

MAST-Bio-259 / 02



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abou Bekr Belkaid -Tlemcen-
Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de
l'univers



Département de Biologie



« Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activité
Biologique »

Mémoire de master en biologie

Option : Biochimie

**Contribution à l'étude de l'activité antiradicalaire
de quelques extraits de fruit de *Citrullus colocynthis*
sur le radical libre DPPH**

Présenté par : M^{lle} BERREKAMA Kamila Myriam

Devant le jury :



M ^r DJAZIRI R	Maitre de conférences	Président	Université de Tlemcen
M ^r AZZI R	Maitre assistant	Examineur	Université de Tlemcen
M ^{lle} BENARIBA N.	Chargé de cours	Promotrice	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2011-2012

INSCRIT Sous le No. 6452
Date le 2012
Cote

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen-
Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de
l'univers



Département de Biologie



*« Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et Activité
Biologique »*

Mémoire de master en biologie

Option : Biochimie

**Contribution à l'étude de l'activité antiradicalaire
de quelques extraits de fruit de *Citrullus colocynthis*
sur le radical libre DPPH**

Présenté par : M^{elle} BERREKAMA Kamila Myriam

Devant le jury :

M ^r DJAZIRI R	Maitre de conférences	Président	Université de Tlemcen
M ^r AZZI R	Maitre assistant	Examineur	Université de Tlemcen
M ^{elle} BENARIBA N.	Chargé de cours	Promotrice	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2011-2012



Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu d'avoir donné à l'homme le pouvoir de raisonner, d'exploiter et d'expliquer les vérités de l'univers.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance et gratitude à **Melle Benariba N**, maitre assistante chargée de cours au Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, d'avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils et ses encouragements qui m'ont permis de mener à bon terme ce travail.

Je tiens à remercier **Mr Djaziri R**, maitre de conférences au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury.

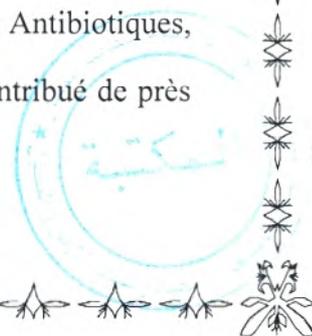
J'adresse aussi mes remerciements à **Mr Azzi R**, maitre assistant au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, qui m'a fait l'honneur d'examiner ce travail.

Mes profonds remerciements vont à **Melle Belkacem N**, maitre assistante, au Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen, pour ses précieux conseils, sa patience et sa disponibilité pour l'aboutissement de ce travail.

Mes remerciements s'adressent à **Mm Boucherit Z**, maitre de conférences au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen, et directrice de Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimiques, Synthèse et activité biologique, pour son accueil au laboratoire, sa disponibilité et son aide.

Je tiens à remercier tous les enseignants du Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen, qui ont veillé sur notre formation.

Je remercie toutes personnes ainsi que les membres du Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimiques, Synthèse et activité biologique, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Résumé

L'objectif de ce travail est porté sur une étude phytochimique de différents extraits préparés à partir du fruit entier de *Citrullus colocynthis* : extrait aqueux, eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol, ainsi que l'évaluation de l'activité antiradicalaire de ces extraits sur le DPPH.

Le dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux dans ces extraits nous a permis de constater que l'extrait aqueux et l'extrait eau méthanol présentent le taux le plus élevé en polyphénol, 235.66 µg.Eq acide gallique/100 g de matière végétale et 232.83 µg.Eq acide gallique/100 g de matière végétale respectivement. Alors que les extraits n-butanol et acétate d'éthyle, présentent le taux le plus élevé en flavonoïde 142.750 µg.Eq catéchine/100 g de matière végétale, 74.97 mg.Eq catéchine/100 g de matière végétale.

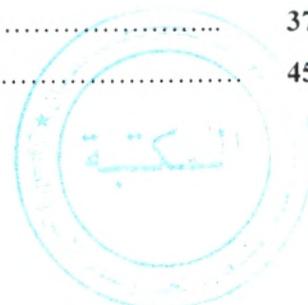
Concernant l'activité antiradicalaire des différents extraits préparés à la concentration 30 mg/ml, réduisent respectivement 80.39%, 83.16%, 97.78% et 92.78% du DPPH après 30 min d'incubation, ces valeurs sont comparées avec ceux de l'acide ascorbique qui à une concentration de 0.3 mg/ml peut réduire 91.76% du DPPH.

Cette activité antiradicalaire est fortement liée à la richesse de la coloquinte en polyphénols et en flavonoïdes. De même cette activité confère aux extraits de la coloquinte une activité antioxydante intéressante qui peut être exploitée contre le stress oxydatif.

Mots clés : *Citrullus colocynthis* - polyphénols – activité antiradicalaire – DPPH

Sommaire

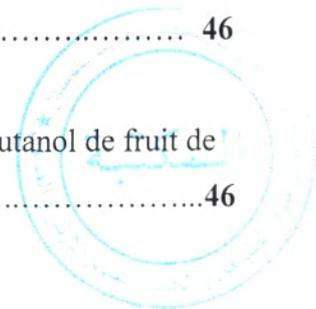
Introduction.....	1
Matériels et méthodes	
1 - Extraction.....	18
1-1 Matériel végétal.....	18
1-2 Dégraissage du matériel végétal.....	18
1-3 Préparation de l'extrait aqueux.....	19
1-4 Préparation de l'extrait eau-méthanol.....	19
1-5 Préparation de l'extrait acétate d'éthyle.....	20
1-5 Préparation de l'extrait n-butanol.....	21
2- Tests phytochimiques.....	23
3- Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux.....	25
3-1 Préparation des extraits pour le dosage.....	24
3-2 Dosage de polyphénols totaux.....	24
3-3 Dosage de flavonoïdes totaux.....	27
4- Chromatographie sur couche mince.....	28
4-1 Principe de la méthode.....	28
4-2 Mode opératoire.....	28
4-2-1 Préparation des extraits.....	27
4-2-2 Choix de la phase mobile.....	29
4-3 Révélation	29
5- Le pouvoir réducteur de <i>Citrullus colocynthis</i>	30
5-1 Principe de la méthode.....	30
5-2 Mode opératoire.....	30
5-3 Expression des résultats.....	31
3-1 Pourcentage de réduction du DPPH.....	31
3-2 Détermination IC50.....	32
3-3 Détermination l'activité antiradicalaire.....	32
Résultats et interprétation	
1-Extractions.....	33
2- Les tests phytochimiques.....	34
3- Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux.....	35
4- chromatographie sur couche mince.....	37
4- Le pouvoir réducteur de <i>Citrullus colocynthis</i>	45



Discussion.....	49
Conclusion.....	56
Références bibliographiques.....	57

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires....	11
Tableau n°2: Effet anti radicalaire contre le DPPH de quelque plantes médicinale	14
Tableau n°3: Pourcentages de réduction du DPPH par certains extraits de la coloquinte	16
Tableau n°4: Pourcentages de réduction du DPPH par les extraits de la coloquinte.....	17
Tableau n°5 : Dosage de polyphénols de fruit de la coloquinte (<i>Citrullus colocynthis</i>).....	26
Tableau n°6: Dosage des flavonoïdes de fruit de la coloquinte (<i>Citrullus colocynthis</i>).....	27
Tableau n°7: Mode opératoire pour déterminé l'activité antiradicalaire	31
Tableau n° 8: Quelques caractéristiques des extraits préparés de fruit de la coloquinte (<i>Citrullus colocynthis</i>).....	33
Tableau n° 9: Résultats des tests phytochimiques d'extraits de fruit de la coloquinte.....	34
Tableau n°10: Résultats du dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de fruit de <i>Citrullus colocynthis</i>	37
Tableau n°11: Résultats de quelques analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fruit de la coloquinte à 254 nm.....	38
Tableau n° 12 : Pourcentages de réduction du DPPH par la vitamine C après 30 min d'incubation	45
Tableau n°13: Pourcentages de réduction du DPPH par les extraits aqueux, eau- méthanol, acétate d'éthyle, n-butanol de fruit de la coloquinte.....	46
Tableau n°14: IC50 des extraits aqueux, eau- méthanol, acétate d'éthyle, n-butanol de fruit de la coloquinte et de la vitamine C.....	46



Liste des figures

Figure n°1 : Fruit de <i>Citrullus colocynthis</i>	18
Figure n° 2 : Montage du dégraissage des fruits de <i>Citrullus colocynthis</i>	18
Figure n° 3: Montage pour extraction sous reflux à chaud.....	19
Figure n°4 : Montage de rotavapor.....	20
Figure n°5 : Montage d'extraction liquide- liquide.....	20
Figure n° 6 : Montage de la distillation.....	21
Figure n°7 : Schéma explicatif pour préparation des extraits organiques à partir du fruit de la coloquinte.....	22
Figure n° 8: Forme libre et réduite du DPPH.....	30
Figure n°9 : courbe d'étalon de l'acide gallique.....	36
Figure n°10 courbe d'étalon de la catéchine.....	36
Figure n°11: Séparation des extraits de la coloquinte sur CCM.....	43
Figure n°12 : l'activité antiradicalaire d'acide ascorbique.....	47
Figure n°13: l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux	47
Figure n°14 : l'activité antiradicalaire l'extrait eau-méthanol.....	47
Figure n°15 : Activité antiradicalaire l'extrait acétate d'éthyle	47
Figure n°16: l'activité antiradicalaire l'extrait n-butanol.....	47

Liste des abréviations

µg/ml : microgramme/millilitre.

Acétyl-CoA : Acétyl-coenzyme A.

ADN : **acide désoxyribonucléique.**

AE : Extrait acétate d'éthyle

AMP_C : adénosine monophosphate cyclique.

AQ : Extrait aqueux

ATP ase Na⁺/K⁺ : adénosine triphosphatase- Sodium-Potassium ou pompe sodium/potassium.

ATP : Adénosine Tri-Phosphate.

CAT : Catalase

CCM : chromatographie sur couche mince.

CHCl₃ : chloroforme.

CPG : chromatographie en phase gazeuse

DA : Dalton

DNID : Diabète Non Insulino- Dépendant.

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EM : Extrait eau-méthanol

Eq : équivalent.

