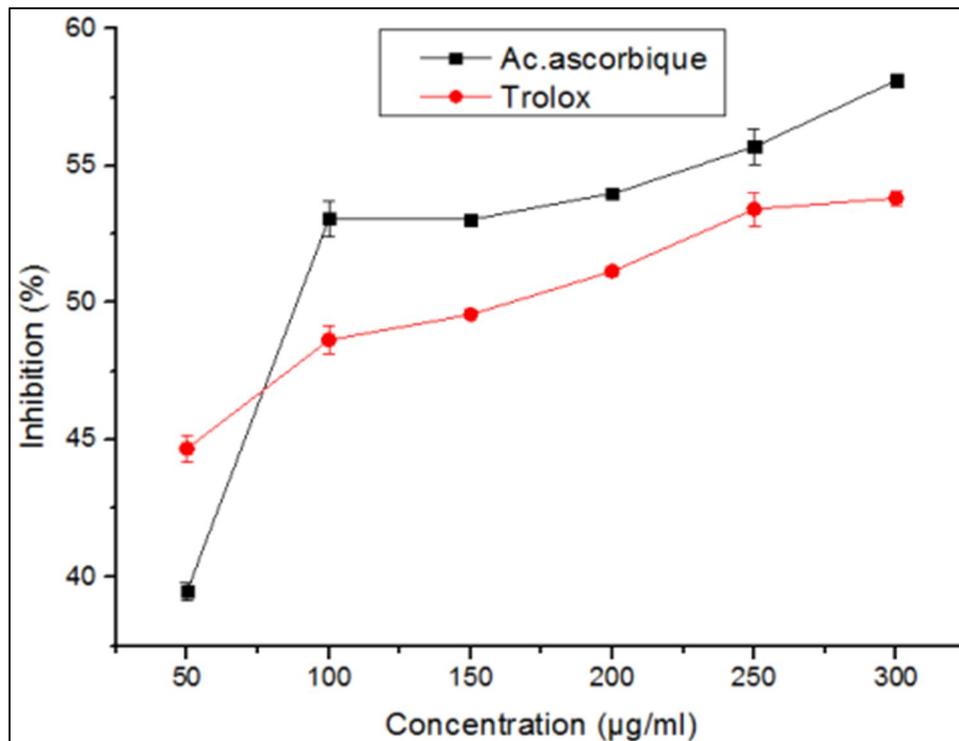


Figure 37 : Effet anti-hémolytique de l'ac.ascorbique et du TROLOX

Sekiya et al. (2007), ont étudié l'inhibition de l'hémolyse induite par AAPH de certains triterpènes, la fraction triterpenique a donné une inhibition de 65% à la concentration de 500 µg/ml alors que l'inhibition de l'acide pachymique (triterpène purifié de la même fraction) était de 45% à la concentration de 1mg/ml. A la même concentration les fleurs de l'*Ecballium elaterium* ont donné 25%. On peut dire que les fleurs de l'*Ecballium elaterium* ont une activité moyenne par rapport à l'acide pachymique.

II.4.2 *Hyoscyamus albus*

Les différentes parties de *Hyoscyamus albus* ont procuré aux hématies une protection dose-dépendante comme le montre la **Figure 38**.

A une Concentration de 2,5 mg/ml les graines ont montré une inhibition maximale de 54,02% suivie des fleurs avec 28,03% et enfin les feuilles avec 22,59%. L'effet des graines est significativement supérieur à celui des feuilles, alors qu'il n'est pas différent de celui des fleurs, la différence entre les fleurs et les feuilles n'est pas significative.

Les graines contiennent peut être plus de calystegines que les autres parties de cette plante, d'où leur activité supérieure. Les différents types de calystegines contiennent différents nombres de groupements hydroxyles, l'activité varie donc non seulement en fonction de la

quantité de calystegines mais aussi en fonction du type de calystegines que contient l'extrait. (Kato et al., 1997)

Les alcaloïdes ont montré une très bonne capacité à inhiber l'hémolyse induite par le radical AAPH, le Lycorine a donné une inhibition de 35% à la concentration de 2,5 mg/ml, alors que la fraction à partir de laquelle cet alcaloïde a été isolé a donné 30% à 40 µg/ml. (Ilavenil et al., 2011) L'activité du Lycorine est comparable à celle des feuilles et des fleurs de *Hyoscyamus albus* qui ont donné des inhibitions de 22 % et 28 % respectivement à la concentration de 2,5 mg/ml, alors qu'elle est inférieure à l'activité des graines qui ont donné 54% à la même concentration.

Le Trolox et l'acide ascorbique sont utilisés comme standards, leur activité est supérieure à celle des extraits **Figure 37**.

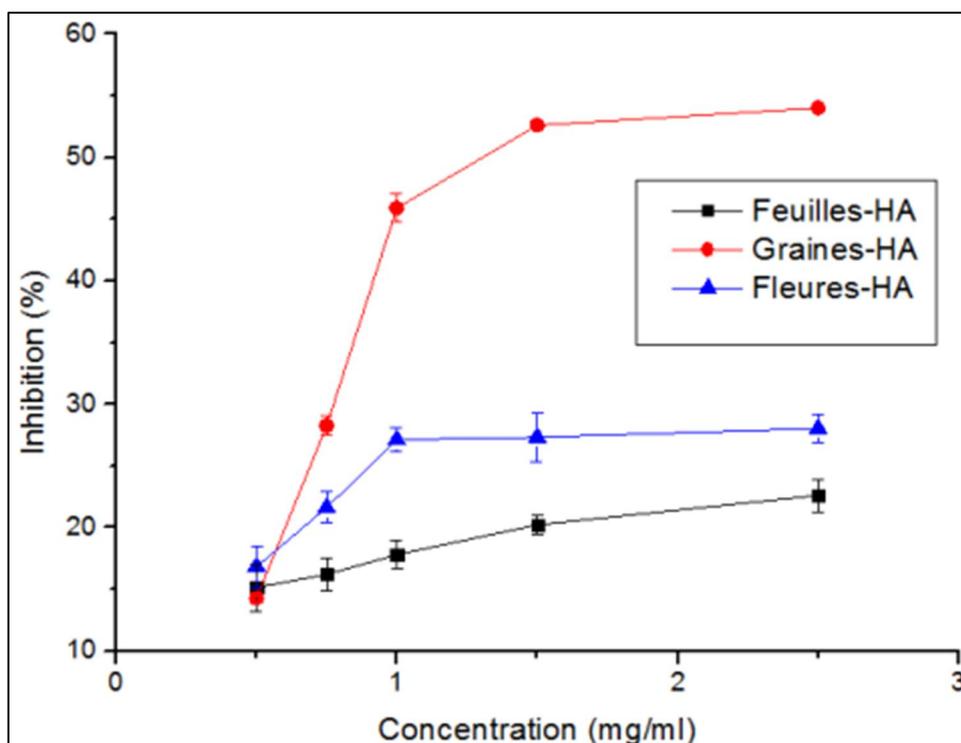


Figure 38 : Effet anti-hémolytique des différentes parties de *Hyoscyamus albus*

La membrane cellulaire est un système dynamique contrôlant étroitement la structure et la fonction cellulaire. Ces dernières sont sensibles aux changements induites par les interactions avec les xénobiotiques. Les dommages infligés à ces composants membranaires peuvent donc influencer l'intégrité de la structure et des fonctions cellulaires. Approximativement la moitié des acides gras dans la membrane des globules rouges humains sont insaturés. Les radicaux

Libres ciblent les membranes de cellules riches en acides gras polyinsaturés provoquant la peroxydation lipidique (Cimen, 2008). L'oxydation des lipides de la membrane des cellules humaines dans le cas des globules rouges causée par l'AAPH, induit des dommages membranaires et l'hémolyse. Ces dommages sont principalement liés à la peroxydation lipidique et en moindre degré à l'oxydation des protéines localisées dans la région hydrophobe de la membrane. (Cimen, 2008)

L'effet protecteur des extraits est probablement, dû à la neutralisation du radical AAPH par don de Protons par les nombreux groupements Hydroxyyles que présentent la structure des calystegines et des cucurbitacines (Kato et al., 1997 ; Nguelefack et al., 2011) comme il peut être dû à la protection des acides gras polyinsaturés de l'oxydation par l'AAPH ou bien aux deux mécanismes associées. Ils pourraient aussi protéger les protéines membranaires contre l'oxydation. (Ilavenil et al., 2011)

Les parties aglycones des cucurbitacines sont hydrophobes, ce qui fait de la membrane plasmique un site potentiel de leurs actions, ils pourraient s'insérer dans la membrane et modifier la position des lipides membranaires et sa fluidité. (Watson et al., 2014) ils pourraient même constituer une barrière autour de la membrane et la protéger des dommages oxydatifs. (Bravo et al., 2001)

III. Activité anti-inflammatoire

III.1 Stabilisation membranaire (hémolyse hypotonique)

III.1.1 *Ecballium elaterium*

Les trois parties testées pour *Ecballium elaterium* (Feuilles, Graines, Fleurs) ont assuré aux globules rouges humains une protection contre l'hémolyse hypotonique qui augmente en fonction de la concentration utilisée. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 39**.

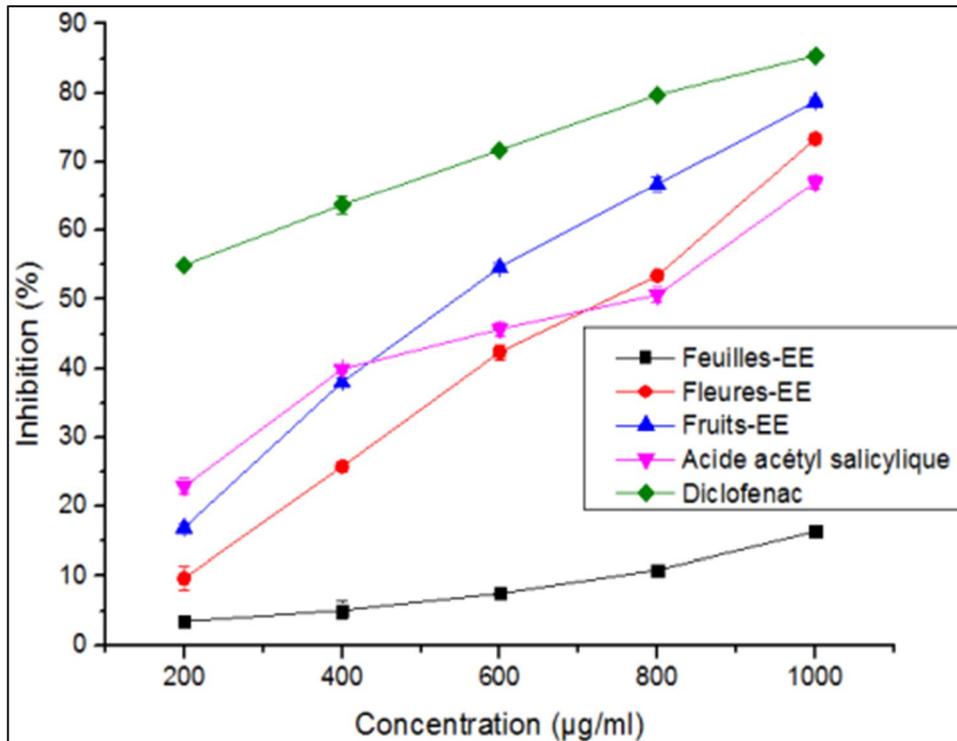


Figure 39 : Stabilisation membranaire par les différentes parties d'*Ecballium elaterium* et les standards (diclofenac et acide acétylsalicylique)

Parmi les différentes parties d'*Ecballium elaterium*, les fruits ont procuré aux globules rouges humains la plus grande protection contre l'hémolyse hypotonique : 78,70% à 1mg/ml, suivie des fleurs avec 73,36% et enfin les feuilles avec 16,38% seulement et à la même concentration.

Le diclofénac a assuré une protection de 85,40% à 1 mg/ml, cette protection est supérieure à celle des trois parties d'*Ecballium elaterium*. L'acide acétylsalicylique a donné une protection maximale de 67,06% à 1mg/ml, cette protection est inférieure à la protection obtenue avec les fleurs et les fruits d'*Ecballium elaterium* à la même concentration.

L'activité du diclofénac n'est pas significativement différente de celle de l'acide acétylsalicylique, des fruits et des fleurs d'*Ecballium elaterium*, alors qu'elle est significativement différente de l'activité des feuilles de la même plante.

L'acide acétylsalicylique a une activité similaire à celles des fruits et des fleurs alors que son activité est significativement supérieure à celle des feuilles.

Entre les trois parties de la plante utilisée dans ce test les fruits ont une activité significativement supérieure à l'activité des feuilles alors qu'elle est considérée comme étant similaire à celle des fleurs.

La variation de l'activité entre les différents extraits est probablement due à leurs teneurs différentes en cucurbitacines, et aux différents types de cucurbitacines que contient chaque extrait.

Diverses concentrations d'une fraction terpénique ont été évaluées pour leurs capacités de stabilisation membranaire et on a observé un effet dose-dépendant de l'activité. À 250 µg/ml, la fraction a montré un effet stabilisateur de 87.26 %. (**Menon et al., 2014**) À 400 µg/ml aucun de nos extraits n'a dépassé 40% d'effet stabilisateur, nos extraits présentent une activité moyenne par rapport à cette fraction, mais les deux présentent un effet dose dépendant.