EtOAc : acétate d'éthyle

FPP : FarnésylDiphosphate.

g/Kg : gramme/Kilogramme.

g/l : gramme/litre

GGPP : GéranylGéranyldiphosphate

GPP : GéranylDiphosphate

GPx : Glutation peroxydase

HDL : High Density Lipoproteins.

HPLC : chromatographie en phase liquide a haute performance.

IP : Intra Péritonéal.

IPP : Isoprényle pyrophosphate

LDL : Low density lipoprotein

MeOH : méthanol.

MEP : Méthylérythritole-phosphate

MEP : méthylérythritole-phosphate.

mg/g : milligramme/gramme.

mg/ml : milligramme/millilitre.

min : minute.

mM : millimole.

NADPH oxydase: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

n-B : Extrait n-butanol

OMS : Organisation mondiale de la santé.

R_f : Le rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire.

ROS : Reactif oxygène species.

SM : spectrométrie de masse

SOD: Superoxide dismutase

UV : ultraviolet.

Introduction

Par définition les plantes médicinales sont des végétaux connus pour leurs pouvoirs bénéfiques. En d'autres termes, les plantes médicinales sont utilisées pour prévenir, soigner ou soulager diverses maladies [Konsole, 2009]. Selon OMS plus de 80% de la population mondiale ont recouru à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de santé [OMS, 2000]. L'échec des traitements pharmaceutiques conventionnels surtout dans le cas des maladies chroniques (hypertension, cancer, diabète.....) [Iserin et al, 2001] et la forte incidence des effets secondaires des médicaments de synthèse, qui selon l'OMS sont la cause de 60% des maladies actuelles ainsi que l'inaccessibilité des soins modernes, font qu'une large tranche de la population mondiale dépendent de la médecine naturelle pour se soigner [Eddouks et al, 2007].

L'art de l'utilisation des plantes est la phytothérapie, c'est-à-dire la consommation ou l'utilisation par voie externe de produits préparés à partir de plantes sans passer par une étape de sélection des molécules ; donc on ne consomme pas que le principe actif mais tout ce que contient la plante [Bruneton, 1999]. Les différents types de la phytothérapie sont : l'aromathérapie, c'est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes ou les huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau. La gemmothérapie, se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les racines. L'herboristerie, correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne, elle se sert de la plante fraîche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, ou une partie (écorce, fruits, fleurs), la préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion ou macération. L'homéopathie, a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale. La phytothérapie pharmaceutique, utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans l'alcool éthylique ou un autre solvant, ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide, ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... [Zeghad, 2009].

En outre les plantes ont les particularités de présenter un important métabolisme secondaire. Ils synthétisent un grand nombre de substances chimiques appelés métabolites secondaires qui trouvent leur origine dans les produits du métabolisme primaire [Krief, 2003]. Ces métabolites secondaires qui sont être définis comme des molécules indirectement

essentielles à la survie des plantes [Sylvain Soutour 2011], par opposition aux métabolites primaires (lipides, protéines, et glucides) qui entrent dans le fonctionnement vital de la cellule, et qui alimentent les grandes voies du métabolisme central [Hadj Salem, 2009]. Les métabolites secondaires sont des phytoalexines c'est-à-dire des molécules biologiquement actives impliquées dans la défense contre les insectes, les herbivores, et les radiations UV, comme ils ont aussi un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement [Khenaka, 2011].

Actuellement plus de 100000 métabolites secondaires ont été identifiés, ils appartiennent à trois classes principales qui sont les terpènes (un groupe de lipides), les composés phénoliques (dérivés de glucides), et les alcaloïdes (dérivés d'acides aminées) [Ben Amor, 2008].

Les composés phénoliques sont appelés aussi des polyphénols, constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal, sont des molécules aromatiques, qui forment l'une des principales classes de métabolites secondaires [Bors et al 1990]. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales où ils peuvent être localisés dans divers organes (racines, tiges ...), 80% sont essentiellement localisés dans les tissus épidermiques de la plante. Ce sont des phytoconstituants, généralement des pigments, responsables des teintes automnales des feuilles, des fleurs et des fruits (jaune, orange, rouge...). Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogenèse [Akroum, 2006]. De nos jours plus de 8000 structures ont été identifiées [Urquiaga et al, 2000], ils sont caractérisés dans leur structure par la présence d'un noyau aromatique portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes suivant la complexité du squelette de base (noyau C6), le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation), et enfin suivant les molécules auxquelles ils sont associés (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires) [Bénard 2009]. Ce pendant on peut les regrouper en trois grandes classes de la masse moléculaire la plus faible à la plus élevée les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins [Bravo L. 1998].

Les composés aromatiques naturels sont issus de deux grandes voies de la biosynthèse, la voie la plus courante est appelée : voie shikimate, cette voie débute par la condensation du phosphoénolpyruvate qui provient de la glycolyse avec l'erythrose-4-phosphate, qui est produit par la voie des pentoses phosphates au cours d'une succession de réactions, le glucide

qui en résulte à 7 atomes de carbones, subit une cyclisation puis une réduction qui forme du shikimate d'où la dénomination de la voie, puis par désamination de trois acides aminés essentiels : tryptophane, phénylalanine et tyrosine de ces derniers, il en résulte les acides cinnamiques et leurs dérivés [Buchanan et al 2000]. L'autre voie, part de l'acétate et conduit à des poly- β -cétoester, des polycétates qui engendrent par cyclisation des composés polycycliques : chromanes, isocoumarines, xanthones, quinone... [Martin et al, 2002].

En effet les polyphénols ont des propriétés bénéfiques pour la santé comme prévention et le traitement de certains cancers [Terra et al, 2007], traitements des maladies inflammatoires [Yang et al, 2008], cardiovasculaires [Cazorolli et al, 2008], neurodégénératives [Bonfili et al, 2008], certains d'entre eux sont utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [Burta et al, 2008]. Parmi les formes les plus simples des phénols on distingue : les phénols simple, l'acide α -hydroxy benzoïque, l'acide hydroxycinnamique dont l'acide caféïque et l'acide férulique limiteraient le cancer des poumons chez les souris tandis que l'acides gallique empêcherait le cancer œsophagien chez les rats [Hale, 2003].

La plus grande catégorie des composés phénoliques est celle des flavonoïdes, au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux [Akroum, 2006]. Où ils interviennent comme agent de protection contre des organismes pathogènes [Chebil, 2006], On les trouve d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, localisés dans divers organes: racine, tige, feuilles, fleurs, et fruits [Nkhili, 2009]. Actuellement plus de 6400 flavonoïdes ont été identifiés [Harborne, 2000], ils possèdent tous une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane, selon les détails structuraux les flavonoïdes pouvant être regroupés en plus de 6 classes induisant une nomenclature complexe [Macheix et al, 2005] : flavones, flavonols, flavonones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les biflavonoïdes, les flavanediols, les chalcones, les aures, et les anthocyanes [Akroum, 2011]. Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme hétéroside, c'est à- dire liée à des oses et autres substances [Heller et Forkmann 1993].

Les flavonoïdes ont des propriétés physico-chimiques et biologiques diverses en l'occurrence la solubilité, l'absorption de lumière UV et visible [Chebil, 2006], ainsi que la coloration des plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange [Gravot, 2009]. Ils affectent également la santé humaine et animale en raison de leur rôle d'inhibiteurs enzymatiques sur l'histidine décarboxylase, l'élastase, et hyaluronidase ce qui permettrait de conserver

l'intégrité de la substance fondamentale ; ils inhibent aussi d'une manière non spécifique la catéchol-o-méthyltransferase, ce qui augmenterait la quantité de la catécholamine disponible et donc provoquerait une élévation de la résistance vasculaire. En plus, les flavonoïdes inhibent la phosphodiésterase qui pourrait expliquer leur activité anti-agrégante plaquettaire ; aussi, ils inhibent l'aldose réductase qui est impliquée dans la pathogénie du cataracte [Bruneton, 1999]. De plus les flavonoïdes sont également très intéressants du point de vue médical car ils sont associés à de nombreuses activités biologiques, anti-inflammatoire, antihépatotoxique, antitumorale, antihypertensive, antithrombique, antibactérienne, antivirale, antiallergique, antioxydantes [Diabate, 2006]. Un apport élevé en flavonoïdes peut diminuer la mortalité de maladie coronarienne et réduit les risques de cette maladie de 38% chez les femmes ménopausées. Les flavonoïdes peuvent présenter un effet antiprolifératif sur plusieurs variétés de cellules néoplasiques humaines tel que la leucémie lymphoïde et myéloïde, les cellules cancéreuses ovariennes et gastriques [Bruneton, 1999]. Les isoflavones sont spécifiques des fabacées, leur structure mime les stéroïdes d'où leur emploi dans le traitement de la ménopause [Guignard, 2005].

Pour ce qui est des tanins, des polyphénols naturels d'origine, connus par leur capacité à précipiter les alcaloïdes et les protéines ; sont solubles dans l'eau (polaires) et insolubles dans les solvants organiques (apolaires), avec un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da [Bouhadjera, 2005]. Ces métabolites secondaires, très répandus dans le règne végétal, sont présent dans le bois, l'écorce, les feuilles et les fruits des plantes supérieures [Khenaka, 2011], et dans une variété de nourriture qui comprend les céréales, orge, abricot secs, fèves, pois, bananes, dates, raisins, pêches, prunes, framboises et boisson comme le thé [Gravot, 2009].

Les tanins peuvent, selon leurs caractéristiques structurales, être divisés en deux catégories ; les tanins hydrolysables constitués par une molécule de sucre, glucose le plus souvent, estérifiés par l'acide gallique ou un de ses dérivés (acide éllagique ou valonique), ils sont facilement hydrolysable par voie chimique ou enzymatique [Sarni-Manchado *et al*, 2006] ; et les tanins condensés sont appelés aussi catéchiques, proanthocyanides, se sont des produits de la polymérisation de flavones et ne sont hydrolysables que dans les conditions fortement acides à cause de leur degré de polymérisation [Garcia-Gonzalez *et al*, 2008].