La prévention de l'hémolyse pourrait être associée à l'inhibition de la libération du potassium (K⁺) ; ceci distingue la stabilisation membranaire de la lyse où le potassium (K⁺) est libéré. La diminution de la fragilité osmotique peut aussi être expliquée probablement par une expansion de la membrane cellulaire (**Seeman et Weinstein, 1966**). Cette expansion peut être accomplie par adsorption de la partie aglycone des cucurbitacines dans la membrane cellulaire, cet effet serait réversible (**Seeman et Weinstein, 1966**).

L'effet anti-inflammatoire des cucurbitacines a été rapporté dans plusieurs études (**Yesilada et al., 1988 ; Ahmad et al., 1995 ; Uslu et al., 2006 ; Rios et al., 2007**) mais il n'y a pas beaucoup d'études sur le mode d'action de ces substances. Le test de stabilisation membranaire pourrait nous renseigner sur le mode d'action des cucurbitacines. Puisque la membrane des globules rouges humains est structurellement semblable à la membrane lysosomale, l'effet de toute substance sur la stabilisation de la membrane des globules rouges humains peut être extrapolé à la stabilisation de la membrane lysosomale. La stabilisation de la membrane lysosomale est importante pour limiter la réponse inflammatoire par l'inhibition de la libération du contenu lysosomale des neutrophiles activées tels que les enzymes bactéricides et protéases, qui causent davantage d'inflammation et de dégâts tissulaires suite à leur libération extracellulaire dans le site de l'inflammation (**Chou, 1997**).

III.1.2 *Hyoscyamus albus*

Les trois parties de *Hyoscyamus albus* ont assuré aux globules rouges humains une protection dose- dépendante comme le montre la **Figure 40**.

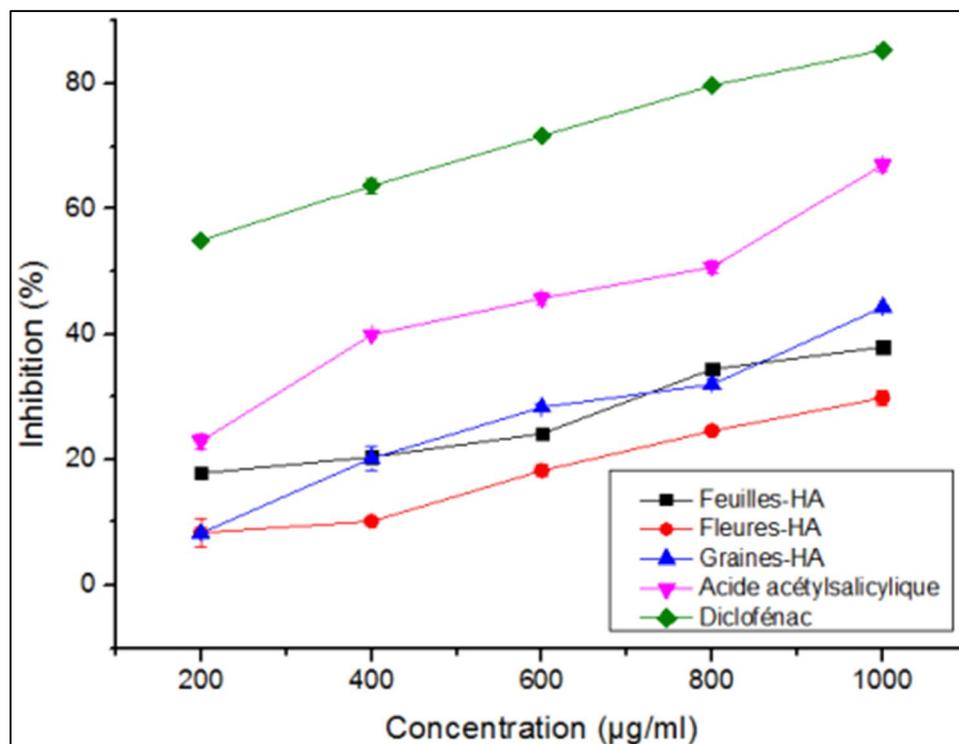


Figure 40 : Stabilisation membranaire par les différentes parties de *Hyoscyamus albus* et les standards (Aspirine et Voltarène)

Les graines ont donné le meilleur résultat avec une protection de 44,25% suivie des feuilles avec 37,90 et enfin les fleurs avec 29,80% à la concentration de 1mg/ml. A la même concentration le diclofénac sodique et l'acide acétylsalicylique ont donné des protections de 85,40 % et 67,06% respectivement.

L'activité du diclofénac est significativement supérieure à celle de l'acide acétylsalicylique et des 3 extraits, alors que l'activité de l'acide acétylsalicylique est similaire à celle des graines et des feuilles, mais elle est significativement supérieure à l'activité des fleurs. La différence entre les trois extraits n'est pas significative.

Des alcaloïdes étudiés ont montré un effet stabilisateur de 74,8 % et 82,2% aux concentrations 100 et 250 µg/ml respectivement. (Arun et Brindha, 2012) Ces alcaloïdes sont plus actifs que tous nos extraits, mais l'effet est toujours concentration dépendant. Les inhibitions données par un autre extrait alcaloïdique étaient entre 36 et 46% à des concentrations variant entre 100 et 500 µg/ml. Alors que l'inhibition donnée par un alcaloïde (Plumerianine) purifié à partir de cette fraction était 47,22% à 500 µg/ml. (Alakshmi et al., 2011-1 ; Alakshmi et

al., 2011-2) L'activité de cette fraction et de l'alcaloïde isolé de cette fraction est comparable à l'activité de nos extraits.

L'effet stabilisateur de la membrane des globules rouges humains pourrait être en relation avec la réduction du rapport superficie/volume des cellules, cela peut être provoqué par une expansion de la membrane ou du rétrécissement des cellules et une interaction avec des protéines membranaires (Shinde *et al.*, 1999).

Il a également été démontré que le volume et la déformabilité des érythrocytes est étroitement lié au contenu intracellulaire en calcium. Par conséquent, on peut spéculer que l'effet cyto-protecteur sur la membrane des érythrocytes peut être dû à la capacité des extraits à changer le flux du calcium dans les érythrocytes (Shinde *et al.*, 1999).

III.2 Dénaturation des protéines :

III.2.1 *Ecballium elaterium*

Les résultats obtenus pour les différents extraits testés sont montrés dans la **figure 41**.

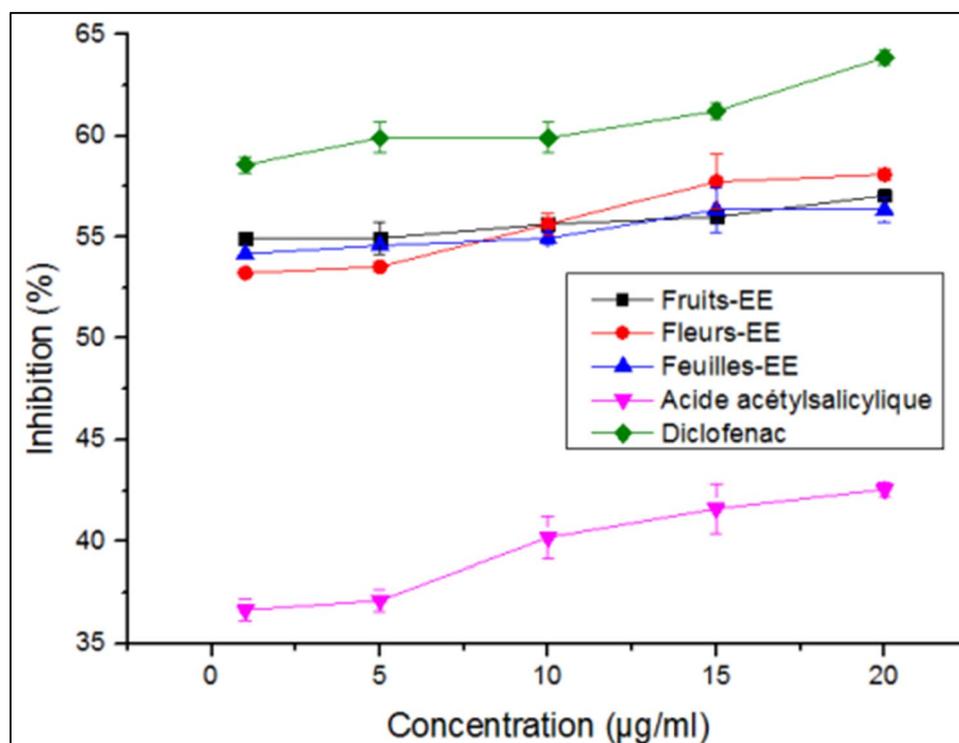


Figure 41 : Inhibition de la dénaturation d'albumine humaine par les différentes parties d'*Ecballium elaterium* et les standards

Les trois extraits ont donné des inhibitions très proches et qui est concentration-indépendante, une inhibition maximale de 58,09% est obtenue avec les fleurs à la concentration de 20 μ g/ml, à la même concentration les fruits et les feuilles ont donné 57,04 % et 56,33 % respectivement.

Le diclofénac a donné une inhibition maximale de 63,87% à 20 μ g/ml alors que l'acide acétylsalicylique n'a donné que 42,55% à la même concentration.

L'effet du diclofénac est significativement supérieur à celui de l'acide acétylsalicylique et des 3 extraits. Tous les extraits ont un effet significativement supérieur à l'effet donné par l'acide acétylsalicylique, alors que la différence entre eux n'est pas significative.

Menon et al. 2014 ont étudié la capacité d'une fraction terpénique à inhiber la dénaturation protéique, cette fraction a donné un effet dose-dépendant, et une inhibition de 33 % à 25 μ g/ml, alors que nos extraits ont tous donné plus de 50% d'inhibition à 1 μ g/ml.

III.2.2 *Hyoscyamus albus*

La **figure 42** montre les résultats obtenus pour les différents extraits de *Hyoscyamus albus*.

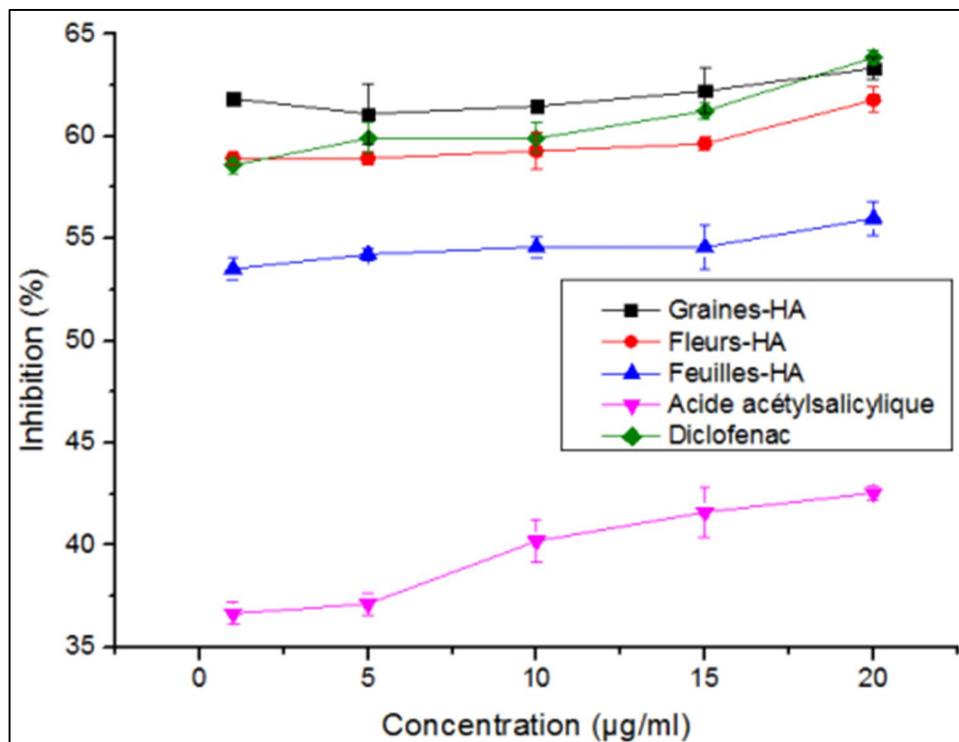


Figure 42 : Inhibition de la dénaturation d'albumine humaine par les différentes parties de *Hyoscyamus albus* et les standards

Les trois extraits de *Hyoscyamus albus* ont donné une très bonne inhibition de la dénaturation de l'albumine, les graines ont donné la meilleure inhibition avec 63,33% à la concentration de 20µg/ml, suivies des fleurs avec 61,78% et enfin des feuilles avec 55,98% à la même concentration.

Le diclofénac et l'acide acétylsalicylique ont donné 63,87% et 42,55% respectivement à la concentration de 20 µg/ml.

Les graines et les fleurs ont donné une activité similaire à celle du diclofénac, alors que son activité est significativement supérieure à celle des feuilles et de l'acide acétylsalicylique.

Tous les extraits ont une activité significativement supérieure à celle de l'acide acétylsalicylique.

Les fleurs et les graines ont une activité similaire et significativement supérieure à celle des feuilles.

L'étude d'**Arun et Brindha (2012)** sur la capacité d'une fraction alcaloïdique à stabiliser la BSA a montré que cette fraction donne de très bons résultats avec une stabilisation de 69,7% à 100 µg/ml. Tous nos extraits ont donné des inhibitions dépassant les 50% seulement à 1 µg/ml, nos extraits sont plus actifs que cette fraction alcaloïdique.