Les tanins ont la particularité de piéger les radicaux libres, ils limitent le stress oxydatif [Bergoin, 2005], leur capacité antioxydante due à leur noyau phénol. Ils sont caractérisés par l'inhibition de la peroxydation des LDL [Bodaset *al*, 2008], à ces propriétés s'ajoutent d'autres activités antitumorale, antimutagène, antivirale ou encore anti-inflammatoire [Buddleet *al*, 2010], de plus les tanins peuvent également réduire la pression artérielle, diminuer l'hypertriglycéridémie et moduler les immunoréponse et la nécrose. Plusieurs rapports suggèrent que la consommation du thé réduit la carie dentaire chez les êtres humains à cause de sa haute teneur en tanins [Kandra *et al*, 2004]. Les tanins peuvent chimiquement contribuer à la défense ainsi que la diminution des dommages aux plantes causés par, les insectes, les mammifères, herbivores, en particulier pour les plantes qui se développent dans les zones difficiles. Par leurs propriétés astringentes, les tanins provoquant une sensation de sécheresse au niveau de la muqueuse buccale, cette action provient d'une dénaturation de glycoprotéines de sécrétions salivaires, et d'une hyposalorrhée liée à une réponse des glandes salivaires [Kandra *et al*, 2004]. Ce phénomène d'astringence induit une réponse des glandes salivaires qui synthétisent d'avantages de protéines salivaires riches en proline, constituant un important système de défense contre la toxicité des tanins [Ozawa *et al*, 1987]. La réduction de la digestibilité des aliments, s'expliquerait par l'action des tanins sur les enzymes, soit en réduisant leur solubilité par la formation de complexe : tanin-protéines enzymatiques, soit par inhibition de leur activité par blocage de leur site actif [Salunkh *et al*, 1982].

Une autre classe des polyphénols, les coumarines tirent leur nom de « coumarou » qui est le nom vernaculaire de fève tinka d'où fut isolée en 1820 la coumarine; en 1996 au moins 1300 coumarines ont été identifiées [Bouhadjera, 2005]. Les coumarines sont des dérivés de benzo- α -pyrane, que l'on peut considérer en première approximation, comme étant des lactones de l'acide 2-hydroxy-Z-cinnamique, elles sont les plus répandues dans le règne végétal, et possèdent des substitutions en C₇ par un hydroxyle, qui peut être méthylées [Bruneton, 1999].

En général les coumarines sont classées en quatre catégories comme suit : les coumarines simples, dont l'élément structural subi soit une hydroxylation, une alkoxylation ou une alkylation. Les furano-coumarines, les éléments de cette famille consiste un hétérocycle pentagonale qui est le furane attaché au noyau coumarinique ; les pyrano-coumarines, les composés de ce groupe sont analogues à ceux de groupe précédent (les furano-coumarines),

seulement les substances de cette catégorie consiste un hétérocycle hexagonale qui est le pyrane attaché au noyau coumarinique ; et enfin les coumarines substituées dans le noyau de pyrane [Moudir, 2004].

Certaines familles d'angiospermes, élaborent des structures très variées, fabacée, astéracée, surtout apiacée et rutacée chez les quels sont rencontrées les molécules les plus complexes [Gravot, 2009]. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools, et dans les solvants organiques alors que les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Ces molécules ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants, profondément modifié en milieu alcalin [Bruneton, 1999]. De plus, les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, ils ont une activité, anti-inflammatoire et antivirale. Vue leur toxicité très élevée, l'étude sur les animaux ne peuvent être extrapolées sur les êtres humains, ce qui a limité l'intérêt pharmacologique des drogues à coumarines [Igor, 2002].

En ce qui concerne les terpènes, ils appartiennent à la grande famille des isoprénoïdes. Les plantes synthétisent plus de 22000 dérivés isopréniques qui possèdent des structures, sont généralement lipophiles, issues dès la condensation de 5 atomes de carbones de types isoprène [Wink, 2003]. Une classification des terpènes a été établie selon le nombre d'unité n pentacarbonés C₅ isopréniquesont peu distinguer ; pour n = 2 : les monoterpènes (C₁₀), n = 3 : les sesquiterpènes (C₁₅), n = 4 : les diterpènes (C₂₀), n = 5 : les sesterpènes (C₂₅), n = 6 : les triterpènes (C₃₀), et pour n = 8 : les tétraterpènes (C₄₀) et les polyterpènes. [Soldermann, 2002].

Les polyterpènes, qui les constituent à la fois des molécules de faible poids moléculaire, et volatiles, sont les composants principaux des huiles essentielles et des molécules hautement polymérisées comme le caoutchouc [Gravot, 2009]. Il existe deux voies de biosynthèse conduisant à ces unités de base isoprènes : la première voie est celle du mévalonate, elle débute par la condensation de trois unités Acétyl-COA, passe par un composé en C₆ (le mévalonate) et débouche sur l'IPP (isoprényle pyrophosphate) [Gravot, 2009]. La seconde voie est celle du méthylérythritole-phosphate (MEP) nommée voie indépendante du mévalonate, qui est spécifique des végétaux et se déroule dans les plastes, elle débute par la condensation d'une unité pyruvate avec le glycéraldéhyde -3-phosphate et conduit au MEP, qui est un composé intermédiaire à cinq atomes de carbones, puis plusieurs étapes vont conduire à la synthèse de l'IPP [Belloum, 2007].

Les monoterpènes, constituent la plus simple classe de la série des terpènes, ils sont issus du couplage de deux unités isopréniques, sont des molécules à 10 atomes de carbone dérivant du GPP (GéranylDiphosphate) ils existent sous la forme d'hydrocarbures simple, d'aldéhydes, d'alcools, et d'acides. Ce sont des composés aromatiques qui constituent, les essences florales, les huiles essentielles et les résines [Kaufman et al, 1999]. Les sesquiterpènes sont des molécules à 15 atomes de carbones constituées de trois unités isopréniques et dérivant du FPP (FarnésylDiphosphate). Les propriétés sensorielles de ces molécules leur confèrent un grand intérêt commercial dans les industries agroalimentaires et cosmétologiques puisqu'elles composent les arômes et les parfums. Parmi les diterpènes qui sont des molécules à 20 atomes de carbones, synthétisées à partir du GGPP (GéranylGéranylDiphosphate), on trouve la queue phytol des chlorophylles A et B et des résidus tocophyrole (vit k), ils présentent des activités anti hypertensives, anti-inflammatoires, antitumorales ; ils sont utilisés dans la chimiothérapie des cancers de l'utérus, du sein et de certains cancer du poumon, ils inhibent la dépolymérisation du tubuline au cours de la division cellulaire [Oswald, 2006].

Concernant les glycosides ou les hétérosides, sont des substances organiques complexes qui résultent de la combinaison avec l'élimination d'eau de l'hydroxyle réducteur d'un ose avec une substance non glucidique : l'aglycone ou génine, ils constituent les principes actifs de plusieurs drogues végétales, l'origine biosynthétique de ces génines est très hétérogènes (composés phénoliques, monoterpènes, triterpènes..., quatre classes des hétérosides ont été identifiées, les hétérosides cyanogènes, les glucosinolates, les saponosides et les hétérosides cardiotoniques [Gravot, 2009].

Les saponosides ce sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, très répandus dans le règne végétal [Abdel-Aalet al, 1993]. Selon la nature de leurs génines, on distingue deux groupes de saponosides, stéroïdiques et triterpéniques. Lorsque la génine est substituée par une seule chaîne osidique, les saponosides sont dits monodesmosidiques et lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, on parle de saponosides bidesmosidiques. Les différents hydroxyles de ces molécules, que ce soit au niveau de la génine ou de la partie osidique, peuvent aussi être estérifiés par des acides organiques [Bruneton, 1999]. La structure chimique des génines stéroïdiques est similaire à celle de nombreuses hormones humaines. De nombreuses plantes qui en contiennent ont un effet sur l'activité hormonale, l'igname sauvage (*Dioscorea villosa*) contient des saponines stéroïdiques à partir desquelles, est synthétisée la pilule contraceptive [Iserin, 2001].

Cette classe des métabolites secondaires est de nature amphiphile possédant un ensemble de propriétés physico-chimiques qui nous facilitent leur caractérisation, éventuellement le pouvoir aphrogène. Ils se trouvent sous forme amorphe, solubles dans l'eau et les solvants organiques polaires, et pratiquement insolubles dans les solvants organiques apolaires, connus depuis très longtemps pour leur propriété tensioactive ou encore leur capacité hémolytique ; cette propriété lytique a conduit à la mise en place de test hémolytique permettant la détection de saponines dans les drogues ou les extraits de plantes. Le pouvoir hémolytique dépend de la nature de la génine et du nombre des unités osidiques, les saponosides monodesmosides sont généralement plus hémolytiques que les bidesmosides [Sparget *et al*, 2004].

Les saponosides possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-oedémateuses. Ils sont particulièrement toxiques pour les poissons et autres animaux aquatiques. Actuellement, certaines molécules isolées à partir des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle, possèdent des propriétés anti-bactérienne et antifongique. Les saponosides triterpéniques à structures très complexes, isolés des écorces de *Albizia julibrissin* sont de puissants anti-tumoraux [Zheng *et al*, 2006], certains saponosides comme oleifolioside A, et B, cyclocanthoside E et astragaloside II, isolés tous de *Astragalusoleifolius*, possèdent une activité contre la leishmaniose. Certaines plantes sont encore utilisées en dermocosmétique, l'extrait de *Centellaasiatica*, est aujourd'hui commercialisé sous le nom de madécassol pour les propriétés cicatrisantes des saponosides qu'il renferme [Ozipek *et al*, 2005].

Concernant les alcaloïdes ce sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Depuis l'identification du premier alcaloïde à savoir la morphine à partir de l'opium en 1806 [Harborne *et al*, 1995], plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes [Hesse, 2002]. Ce sont des composés relativement stables stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane [Dewick, 2001]. Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes [Bhat *et al*, 2005]. Les alcaloïdes sont principalement extraits des plantes fleurissantes, mais on les trouve également chez quelques animaux comme les fourmis, les grenouilles et les coccinelles [Mann, 1994].

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante, ils s'accumulent dans les tissus périphériques, assises externes des écorces, des racines, des feuilles ou des fruits [Mann, 1994]. Chez les végétaux, les alcaloïdes se trouvent se forme soluble, de sels, ou celle d'une combinaison avec les tanins [Gravot, 2009]. Plus de 600 alcaloïdes ont été analysés pour leur propriétés biologique ; ils peuvent exercer divers fonction, au niveau du système nerveux central, qu'ils soient dépresseurs (morphines, ou la scopolamine), ou bien stimulateurs (caféine, strychnine)[Robert et Wink,1999].Certains entre eux ont des propriétés anesthésiques (cocaïne), antifibrillantes (quinidine), antitumorales, antipaludiques (quinine), antimicrobiennes, antihypertensives... [Bhat et al, 2005 ; Bruneton, 1999].