La stabilisation de l'albumine pourrait survenir après interaction directe avec les extraits. Cette interaction pourrait augmenter l'énergie libre de l'état déplié (dénaturé) de la protéine favorisant ainsi son état replié (native), c'est une stabilisation thermodynamique. Un autre mécanisme possible serait que l'interaction des extraits avec l'albumine humaine empêche l'agrégation de cette dernière, cela augmente la solubilité de la protéine et limite les interactions protéine-protéine. Les extraits pourraient même se fixer à l'albumine partiellement dénaturée et la stabiliser ou pourraient aussi agir en retardant la dénaturation thermique de l'albumine humaine. (**Sharma et al., 2012**)

Un certain nombre de médicaments anti-inflammatoires sont connues pour empêcher la dénaturation des protéines. **Mizushima et Kobayashi 1968** ont utilisé la dénaturation des protéines comme modèle in vitro de criblage pour les composés potentiellement anti-inflammatoires. Il est très important de signaler qu'il y'a beaucoup de rapports qui indiquent l'importance de la dénaturation des protéines comme cause de l'inflammation (**Mizushima et Kobayashi, 1968**)

Pour mieux comprendre le mécanisme de l'activité anti inflammatoire, la capacité des extraits à empêcher la dénaturation des protéines a été étudiée. La production ou l'apparition des auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques peut être due à la dénaturation des protéines in-vivo. Les agents qui peuvent empêcher la dénaturation des protéines, seraient donc de bons candidats pour le développement de médicaments anti-inflammatoires (**Chandra et al., 2012**).

Vue les résultats que nous avons, nous pouvons spéculer que nos extraits peuvent inhiber la formation d'auto-antigènes par inhibition de la dénaturation des protéines et de ce fait ils inhibent la formation d'auto-anticorps observés dans les maladies auto-immunes.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Cette étude, pouvant être perçue comme une ébauche à une étude à venir plus approfondie, démontre le potentiel antioxydant et anti-inflammatoire des deux plantes étudiées.

Pour *Ecballium elaterium*, on peut conclure qu'en terme de rendement les fleurs sont les plus riches en cucurbitacines, suivies des fruits et des feuilles.

En termes d'activité antioxydants les différentes parties d'*Ecballium elaterium* ont toutes montré une très bonne activité antioxydants, les fleurs et les feuilles sont plus actives que les fruits. Dans l'activité anti-radicalaire les extraits d'*Ecballium elaterium* ont montré un meilleur effet dans l'inhibition du radical DPPH que dans l'inhibition du radical ABTS. Dans le test du pouvoir réducteur les fruits et les fleurs ont donné le meilleur effet. Les trois extraits ont montré un effet anti-hémolytique moyen.

Concernant l'activité anti-inflammatoire se sont les fruits et les fleurs qui sont les plus actifs, que ça soit dans les test de stabilisation membranaire ou dans le test d'inhibition de la dénaturation d'albumine humaine, les deux extraits ont donné d'excellents résultats qui dépassent parfois les standards utilisé (diclofénac et acide acétylsalicylique), les feuilles ont donné une faible activité anti-inflammatoire.

Pour *Hyoscyamus albus*, ce sont les graines qui ont donné le plus grand rendement d'extraction, alors que les fleurs ont donné le rendement le plus faible.

Les graines de *Hyoscyamus albus*, sont les plus actives parmi les différents extraits testés. Dans l'activité antioxydants, tous les extraits ont inhibé le radical DPPH alors que leurs activités étaient faibles dans l'inhibition du radical ABTS. Ce sont les fleurs qui ont exhibé le meilleur pouvoir réducteur. Les graines ont procuré aux globules rouges humains la meilleure protection contre l'hémolyse oxydative.

Dans l'activité anti-inflammatoire, les différentes parties ont montré une stabilisation membranaire moyenne et une très bonne stabilisation de l'albumine humaine.

En perspectives ; on peut proposer :

- ❖ L'identification précise des constituants de chaque extrait, par HPLC pour les cucurbitacines et par CG-MS pour les calystegines.
- ❖ La réalisation d'études in-vivo pour confirmer les activités observées in-vitro.

Conclusion

- ❖ L'étude de la toxicité des principes actifs d'intérêt (Toxicité aiguë, subaiguë et chronique)
- ❖ les cucurbitacines et les calystegines possèdent un large spectre d'activités, on propose donc d'élargir le champ de recherche et d'étudier d'autre activité : Activité antimicrobienne, antivirale, antidiabétique et cytotoxique.

Références

Bibliographiques

- Adwan, G., Salameh, Y., & Adwan, K. (2011). Effect of ethanolic extract of *Ecballium elaterium* against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 456-460.
- Ahmad M Agil, S. R., M. Miro, M. C. Navarro, M. A. Ocete et J. Jiménez (1995). Analgesic and Antipyretic Effects of *Ecballium elaten'um* (L.) A. Richard. Extract in Rodents. *phytotherapy research*, 9, 135-138.
- Alakshmi, A. V., Ravichandiran, V., Jayakumari, S., Velraj, M., & Nirmala, S. (2011). Anti-anaphylactic and Anti-inflammatory Activities of AFPA from the Root Bark of *Plumeria acutifolia* Poir. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45(4), 339-345.
- Alakshmi, V., chandiran, R., Velraj, M., Hemalatha, & Jayakumari. (2011). Anti-Anaphylactic and Anti-Inflammatory Activities of a Bioactive Alkaloid from the Root Bark of *Plumeria acutifolia* Poir. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 525-533.
- ALQASOUMI, S. I. (2007). *Isolation and Chemical Structure Elucidation of Hepatoprotective Constituents from Plants Used in Traditional Medicine in Saudi Arabia*. (PhD), King Saud University, Saudi Arabia.
- Andersson, H. C. (2002). *Calystegine Alkaloids in Solanaceous Food Plants*: Nordic.
- Arbos, K. A., Claro, L. M., Borges, L., Santos, C. A. M., & Weffort-Santos, A. M. (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28, 457-463.
- Arun, k., & Brindha, p. (2012). studies on antioxidant and antiarthritic potentials of *jatropha tanjorensis ellis* and *saroja* *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 136-138.
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A. A., Nash, R. J., Molyneux, R. J Winchester, B. (1997). The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology*, 7(8), 1085-1088.

- Attard, E. (2002). Rapid Detection of Cucurbitacins in Tissues and in vitro Cultures of *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 25, 71-75.
- Attard, E., & Attard, H. (2008). Antitrypsin activity of extracts from *Ecballium elaterium* seeds. *Fitoterapia*, 79, 226–228.
- Azimova, S. S., & Glushenkova, A. I. (2012). *Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources*: springer.
- Baja, Y. P. S. (1990). *Haploids in Crop Improvement I*: Springer verlag.
- Baja, Y. P. S. (2001). *Transgenic Crops III*: Springer.
- Barceloux, d. g. (2008). *medical toxicology of natural substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals*: Wiley.
- Bekkouche, K., Daali, Y., Cherkaoui, S., Veuthey, J.-L., & Christen, P. (2001). Calystegine distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry*, 58, 455-562.
- Benzie, I. f. f., & Galor, s. W. (2011). *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects* (6 ed.): CRC PRESS.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
- Blom, J. D. (2010). *A Dictionary of Hallucinations*: springer.
- Bohlooli, S., Jafari, N., & Jahed, S. (2012). Cytotoxic Effect of Freeze-Dried Extract of *Ecballium elaterium* Fruit on Gastric Adenocarcinoma (AGS) and Esophageal Squamous Cell Carcinoma (KYSE30) Cell Lines. *Journal of Gastrointestinal Cancer Volume*, 43 (4), 579-583
- Bojnanský, V., & Fargašová, A. (2007). *Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European Flora: The Carpathian Mountains region*: Springer.
- Boullard, B. (2001). *Plantes médicinales du monde: croyances et réalités*: ESTEM.

- Bravo, J.-M., Perzl, M., rtner, T. H. È., Kannenberg, E. L., & Rohmer, M. (2001). Novel methylated triterpenoids of the gammacerane series from the nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Eur. J. Biochem*, 268, 1323-1331.
- Burrows, G. E., & Tyrl, R. J. (2013). *Toxic Plants of North America*: Wiley-Blackwell.
- Chandra, S., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Preliminary in vitro assessment of anti-inflammatory property of *Mikania scandens* flower extract. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 2, 25-31
- Chou, C. (1997). The anti-inflammatory effect of *Tripterygium wilfordii* Hook F on adjuvant-induced paw edema in rats and inflammatory mediators release. *phytotherapy research*, 11, 152-154.
- Çimen, M. Y. B. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 390, 1–11.
- Davies, c. a., Blake, d. r., & winyard, p. g. (2001). Radicals and Inflammation: Mediators and Modulators *Environmental stressors in health and disease* (pp. 17-53). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Devendra, N. K., Attard, E. G., Raghunandan, D., & Seetharam, Y. N. (2011). Study on Seasonal Variation on the Content of Cucurbitacin of Various Vegetative Parts of *Trichosanthes cucumerina* L. var. *cucumerina*. *International Journal of Plant Research*, 1(1), 25-28.
- Diarmaid, H., & Andersson, D. L. (2001). *Antibiotic Development and Resistance*: CRC Press.
- Drager, B., & Biastoff, S. (2007). Calystegines In G. A. Cordell (Ed.), *The Alkaloids, Chemistry and Biology* (Vol. 64, pp. 49): Elsevier, Academic Press.
- Drager, B., Funck, C., Hrhler, A., Gabriele Mrachatz, Nahrstedt, A., Portsteffen, A., . . . Schmidt, R. (1994). Calystegines as a new group of tropane alkaloids in Solanaceae *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 235-240.
- Ebizuka, Y., & Nagata, T. (2002). *Medicinal and Aromatic Plants* (Vol. 12): Springer.

- Eich, E. (2008). *Solanaceae and convolvulaceae : secondary metabolites*: Springer.
- El-haci, i. A., & atik-bekkara, f. (2011). Antioxidant activity of stems and leaves organic fractions of *Ecballium elaterium* L. *Annals of Biological Research* 327-332, 2 (3), 327-332.
- Elhajji, h., nkhilli, e., tomao, v., & dangles, o. (2006). Interactions of quercetin with iron and copper ions: Complexation and autoxidation. *Free Radical Research*, 40 (3), 303–320.
- Evans, W. C. (2002). *Pharmacognosy* (16 ed.): saunders Elsevier.
- Fattorusso, E., & Scafati, O. T. (2008). *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*: Wiley-VCH
- Fuchs, J., & packer, L. (2005). *Environmental Stressors in Health and Disease*: Tyler et francic e-library.
- Gautier, A. (1822). *Manuel des plantes médicinales* AUDOT.
- George, A., Augustine, R., & Sebastian, M. (2014). *Diabetes mellitus and human health care*. canada: Apple Academic Press.
- Gill, N. S., & Bali, M. (2011). Isolation of Anti Ulcer Cucurbitane Type Triterpenoid from the Seeds of *Cucurbita pepo*. *Research Journal of Phytochemistry*, 5, 70-79.
- Gokhale, S. B. (2009). *Pharmacognosy*: Nirali Parakashan.
- Grace-Lynn, C., Darah, I., Chen, Y., Latha, L. Y., Jothy, S. L., & Sasidharan, S. (2012). In Vitro Antioxidant Activity Potential of Lantadene A, a Pentacyclic Triterpenoid of *Lantana* Plants *Molecules*, 17, 11185-11198.
- Greige-Gerges, H., Khalil, R. A., Mansour, E. A., Magdalou, J., Chahine, R., & 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.
- Gry, J., Søborg, I., & Andersson, H. C. (2006). *Cucurbitacins in plant food*: Nordic.

- Gülçin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., & Elias, R. (2006). The Antioxidant Activity of a Triterpenoid Glycoside Isolated from the Berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 20, 130-134.
- Gutiérrez, d. M. A., bah, m., r, m. L. G., d, s. O. M., & c, v. S. (2014). Anti-inflammatory and antioxidant activities of methanol extracts and alkaloid fractions of four mexican medicinal plants of solanaceae. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 11(3), 259-267.
- Hoffmann, D. (2013). *Medical Herbalism: The science and Practice of Herbal medicine*: Healing arts press.
- Horst, A. (1991). *Molecular Pathology*. United states: CRC Press.
- Ilavenil, S., Kaleeswaran, B., Sumitha, P., Tamilvendan, D., & Ravikumar, S. (2011). Protection of human erythrocyte using *Crinum asiaticum* extract and lycorine from oxidative damage induced by 2-amidinopropane. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18, 181-187.
- Judd., W. S., Campbell., C. S., Kellogg., E. A., & Stevens., P. (2002). *Botanique systématique: Une perspective phylogénétique*: deboeck.
- Kadi, K., Yahia, A., Hamli, S., Auidane, L., Khabthane, H., & Ali, W. K. (2013). In vitro Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of White Henbane Treated By Phytohormones. *Pakistan Journal of biological Sciences*, 1-7.
- Kato, a., asano, n., kizu, h., matsui, k., suzuki, s., & arisawa, m. (1997). Calystegine alkaloids from *duboisia leichhardtii*. *Phytochemistry*, 45(2), 425-429.
- Keiner, R., & Drager, B. (2000). Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Science*, 150, 171 – 179.
- KHARE, C. P. (2004). *Indian Herbal Remedies: Rational Western Therapy ,Ayurvedic and Other Traditional Usage ,Botany* BERLIN: Springer-Verlag