Sur plus de 500 000 espèces végétales poussant sur terre, dont une moitié seulement est répertoriées. Parmi elles, 22 000 plantes médicinales, issues de la médecine traditionnelle du monde, recensées par l'OMS font l'objet de plusieurs études pharmacologiques. L'activité antioxydante semble être l'activité la plus étudiée. Pour le traitement de stress oxydatif qui surviendra lorsqu'il y aura un déséquilibre dans la balance prooxydants/antioxydants en faveur des ERO (espèces réactives de l'oxygène) [Halliwellet al, 2004]

Au cours de ce processus, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) libérées par l'organisme humain par des diverses attaques sont éliminées ou piégées ; les dommages causés sont réparés. Les molécules douées de telles propriétés sont les antioxydants dont le rôle dépasse de loin celui d'un simple piègeur ou de suppresseur de radicaux libres. Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe [Halliwellet al , 2004], il existe deux sources différentes de ces radicaux libres, sources endogènes : les réactions enzymatiques, dont plusieurs d'entre elles sont considérées comme source principale des ROS ex ; NADPH oxydase, lipoxygénase, xanthine oxydase (enzyme du foie), et la sources exogènes : les ROS sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, la consommation d'alcool ou de médicaments (leurs structures peuvent jouer le rôle d'accepteur et donneurs d'électron), l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense et prolongé et le tabagisme ; ainsi que les facteurs interagissant lors des inflammations. Toutes ces situations provoquent une surproduction des ROS dans l'organisme. Ces espèces constituent l'ensemble des dérivés des radicaux de l'oxygène. Il existe plusieurs formes de ces espèces dont les plus importantes sont les suivantes: l'anion superoxyde (O_2^-); le radical hydroxyle OH^{\cdot} ;

L'oxygène singulet O_2^- et le radical peroxy ROO^\cdot [Madi, 2010]. Les molécules qui contrôlent la production des radicaux libres et protègent contre les effets toxiques de l'oxygène sont désignées par le terme antioxydants qui peuvent être des composés enzymatiques (la glutathion peroxydase), des vitamines (A, C, E), oligo-éléments (le sélénium) et des protéines (la ferritine) [Joël et al, 2002]. Du point de vue biologique, les antioxydants sont définis comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substances biologiques. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs [Mohammedi, 2006]. Ils agissent à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, en retardant ou en inhibant significativement l'oxydation de ce substrat [Abuja et al, 2001]. Un composé est considéré antioxydant *in vivo*, lorsqu'il requière les propriétés suivantes : il doit réagir avec les métabolites réactifs de l'oxygène qui sont biologiquement toxiques, le produit de la réaction de l'antioxydant avec l'oxydant ne doit pas être plus toxique pour l'organisme que le métabolite éliminé, l'antioxydant potentiel doit être présent dans l'organisme en concentration suffisante, et à la demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant [Ursini, 1999 ; Durackova, 2008]. Les antioxydants peuvent jouer leur rôle à différents niveaux du processus oxydatif en neutralisant les radicaux initiateurs; liant les ions métalliques; neutralisant les radicaux peroxy; et en éliminant les biomolécules endommagées par oxydation, ainsi que d'autres types de réactions [Baskin, et al 1994]. Les systèmes antioxydants sont de deux types, soit des molécules qui captent rapidement les ROS (antioxydants proprement dits), soit des systèmes enzymatiques catalysant la conversion des molécules prooxydantes [Salvayre, et al, 2005]. Selon leurs structures variées, et la taille de leurs molécules antioxydantes, ils peuvent être classés en : composés à poids moléculaires élevé (H.M.W) comme les enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx, ...), ou bien les antioxydants non enzymatiques (transferrine, albumine), et en composés à faible poids moléculaire (L.M.W) incluant : la vitamine C, le glutathion, l'acide urique, et les antioxydants lipophiles comme la vitamine E et le coenzyme Q (Tableau n°1). Une autre catégorie d'antioxydants, ce sont les antioxydants naturels qui incluent les flavonoïdes (catéchine et quercétine) ou autres phénols (l'acide ferrulique) ou les composés polyphénoliques. Ils sont requis par l'organisme à travers l'alimentation comme constituants naturels des fruits et des végétaux en exerçant une activité antioxydante significative. En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ERO [Ursini, 1999].

Tableau n° 1: Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires.
[Boumaza, 2009]

Antioxydant	Activité antioxydante
Vitamine E	Prévention de, l'oxydation des LDL, l'athérosclérose et d'autres maladies cardiovasculaires.
Vitamine C	Recyclage de la vitamine E et le glutathion
Acide lipoïque	Inhibiteur de la glycooxydation, prévention de la lipodystrophie et la neuropathie mendiée par les ROS.
Acide urique	Puissant piègeur des radicaux: O_2° , $^\circ OH$, RO_2°
Sélénium	Nécessaire à l'activité de nombreuses séléno enzymes antioxydantes : GPx, TRX...
Co enzyme Q	Puissant piègeur des radicaux superoxyde, et inhibiteur de la peroxydation lipidique.
Glutathion	Capture des espèces radicalaires.
Zinc	Prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres, et maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes.
Bilirubine	Protection des acides gras libres et de l'albumine contre l'attaque radicalaire.
β -carotènes	Contrôlent efficacement la génération de radicaux libres notamment en captant l'oxygène singulet.

Les sources d'antioxydants sont, les médicaments, l'alimentation et les plantes, en source alimentaire, certaines substances ingérées sont utilisées par l'organisme comme antioxydants. Ce sont principalement : la vitamine C, la vitamine E, le sélénium et le β carotène. La vitamine C ou acide ascorbique un puissant réducteur, il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E, elle est présente dans les légumes, les choux, le poivron, et les agrumes [Colette, 2003]. La vitamine E ou tocophérol, prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes, elle est présente dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes [Ahamet, 2003]. Le sélénium, est l'oligo-élément le plus «à la mode» pour ses propriétés antioxydantes avérées, ses effets bénéfiques sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle, il neutralise les métaux toxiques (plomb,mercure), avec une action préventive sur certains types de cancers [Ahamet, 2003]. Le β -carotène,

outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet. Il est présent dans les légumes verts, les épinards, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, la papaye et d'autres fruits jaunes [Ahamet, 2003].

Les plantes médicinales constituant une autre source d'antioxydants d'origine végétales. L'activité antioxydante des flavonoïdes peut prendre plusieurs formes dans la régulation du stress oxydatif, vis-à-vis les effets délétères des radicaux libres. Ces composants peuvent intervenir en captant directement les radicaux libres, en inhibant les enzymes responsables de la génération des ROS, ou en captant les cations métalliques. Des études récentes ont montré que les flavonoïdes sont capables de piéger de nombreuses espèces oxydatives comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le radical peroxy (ROO^{\cdot}) ou encore l'oxygène singulet (1O_2) [Girotti-Chanu, 2006]. Leur intérêt comme antioxydants se manifeste également dans le domaine de la protection contre le stress photooxydant cutané induit par l'exposition aux rayons solaires. Cependant, les flavonoïdes peuvent avoir des effets prooxydants sur les protéines et sur la peroxydation des lipides, et l'ADN [Aouissa, 2002]. De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux, tels que le cuivre et fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres [Puppo 1992 ; Van Acker et al, 1995]. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL, décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de ROS, comme le peroxyde d'hydrogène [Laughton et al. 1989 ; Yen et al, 1997].

Concernent les tanins ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénols [Peronny, 2005]. Elles ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation [Perret, 2001]. Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples [Peronny, 2005]. De même, il a été démontré *in vitro* que les tanins sont plus actifs que les vitamines. Des études faites montrent que les procyanidines B1 et B3 sont des antioxydants pour l'acide linoléique, et ils ont une activité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique et l' α -tocophérol. Dans une autre étude faite sur la propriété du piégeage radicalaire, il a été remarqué que les procyanidines dimériques peuvent emprisonner 8 radicaux peroxydes alors que l'acide ascorbique emprisonne un seul radical, et l' α tocophérol emprisonne deux radicaux. Selon Bruneton, 1999, les tanins hydrolysables sont des piègeurs de radicaux libres et de l'ion superoxyde. Ils inhibent également l'autooxydation de l'acide ascorbique; et la peroxydation lipidique des

mitochondries du foie et des microsomes. Ces tanins sont de très forts capteurs des radicaux libres, ils sont donneurs de protons aux radicaux lipidiques produits lors de la peroxydation d'où la formation des radicaux tanniques plus stables [Aouissa, 2002].

De plus les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes.

Ces dernières années, de nombreuses recherches ont attiré l'attention sur le rôle des antioxydants présents dans les plantes et leur implication dans la prévention de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives ou encore certains types de cancer. Parmi les plantes à activité antioxydantes nous pouvons citer, *Ocimumgratissimum*, *Mangifera indica* L (Anacardiaceae), *Entada abyssinica* (Mimosaceae), *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae)..... [Soulet *et al*, 2001]

La méthode d'étude la plus utilisée dans ce domaine est l'activité antiradicalaire des extraits de plantes en utilisant fréquemment le test de réduction d'un radical libre le DPPH, le **tableau n° 2** résume l'activité antiradicalaire *in vitro* de quelque plantes médicinales

Tableau 2 : Effet anti radicalaire contre le DPPH de quelque plantes médicinales

Plantes	Partie utilisée	Extrait préparé	Effet antiradicalaire Sur la réduction du DPPH	Références
<i>Desmodium gangeticum</i> (Leguminaceae)	Aériennes	Hydro-alcoolique (v,v) [10 mg/ml]	IC ₅₀ = 2 mg/ml.	[Govindarajan et al, 2003]
<i>Ocimum gratissimum</i> (Labiatae)	Feuilles	Méthanolique 250 µg/ml	réduction de 85%	[Afolabi et al, 2007]
<i>Entada abyssinica</i> (Mimosaceae)	Ecorce	Hexanique	IC ₅₀ = 36 µg/ml	[Gerald et al, 2011]
<i>Lawsonia inermis</i> L. (Lythraceae)	Feuilles	Méthanolique 40 mg/ml	réduction de 68%	[Farrukh et al, 2006]
<i>Mangifera indica</i> L. (Anacardiaceae)	Feuilles	Méthanolique 40 mg/ml	réduction de 78%	[Farrukh et al, 2006]
<i>Punica granatum</i> L. (Punicaceae)	Ecorce	Méthanolique 40 mg/ml	réduction de 76%	[Farrukh et al, 2006]
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L. (Leguminosae)	Feuilles	Méthanolique 40 mg/ml	réduction de 57%	[Farrukh et al, 2006]
<i>Acorus calamus</i> (Araceae)	Feuilles racine	Méthanolique	IC ₅₀ = 20 µg/ml IC ₅₀ = 20.8 µg/ml	[Ashadevite et al, 2012]
<i>Conocarpus erectus</i> L. (Combretaceae)	Fruits	n-butanolique	IC ₅₀ = 4 µg/ml	[El-Sayed et al, 2012]

En Algérie, plusieurs études sont relancées dans le cadre de l'évaluation de l'activité biologique de quelques plantes médicinales de la région, dont l'activité antioxydante occupe une place primordiale. Parmi ces plantes *Zygophyllum cornutum* [Boumaza, 2009], *Ranunculus repens* L [Kebieche, 2009], *Nigella sativa* L [Meziti, 2009], *Thymus vulgaris*, *Rosmarinu officinalis* [Zeghad, 2009].

Citrullus colocynthis ou la coloquinte est largement employée en médecine traditionnelle par la population des diabétique, dont les graines sont couramment utilisées pour le traitement du diabète de type 2 dans les pays méditerranéens [Bruneton, 1996]. La coloquinte a été classée parmi les plantes antidiabétiques les plus étudiées dans les recherches scientifiques entre 1990 et 2000 au Maroc [Bnouham et al, 2006].

Citrullus colocynthis (L.), est une plante appartenant à la famille des cucurbitacées, elle possède plusieurs noms vernaculaires: Handal, Hdejj, Hantal en arabe et Tabarka, Tefersite en berbère ; coloquinte, Chicotin, en français ; Colocynth et bitter cucumber, bitter apple, bitter ground en anglais [Carter, 1997 ; Meradchiali, 1973 ; Sincich, 2002].

Citrullus colocynthis est une plante rampante ou migrante, annuelle ou vivace herbacée, à tiges angulaires, rude, ramifiés rugueuses. Les feuilles sont larges de 5 à 10cm de longueur, rugueuses et découpé en 3 à 7 lobes [Yaniv et al, 1999] ; les fleurs de couleur jaunes verdâtres monoïque à sexes, solitaire. Chaque plante produit 15 à 30 fruits sphériques appelés, gourdes, globuleux, d'un diamètre de 7 à 10cm de diamètre, de couleur verte, deviennent complètement jaunes à maturité. Les fruits sont remplis d'une pulpe spongieuse de couleur jaune orangé très amère à cause de son contenu riche en colocynthine et colocynthéine. Les graines sont ovoïdes et aplaties, comestible et petites (6 cm de longueur) lisse et brunâtre à maturation et possédant un gout amère [Ducke, 1983, Yaniv et al, 1999].

La coloquinte, originaire des sols arides, est très fréquente dans les régions tropicales humides ou modérément sèches, elle est peu présente dans les zones tempérées [Buneton, 1993]. Elle occupe une région très vaste qui s'étend du nord-africain à l'Inde, prolongeant même à l'extérieur de la zone endémique de la plante, et en Europe.

Des études phytochimiques des différentes parties de la coloquinte, racine, tige, graines et feuilles, par des méthodes d'analyse chimiques, a révélé la présence des différentes familles des métabolites secondaires ; les alcaloïdes, tous les organes de la plante, sont riche en alcaloïdes, deux alcaloïdes ; $C_{10}H_{15}NO_3$ et $C_{16}H_{24}NO_7$ sont présents dans tous les organes de la plante, alors qu'un troisième alcaloïde $C_{20}H_{32}NO$ est présent au niveau des graines, pulpes, feuilles et racines [Afifi et al, 1973]. Six flavonoïdes ont été isolés à partir des différentes organes de la coloquinte, dont trois au niveau de la feuille : 8-c-p-hydroxybenzoyl-iso-vitexine, 6-c-p-hydroxyl- vitexine et 8-c-p-hydroxybenzoyl-iso-vitexine-4-o-glucoside et trois autres au niveau du fruit : 3-méthoxy-iso-orientine, iso-orientine et iso-vitexine. [Delazar et al, 2006, Maatooq et al, 1997]. Les triterpènes tétracycliques ont été isolés à partir du fruit de la plante et sont 2-o- β -D- glucopyranos curcurbitacins I, J, K et L [Seger et al, 2005]. De nombreux glycosides ont été identifiés à partir des différentes parties de la coloquinte ; l' α -élatrine qui est présente dans les graines, les tiges, feuilles, respectivement de l'ordre de 0,18%, 0,17%, 0,15%. [Darwish et al, 1974]. Et un autre composés colocynthine ($C_{56}H_{34}O_{32}$) responsable de l'amertume de la pulpe [Duke, 2002], le β -cistostérol-D-glucoside qui est

reconnu essentiellement par son effet antidiabétique, alors que les curcubitacines A et B sont responsables de l'activité anticancéreuse et insectifuge. plus de 20 acides aminés, libres ou non protéiques ; dont le β -pyrasol-1-ylalanine ($C_6H_9O_2N_3$) acide aminé non conventionnel, présent en quantité importante ($\approx 7\%$), ces acides aminés stimulent *in vitro* la sécrétion de l'insuline dans les îlots de Langerhans, cet effet est contribué à l'effet synergique de quelques acides aminés notamment la leucine et l'isoleucine [Nmila et al, 2000].

Selon la bibliographie, la coloquinte a fait l'objet de plusieurs études scientifiques, comme le pouvoir antioxydant (free radical scavenging). Certaines études ont déterminé l'activité anti radicalaire des extraits de cette plante contre le DPPH. Le tableau ci-dessous résume ces travaux.

Tableau n°3: Pourcentages de réduction du DPPH par certains extraits de la coloquinte

Partie utilisée	Extrait préparé	Effet anti radicalaire contre le DPPH	Références
Feuilles	Ethanol 10 mg/ml	réduction de 82%	[Thirunavukkara su et al, 2010]
Fruits	N- butanol 0.1 mg/ml	réduction de 40%	[Saleh et al, 2007]
Fruits	Méthanol 2500 μ g /ml	réduction de 88%	[Kumar et al, 2008]
Fruits	Composés isolées : • Isoscoparin • Isovitexin • isoorientin 3'-O methyl ether	IC ₅₀ = 70 μ g/ml IC ₅₀ = 0.5 μ g /ml IC ₅₀ = 3 μ g /ml	[Delazar et al, 2006]
Tiges	Méthanol Acétate d'éthyle	IC ₅₀ = 505 μ g/ml IC ₅₀ = 215 μ g/ml	[Asghar et al 2011]

Dans le laboratoire Antibiotiques Antifongiques: Physico-chimie, synthèse, et Activités biologiques, les travaux réalisés par Djedidi et Sahi (2008) et Boutchiche(2011) ont révélé

que certains extraits de graines de la coloquinte à forte concentration présentent un effet antiradicalaire sur le DPPH (**tableau 04**).

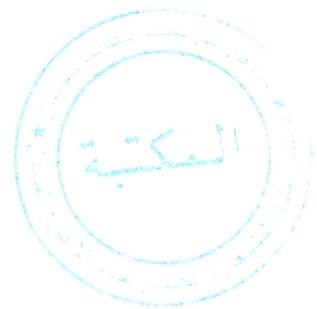
Tableau n° 4: Pourcentages de réduction du DPPH par les extraits de la coloquinte

Les extraits des graines	Concentrations des extraits (µg/ml)						
	75	250	500	750	1000	1500	2000
extrait aqueux	1.42	31.83	52.39	80.84	60.56	67.6	74.46
acétate d'éthyle	26.37	61.45	81.84	91.89	82.04	86.22	88.73
eau-méthanol	6.00	61.47	81.16	88.86	61.97	64.5	66.19

Suivant les résultats publiés des études antérieures concernant l'activité antioxydante de différents extraits de la coloquinte, nous envisageons au cours de cette étude tester l'activité antiradicalaire des extraits de fruit de la coloquinte : *Citrullus colocynthis* en utilisant un radical libre le DPPH. Au cours de ce travail, on réalise :

- Une préparation des extraits à partir du fruit de la coloquinte.
- Une analyse phytochimique des extraits préparés en vérifiant la présence ou l'absence de polyphénol, flavonoïde, saponoside, tanin, les sucres réducteurs....
- Un dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans chaque extrait.
- Une étude antiradicalaire, en testant l'effet des extraits de la coloquinte sur la réduction du radical libre le DPPH.

Matériels et méthodes



1- Extraction

1-1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de notre étude et le fruit entier de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*), récolté en mois de Novembre 2011 dans la région d'Ain Sefra wilaya de Naâma. Au laboratoire, les fruits sont séchés à l'air libre pendant quelques semaines.

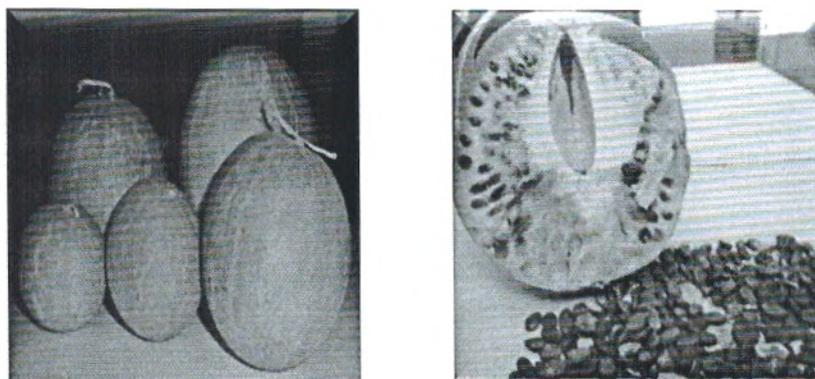


Figure n°1 : Fruit de *Citrullus colocynthis*

1-2 Dégraissage du matériel végétal :

Afin de déterminer le taux de lipides dans le fruit entier de la coloquinte nous avons procédé à un dégraissage du matériel végétal (fruits concassé) en utilisant le soxhlet pendant 3 heures en présence d'éther de pétrole (figure n° 2).