- Koduru, S., Jimoh, F. O., Grierson, D. S., & Afolayan, A. J. (2007). Antioxidant Activity of Two Steroid Alkaloids Extracted from *Solanum aculeastrum*. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2(2), 160-167.
- Kubitzki, K. (2011). *Flowering Plants. Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae*: Springer.
- Lemke, T. L., & Williams, D. A. (2013). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*: lippincott williams et wilkins.
- Lindley, J. (1836). *A natural system of botany*. London: W-Nicol.
- Liu, c.-h., yen, m.-h., tsang, s.-f., gan, k.-h., hsu, h.-y., & lina, c.-n. (2010). Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *Food Chemistry*, 118, 751-756.
- Liu, x., zhu, l., tan, j., zhou, x., xiao, l., yang, x., & wang, b. (2014). Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia Pilosa* Ledeb. *Complementary and Alternative Medicine*, 14, 12-22.
- Lunga, I., Kintia, P., Shvets, S., Bassarelo, C., Pizza, C., & Piacente, S. (2006). Three spirostanol glycosides from the seeds of *hyoscyamus niger* l. *Chemistry journal of moldova*, 1, 100-103.
- Maiza-Benabdesselam, F., Khentache, S., Bougoffa, K., Chibane, M., Adach, S., Chapeleur, Y., . . . Laurain-Mattar, D. (2007). Antioxidant activities of alkaloid extracts of two Algerian species of *Fumaria* : *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. *Rec. Nat. Prod*, 1(2-3), 28-35.
- Menon, d. B., m, s. J., & k, g. V. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory properties of terpenoid fraction isolated from the shoot of *Plectranthus hadiensis*. *Int J Pharm Bio Sci*, 5(2), 197 -205.
- Minelli, A. (2004). *Sea cliffs and rocky coastlines : Life between cliffs and saltiness*: Museo Friulano di Storia Naturale.
- Miro, M. (1995). Cucurbitacins and their Pharmacological Effects. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 9, 159-168.

- Mizushima, y., & kobayashi, m. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20, 169-173.
- Nguelefack, T. B., Mbakam, F. H. K., Tapondjou, L. A., Watcho, P., Nguelefack-Mbuyo, E. P., Ponou, B. K., . . . Park, H.-J. (2011). A Dimeric Triterpenoid Glycoside and Flavonoid Glycosides with Free Radical-Scavenging Activity Isolated from *Rubus rigidus* var. *camerunensis*. *Arch Pharm Res*, 34(4), 543-550.
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 503–515.
- Oloyede, K. G., Oke, M. J., Raji, Y., & Olugbade, A. T. (2010). Antioxidant and Anticonvulsant Alkaloids in *Crinum ornatum* Bulb Extract. *World Journal of Chemistry*, 5(1), 26-31.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- Paquereau, J. (2013). *Au jardin des plantes de la bible : botanique, symboles et usages*: Printco.
- Pereira, D. F., Zanon, R. B., Santos, M. d., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2012). Antioxidant activities and triterpenoids isolated from *Alternanthera brasiliana*(L.) Kuntze leaves. *Natural Product Research*, 1, 1–4.
- Preedy, V. R., Watson, R. R., & Patel, V. B. (2011). *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention*: Academic Press-Elsevier.
- Quézel, p., & santa, s. (1963). *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales*: centre nationale de la recherche scientifique.
- Rackova, L., Oblozinsky, M., Kostalova, D., Kettmann, V., & Bezakova, L. (2007). Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of *Mahonia aquifolium* extract and isoquinoline alkaloids. *Journal of Inflammation*, 4, 15-22.

- Re, r., pellegrini, n., protegente, a., thpannala, a., yang, m., & rice-evans, c. (1999).
Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay.
Free Radical Biology & Medicine, 26, 1231–1237.
- Rice-Evans, C. A., & Miller, N. M. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids.
Methods in Enzymology, 234, 279-293.
- Riddle, J. M. (1997). *Eve's Herbs: A History of Contraception and Abortion in the West*.
Library of congress cataloging-in-publication data.
- Rios, j. L., escandell, j. M., & recio, m. C. (2005). New insights into the bioactivity of
cucurbitacins In Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*:
Bioactive Natural Products (Part L) (Vol. 32, pp. 429). Amsterdam: Elsevier.
- Roberts, M. F., & Wink, M. (1998). *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal
Applications* New York: Springer Science+Business Media.
- Roy, S., Bagchi, D., & Raychaudhuri, S. P. (2013). *Chronic inflammation: Molecular
Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions*: CRC PRESS.
- Seeman, p., & Weinstein, j. (1966). erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and
antihistamines. *Biochemical Pharmacology*, 15, 1737-1752.
- Sekiya, N., Goto, H., Shimada, Y., Endo, Y., Sakakibara, I., & Terasawa, K. (2003).
Inhibitory Effects of Triterpenes Isolated from Hoelen on Free Radical-induced Lysis
of Red Blood Cells. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 17, 160-162
- serhan, C. n., Ward, P. a., & Gilroy, d. W. (2010). *Fundamentals of Inflammation*. United
States of America: Cambridge University Press.
- Shan, L. Y., Thing, T. C., Ping, T. S., Awang, K., Hashim, N. M., Nafiah, M. A., & Ahmad,
K. (2014). Cytotoxic, antibacterial and antioxidant activity of triterpenoids from
Kopsia singaporensis Ridl. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(5),
815-822.

- Sharma, S., Pathak, N., & Chattopadhyay, K. (2012). Osmolyte induced stabilization of protein molecules: a brief review. *Journal of proteins and proteomics*, 3 (2), 129-139.
- Shinde, U., Phadke, A., Nari, A., Mungantiwar, A., Dikshit, V., & Saraf, M. (1999). Membrane stabilization activity-a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia*, 70, 251-257.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., & Grossman, S. (2007). Cucurbitacin glucosides: Antioxidant and free-radical scavenging activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 181–186.
- Tepfer, d., goldmann, a., pamboukdjian, n., maille, m., leplinge, a., chevalier, d., . . . Rosenberg, c. (1988). A Plasmid of Rhizobium meliloti 41 Encodes Catabolism of Two Compounds from Root Exudate of Calystegium sepium. *journal of bacteriology*, 170, 1153-1161.
- Topçu, G., Ertaş, A., Kolak, U., Mehmet Öztürk, & Ulubelen, A. (2007). Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from Salvia macrochlamys. *ARKIVOC*, 7, 195-208.
- Toro, J., & Rodrigo, R. (2009). Oxidative Stress: Basic Overview. In R. RODRIGO (Ed.), *oxidative stress and antioxidants: their role in human disease* (pp. 1-17). New York: Nova Science Publishers
- 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. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 70, 515—518.
- Watson, r. R., preedy, v. R., & zibadi, s. (2014). *Polyphenols in human health and disease* (Vol. 1): Elsevier Inc.
- Wei, L., Zhang, W., Yin, L., Yan, F., Xu, Y., & Chen, F. (2014). Extraction optimization of total triterpenoids from Jatropha curcasleaves using response surface methodology and evaluations of their antimicrobial and antioxidant capacities. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1-7.