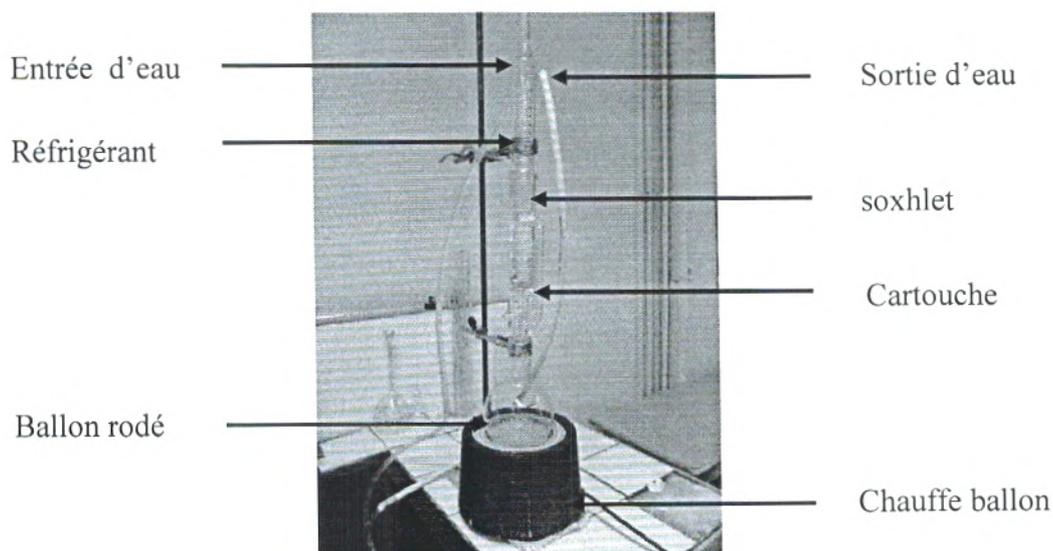


Figure n°2 : Montage de dispositif du dégraissage des fruits de *Citrullus colocynthis*.

1-3 Préparation de l'extrait aqueux (AQ)

Suivant le mode de préparation traditionnelle de l'extrait aqueux de la coloquinte, l'extrait aqueux est préparé comme suit :

- 30g de fruits entiers (épicarpe, graine, écorce) sont mises en infusion dans de l'eau distillée (300 mL) pendant 1 heure à 50°C ;
- L'ensemble est porté à ébullition sous reflux avec agitation pendant 15 min (**figure n° 3**);
- La solution obtenue est filtrée ;
- Evaporation à sec du filtrat;
- Récupération du produit

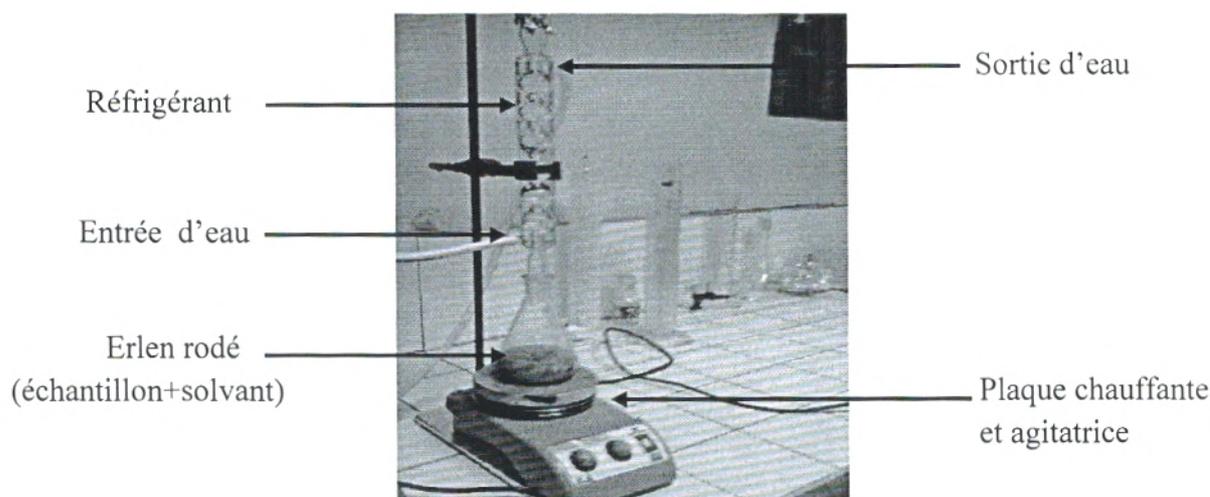


Figure n°3: Montage de dispositif pour extraction sous reflux à chaud.

1-4 Préparation de l'extrait eau-méthanol (EM)

- Extraction deux fois sous reflux et à chaud, pendant 3 heures, de 30 g de fruits entiers en présence de 200 ml de mélange eau / méthanol (20 / 80) (**figure n°3**);
- Filtration de la solution ;
- Evaporation à sec du filtrat par le rotavapor (**figure n°4**) ;
- Récupération du produit sur les parois du ballon d'évaporation.

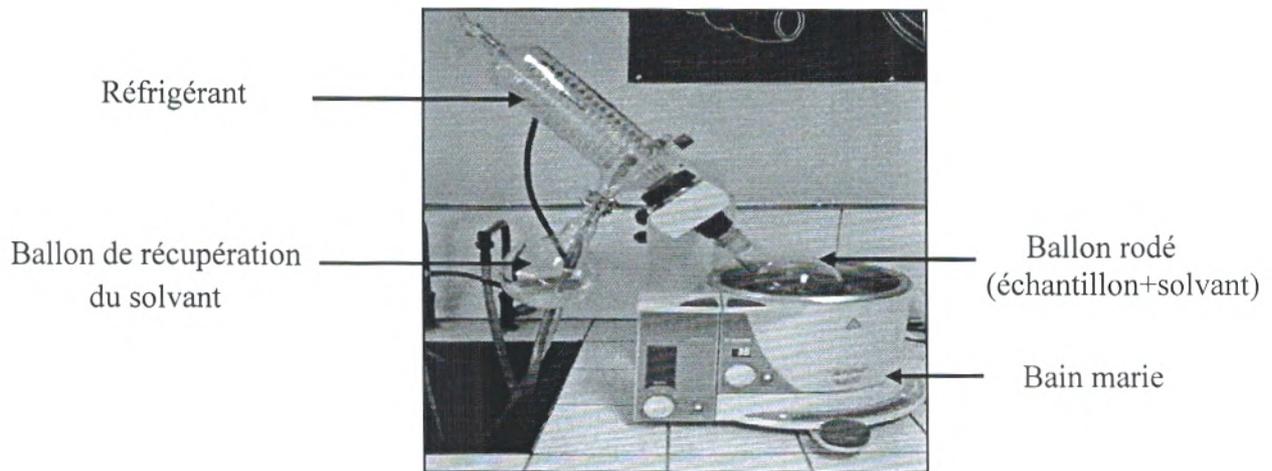


Figure n° 4 : Montage de dispositif de rotavapor.

1-5 Préparation de l'extrait acétate d'éthyle (AE)

Cet extrait est récupéré à partir de l'extrait eau-méthanol (EM) après extraction et concentration au rotavapor, c'est-à-dire on élimine le méthanol et on récupère la phase aqueuse, cette dernière est traitée par une extraction liquide-liquide en utilisant :

- ✓ Hexane (V/ V) pour éliminer le maximum de graisses restantes et des pigments (chlorophylle);
- ✓ Récupération de la phase aqueuse et extraction par acétate d'éthyle (V/ V) 2 fois (**figure n° 5**) ;
- ✓ Evaporation à sec de phases organique d'acétate d'éthyle à 70°C (**figure 4**) ;
- ✓ Le produit est récupéré sur les parois du ballon d'évaporation.

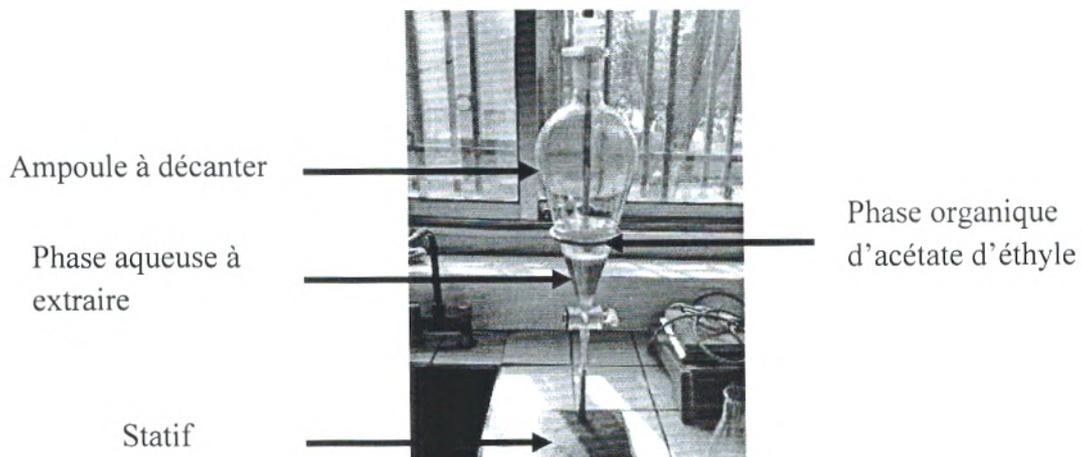


Figure n°5 : Montage de dispositif d'extraction liquide- liquide.

1-6 Préparation de l'extrait n-butanol (n-B)

La préparation de cet extrait se fait de la même manière que celle de l'extrait acétate d'éthyle seulement, après traitement par l'acétate d'éthyle, la phase aqueuse récupérée sera traitée avec le n-butanol (extraction 2 fois V/ V), suivie par une distillation (**figure n° 6**) ; Le produit est récupéré sous forme de culot après centrifugation à 3000 tr pendant 10 min.

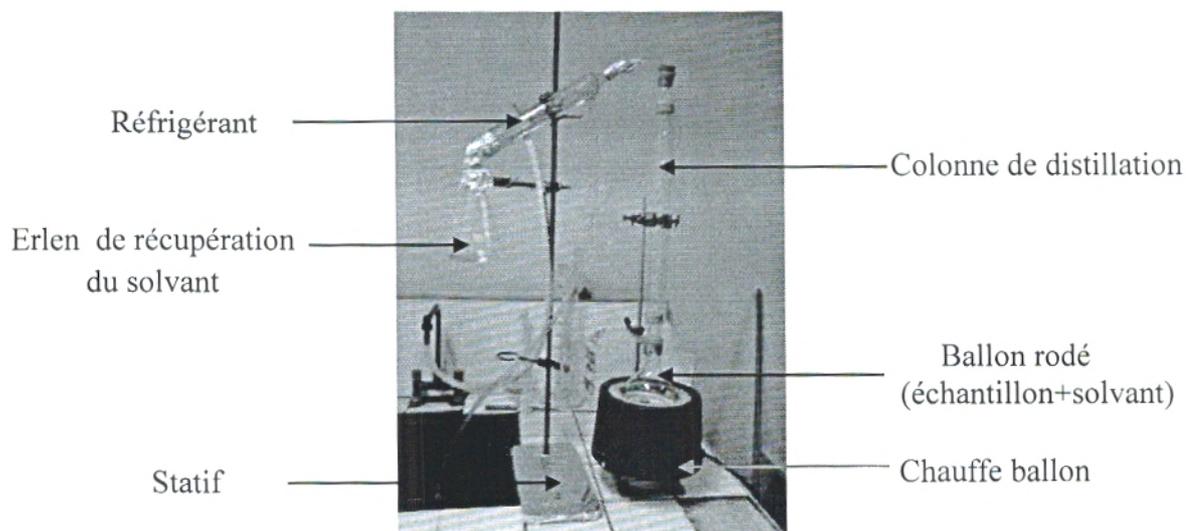


Figure n° 6 : Montage de dispositif de la distillation

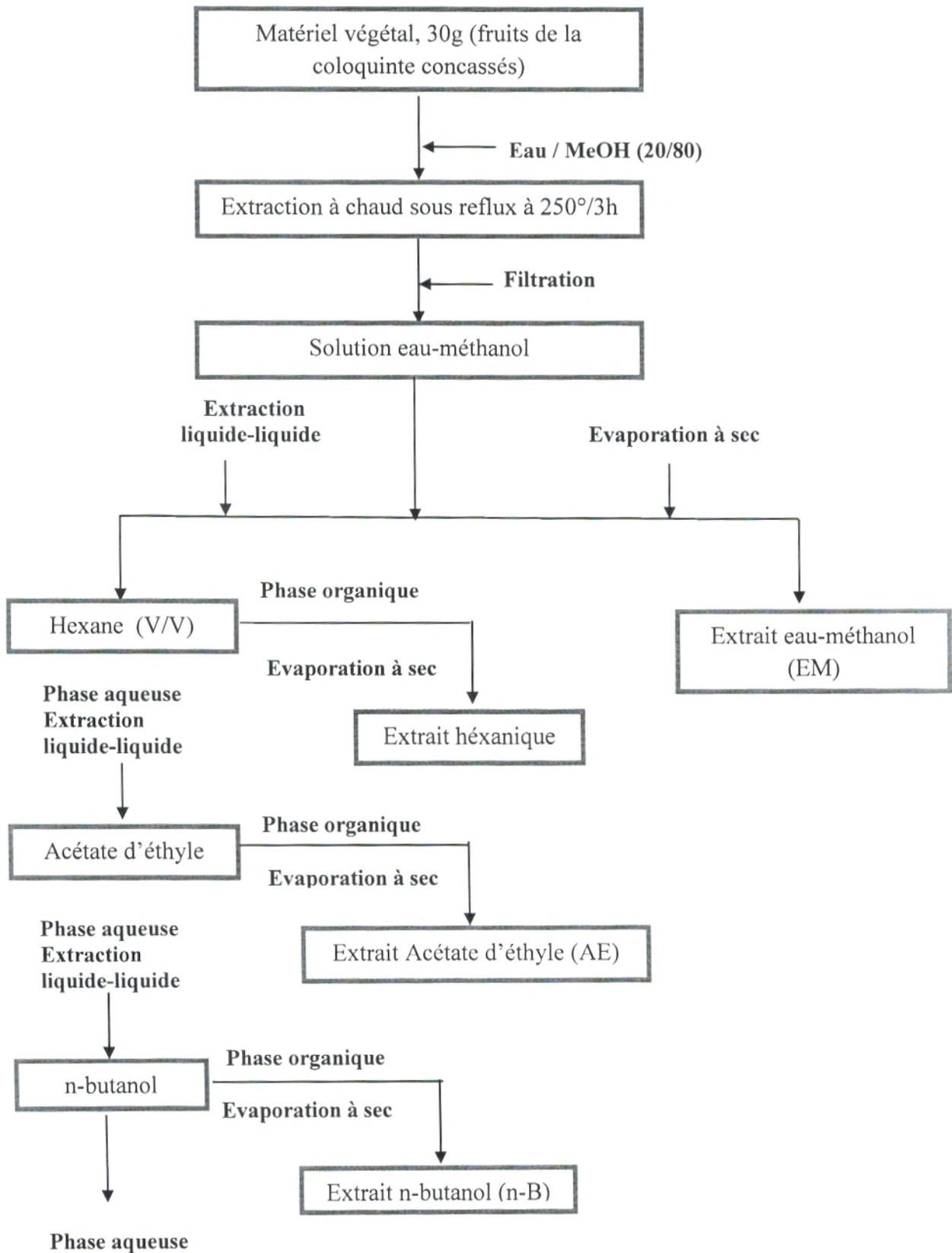


Figure n°7 : Schéma explicatif pour préparation des extraits organiques à partir du fruit de la coloquinte.

2-Tests phytochimiques

Un criblage phytochimique est réalisé dans les extraits préparés, afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains composés chimiques.

✿ Les flavonoïdes

Traiter 5 ml de chaque extrait (aqueux, eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol) avec quelques gouttes d'HCl concentré, ajouter quelques milligrammes de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange

✿ Les tanins

A 2 ml de chaque extrait, on ajoute 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl_3 à 1%. Après quelques minutes d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur bleu ou verte foncée.

✿ Les saponosides réaction de Libermann-Burchard

A 5 ml de chaque extrait (aqueux, eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol), on ajoute 5 ml d'anhydride acétique et plus de 20 gouttes d' H_2SO_4 concentré. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée virant au vert ou une couleur rouge-marron de la couche d'interface indique la présence de saponosides triterpéniques.

✿ Les terpenoïdes

Traiter 5 ml de chaque extrait avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d' H_2SO_4 concentrée, la présence de terpenoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

✿ Les coumarines

Solubiliser quelques milligrammes de chaque extrait préparé dans 2ml d'eau chaude, la solution obtenue est divisée en deux parties égales dont :

- La première représente le témoin ;
- La deuxième est traitée avec 0.5 ml de NH_4OH à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines.

☼ **Les quinones libres**

A un volume de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes de NaOH à 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

☼ **Les alcaloïdes**

Trois réactifs sont utilisés : réactif de Mayer, réactif de Wagner et réactif de Dragendroff qui sont préparés comme suit :

- **Réactif de Mayer** : dissoudre 1.358 g d' HgCl_2 dans 60 ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100ml
- **Réactif de Wagner** : dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I_2 . Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

A 0.2 ml de chaque extrait (aqueux, eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol), on ajoute 5 ml d'HCl à 1%, incubation au bain marie, on divise chaque extrait en trois parties puis on ajoute au premier le réactif de Mayer, au second le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes

☼ **Les anthraquinones**

A 10 ml de chaque extrait, on ajoute 5 ml de NH_4OH à 10% et on agite. L'apparition de couleur violette indique un test positif.

☼ **Les sucres réducteurs**

On ajoute à 5 ml de chaque extrait chauffé au bain marie, 1ml de liqueur Fehling. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique.

☼ **Les amines**

On applique sur papier filtre une goutte de chaque extrait, après séchage à 80°C (à l'étuve), le papier est pulvérisé avec une solution de la ninhydrine. Le papier est séché à l'étuve (110°C) pendant 5 min. La présence des amines est observée sous forme d'une tache violette.

3- Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux

3-1 Préparation des extraits pour le dosage

- L'extrait aqueux est préparé dans l'eau distillée à une concentration de 10 mg/ml.
- L'extrait eau-méthanol est dissout dans un mélange eau- méthanol (20/80) à une concentration de 10 mg/ml.
- Les extraits : acétate d'éthyle et n-butanol sont solubilisés dans le méthanol à une concentration de 10 mg/ml.

3-2 Dosage des polyphénols [Vermerius et Nicholson, 2006 ; Boizot et charpentier, 2006]

● Principe

La quantification de polyphénols totaux est réalisée par une méthode à base de Folin Ciocalteu, ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation de phénols, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximale comprise entre 725 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux.

● Mode opératoire (tableau n°5)

- 0,1 ml d'échantillon de chaque extrait sont mélangés avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% ;
- Agitation des tubes ;
- 1^{ère} incubation pendant 5 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 100 μ l du réactif Folin Ciocalteu à 0.2 N ;
- 2^{ème} incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- La lecture se fait à 700 nm contre le blanc (**tableau n°5**) ;

Une gamme étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations final (2,27 / 4,54 / 9,1 / 13,63 / 18,18 / 22,72 / 27,27 μ g/ml).