- Wen-Li, M., Feng, L., Wen-Jian, Z., Hui, W., & Hao-Fu, D. (2012). Cucurbitacins from fruits of *Aquilaria sinensis*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *10*(3), 234-237.
- Williams, C. (2013). *Medicinal Plants in Australia : An Antipodean Apothecary* (Vol. 4): Rosenberg Publishing
- Xu, R., Ye, Y., & Zhao, W. (2011). *Introduction to Natural Products Chemistry*: CRC press.
- Yesilada, E., Tanaka, S., Sezik, E., & Tabata, M. (1988). Isolation of an Anti-inflammatory Principle from the Fruit Juice of *Ecballium elaterium*. *Journal of Natural Products*, *51*, 504-508
- Yuan, X., Wang, J., Yao, H., & Chen, F. (2005). Free radical-scavenging capacity and inhibitory activity on rat erythrocyte hemolysis of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber. *Science Direct*, *38* 877–883.
- Zellagui, A., Noamane, L. S., Gherraf, N., & Rhouati, S. (2012). Phytochemical screening of five Algerian plants and the assessment of the antibacterial activity of two *Euphorbia guyoniana* extracts. *Der Pharmacia Lettre*, *4*, 1438-1444.

Résumé

Pour certains, les plantes sont employées comme thérapie complémentaire aux médicaments conventionnelles. Mais dans beaucoup de sociétés en développement, la médecine traditionnelle est le seul système de soin disponible ou accessible. Dans ce travail, on test l'activité antioxydant et anti-inflammatoire de deux plantes Algérienne. L'activité antioxydant des 2 plantes est évaluée par 4 tests in-vitro, lors du test DPPH l'IC50 des fleurs d'*Ecballium elaterium* était 61,42 µg/ml. Pour *Hyoscyamus albus* la meilleur IC50 était 60,82 µg/ml pour les graines. Pour le test ABTS, le plus grand TEAC était 489,11 µmol Trolox/gr d'extrait pour les fleurs d'*Ecballium elaterium*. Pour *Hyoscyamus albus*, le TEAC le plus important était 111,4 µmol Trolox/gr d'extrait pour les graines. Pour le test du pouvoir réducteur, La plus grande capacité antioxydant totale est celle des fleurs *Ecballium elaterium* : 160,97. Pour *Hyoscyamus albus* le TAC le plus important est celui des fleurs : 178,6. Dans le teste AAPH, Les fleurs *Ecballium elaterium* ont donnés la plus grandes protection aux globules rouge humains, qui est de 32,96%, alors que pour *Hyoscyamus albus* la plus grande protection était celle des graines : 54,02%. Les graines *Ecballium elaterium* ont donné le meilleur effet stabilisateur de membrane des hématies contre l'hémolyse hypotonique avec 78,70%. Le meilleur effet stabilisateur pour *Hyoscyamus albus* est de 44,25% pour les graines. Dans le test de dénaturation thermique de l'Albumine humain, les fleurs *Ecballium elaterium* ont donné 58,09%, les graines *Hyoscyamus albus* ont donnés 63,33%.

Mots clés : *Ecballium elaterium*, *Hyoscyamus albus*, Cucurbitacines, Calystegines, antioxydant, Anti-inflammatoire.

Abstract

For some, the plants are employed as complementary therapy to the conventional drugs. But in many under development societies, traditional medicine is the only system of care available or accessible. In this work we test the antioxydant and anti-inflammatory activity of two Algerian plants. The antioxydant activity of the 2 plants is evaluated by 4 tests in-vitro, during DPPH test the IC50 of the flowers of Squirting cucumber was 61,42 µg/ml. For *Hyoscyamus albus* the best IC50 was 60,82 µg/ml for the seeds. For ABTS test; the largest TEAC was 489,11 µmol Trolox/gr of extract for the flowers of Squirting cucumber. For *Hyoscyamus albus*, the most important TEAC was 111,4 µmol Trolox/gr of extract for seeds. For the the power reducing test, the greatest total antioxydant capacity is that of the flowers of *Ecballium elaterium*: 160,97. For *Hyoscyamus albus* the most important TAC is that of the flowers: 178,6. In AAPH test, the *Ecballium elaterium* flowers gave the largest protection to the human red blood cells, which is of 32,96%, whereas for *Hyoscyamus albus* the greatest protection was that of seeds: 54,02%. The seeds *Ecballium elaterium* gave the best stabilizing effect of membrane of red blood cells against the hypotonic hémolysis with 78,70%. The best stabilizing effect for *Hyoscyamus albus* is of 44,25% for seeds. In thermal denaturation of human Albumin tests, the *Ecballium elaterium* flowers gave 58,09%, the seeds *Hyoscyamus albus* gave 63,33%.

Key words: *Ecballium elaterium*, *Hyoscyamus albus*, Cucurbitacins, Calystegines, antioxidant, Anti-inflammatory.

ملخص

بالنسبة للبعض، تستعمل النباتات كعلاج تكميلي للعقاقير التقليدية. ولكن في كثير من المجتمعات النامية، الطب التقليدي هو النظام الوحيد من الرعاية المتوفرة. في هذا العمل نختبر النشاط المضاد للأوكسدة والنشاط المضادة للالتهابات لنبتتين من الجزائر. تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة للنباتات بـ 4 اختبارات في المختبر. أثناء اختبار DPPH كان IC50 من زهور القثاء البري 61,42 ميكروغرام / مل. بالنسبة لـ السكران الأبيض كان أفضل IC50 60,82 ميكروغرام / مل للبذور. اختبار ABTS، كان أكبر TEAC 489,11 ميكرو مول Trolox / غرام من مستخرج زهور القثاء البري. السكران الأبيض، كان أهم TEAC 111,4 ميكرو مول Trolox / غرام من مستخرج البذور. لاختبار قوة الإرجاع، أكبر إجمالي القدرة المضادة للأوكسدة هي من زهور القثاء البري 160,97. ، 97 السكران الأبيض أكبر إجمالي القدرة المضادة للأوكسدة هي للزهور: 178,6. في اختبار AAPH، أعطت زهور القثاء البري أكبر حماية لخلايا الدم الحمراء البشرية، وهو 32,96٪، في حين أن السكران الأبيض كانت أكبر قدر من الحماية من البذور: 54,02٪. أعطى بذور القثاء البري أفضل أثر في تحقيق الاستقرار في غشاء خلايا الدم الحمراء ضد انحلال الدم ناقص التوتر بـ 78,70٪. أفضل أثر في تحقيق الاستقرار السكران الأبيض هو 44,25٪ للبذور. في تمسخ الحراري للاختبارات زلال الإنسان، أعطى زهور القثاء البري 58,09٪، بذور السكران الأبيض أعطت 63,33٪.

الكلمات الرئيسية: القثاء البري، السكران الأبيض، الكاليستيجينات، كيكيربيتاسين، مضاد الأوكسدة، مضاد للالتهابات.