Tableau n°5 : Dosage de polyphénols du fruit de la coloquinte

Concentration de l'acide gallique (µg/ml)		50	100	200	300	400	500	600					
Volume de l'acide gallique (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1					
Les extraits (ml)	Aqueux								0.1				
	Eau-méthanol									0.1			
	Acétate d'éthyle										0.1		
	n-butanol											0.1	
Blanc avec MeOH													0.1
NaCO ₃ (ml)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1 ^{ère} Incubation pendant 5 min à température ambiante													
Folin Ciocalteu (µl)		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2 ^{ème} Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité													
Lecture au spectrophotomètre à 700 nm													

La concentration des polyphénols totaux présents dans nos échantillons, exprimée en µg Eq d'acide gallique/ mg d'extrait est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphénols}] = a \cdot f / C$$

- a : concentration des polyphénols (µg / ml) déterminée à partir de la courbe étalon.
- f : facteur de dilution (×22).
- C : concentration initial de chaque extrait (10 mg/ml).

3-3 Dosage de flavonoïdes totaux [Zhishen et al, 1999] in [Ardestani et Yazdanparast, 2007]

● Principe

La quantification du taux de flavonoïde est estimée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes, et la soude forme un complexe de couleur rose qui adsorbe dans le visible à 510 nm.

● **Mode opératoire (tableau n°6)**

- ▶ 500 µl de chaque extrait ou de catéchine sont mélangés avec 2 ml d'eau distillée ;
- ▶ Ajouter 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 15 %.
- ▶ 1^{ère} incubation 6 minutes à température ambiante ;
- ▶ Ajouter 150 µl de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 6H₂O) à 10 % ;
- ▶ 2^{ème} incubation 6 minutes à température ambiante ;
- ▶ Ajouter 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 % ;
- ▶ Le volume totale est complété à 5 ml avec l'eau distillée ;
- ▶ Agiter et incuber pendant 15 minutes ;
- ▶ La lecture se fait à 510 nm contre le blanc;

Une gamme étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations finales (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml).

Tableau n°6: Dosage de flavonoïdes totaux du fruit de la coloquinte

Concentration de la Catéchine (µg/ml)		50	100	200	300	400	500	600					
Volume de la Catéchine (ml)		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5					
Les extraits (ml)	Aqueux								0.5				
	Eau-méthanol									0.5			
	Acétate d'éthyle										0.5		
	n-butanol											0.5	
Blanc avec MeOH													0.5
Eau distillé (ml)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NaNO ₂ (ml)		0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
1 ^{ère} Incubation pendant 6 min à température ambiante													
AlCl ₃ (ml)		0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
2 ^{ème} Incubation pendant 6 min d'incubation à température ambiante													
NaOH (ml)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Compléter le volume à 5 ml et incubation pendant 15 min													
Lecture au spectrophotomètre à 510 nm													

La concentration des flavonoïdes présents dans nos échantillons exprimée en μg Eq de catéchine/ mg d'extrait est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Flavonoïdes}] = a \cdot f / C$$

- ➔ a : concentration des flavonoïdes ($\mu\text{g} / \text{ml}$) déterminée à partir de courbe étalon.
- ➔ f : facteur de dilution ($\times 10$).
- ➔ b : concentration initial de chaque extrait (10mg/ml).

4- Chromatographie sur couche mince

4-1 Principe de la méthode

Cette partie de notre travail nous permettra de procéder à un fractionnement de nos extraits, qui sont des extraits brut contenant plusieurs composants, dans ce but nous nous sommes basés sur la CCM comme technique d'analyse qualitative afin de nous orienter sur la composition des extraits de fruit de la coloquinte en utilisant certains étalons comme l'acide gallique, myrcétine, catéchine et le quercétine. Les essais de CCM sont réalisés sur les quatre extraits : aqueux, eau-méthanol, n-butanol et acétate d'éthyle.

4-2 Mode opératoire

4-2-1 Préparation des extraits

1mg de chaque extrait est solubilisé, dans 3ml d'eau distillée pour l'extrait aqueux, et dans un mélange eau-méthanol (1/2, V/V) pour l'extrait eau-méthanol, alors que l'extrait, acétate d'éthyle a été solubilisé dans 1 ml de méthanol et n-butanol (1/2, V/V).

Les témoins utilisés sont : la myrcétine, la catéchine, l'acide gallique et la quercétine, préparés à 0,1% dans le méthanol.

Pour cette analyse nous avons utilisé des plaques de verre (0,1 mm) en gel de silice 10 x10 cm; (G60), fluorescente (fluka) ;

4-2-2 Choix de la phase mobile

Plusieurs systèmes de solvants, utilisés en bibliographie, ont été employés pour mieux séparer les différents composés polyphénoliques éventuellement présents dans nos quatre extraits :

- ✓ Eau : Méthanol (20/80), (30/70), (40/60).
- ✓ n-butanol : Acide acétique : Eau ou BAW, (40/50/10).
- ✓ Chloroforme : Méthanol : Eau (70/15/0.2), (60/25/0.2), (50/50/0.2), (40/60/0.2),
- ✓ Chloroforme : Méthanol (40/60), (60/40).
- ✓ Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle : Eau (30/40/30/0.2), (65/30/15/0.2), (75/20/5/0.2), (20/60/20/0.2), (20/50/30/0.2), (30/50/20/0.2).
- ✓ Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle : Acide acétique : Eau (60/25/10/5/0.2), (60/30/5/5/0.2).
- ✓ Chloroforme : Méthanol : Acide acétique : Eau (65/30/5/0.2),
- ✓ Acétate d'éthyle : Acide formique : Eau (8/1/1)
- ✓ Acétate d'éthyle : chloroforme : Méthanol (80/23,5/20), (60/23.5/40), (65/28.5/50).

4-3 Révélation

Après migration du système sur la plaque CCM, on procède à la révélation des chromatogrammes sous une lampe UV à 254 nm et à 366 nm.

L'interprétation qualitative des chromatogrammes s'effectue par la détermination des facteurs de rétention R_f , Le rapport frontal calculé selon la formule suivante,

$$R_f = \frac{X}{Y} = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

5- Le pouvoir réducteur de *Citrullus colocynthis*

5-1 Principe de la méthode

Pour évaluer l'activité antiradicalaire, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par [Sanchez *et al*, 1998]. Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine ; dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical azoté stable disponible commercialement sous la forme d'un solide. Lorsqu'il est mis en solution dans l'éthanol, le radical DPPH est caractérisé par un maximum d'absorbance à 515 nm. Le DPPH réagit avec un antioxydant par arrachement d'un hydrogène, il se forme alors la 2,2-diphénylhydrazine DPPH₂ (**figure n°8**). Ce produit de la réaction ne possède plus de bande d'absorption autour de 515 nm. Ce test consiste donc à suivre la variation de l'absorbance à 515 nm, caractéristique du radical DPPH, en présence du composé étudié.

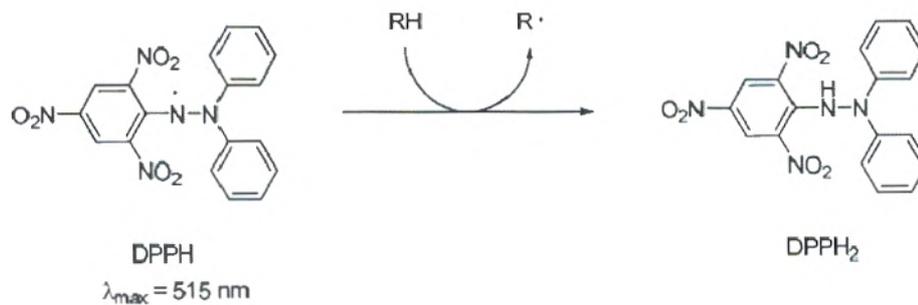


Figure n°8 : Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams *et al*, 1995).

5-2 Mode opératoire

- ✓ Préparation du DPPH d'une concentration de 0.025 mg /ml de méthanol,
- ✓ Préparation de la gamme dans le méthanol de chaque extrait à différentes concentrations (1, 2, 4, 6, 1, 20, 30 mg/ml),
- ✓ A 1950 µl de la solution du DPPH on ajoute 50 µl ml de chaque extrait à différentes concentrations (1, 2, 4, 6, 10, 20, 30 mg/ml),
- ✓ Préparation du tube blanc pour chaque concentration, à 1950 µl de la solution du méthanol on ajoute 50 µl ml de chaque extrait

- ✓ Préparation du tube contrôl négatif, on mélangeant 50µl du méthanol avec 1950 µl de la solution du DPPH,
- ✓ Le blanc de l'appareil est le méthanol 2 ml,
- ✓ Incubation 30 min à température ambiante, à l'obscurité,

Après 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm, comparée aux standards qui contiennent l'acide ascorbique à différentes concentrations (20, 40 ,60 ,80 µg/ml)

Tableau n°7: Mode opératoire pour déterminer l'activité antiradicalaire du fruit de la coloquinte

Concentration de l'acide ascorbique (mg/ml)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2	0.3					
Volume de l'acide ascorbique (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05					
Les extraits (ml) à différentes [C] (1, 2, 4, 6, 10, 20,30) mg/ml	Aqueux								0.05				
	Eau-méthanol									0.05			
	Acétate d'éthyle										0.05		
	n-butanol											0.05	
Control positif MeOH (ml)													0,5
Volume de DPPH (ml)	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95
Incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité													
Lecture au spectrophotomètre à 517 nm													

5-3 Expression des résultats

5-3-1 Pourcentage de réduction du DPPH

Nos résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues. Pour chaque extrait nous avons déterminé le pourcentage de réduction du DPPH selon la formule suivante [Yen *et al*, 1994] :

$$DPPH (\%) = \frac{(Do \text{ contr } 0min) - (Do \text{ éch } 30min)}{(Do \text{ contr } 0min)} \times 100$$

DPPH (%) : Pourcentage de réduction ou d'inhibition du DPPH.

DO cont à t0_{min} : Densité optique du DPPH à t0_{min}.

DO éch à t30_{min} : Densité optique 30min après avoir ajouté l'extrait.

5-3-2 Détermination IC₅₀

La valeur IC₅₀ est la concentration du substrat qui assure la réduction de 50% de l'activité du DPPH déterminée graphiquement [Samarth et al, 2008].

5-3-3 Détermination l'activité antiradicalaire (Scavenging activity) (A_{AR})

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire [Brandwilliams et al, 1995].

L'activité antiradicalaire est déterminée, en calculant l'inverse des valeurs des IC₅₀ [Maisuthisakul et al, 2007].

$$\text{ARP} = 1/\text{IC}_{50}$$

ARP : Puissance anti radicalaire

IC₅₀ : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

Résultats
Et
Interprétation

1-Extractions

1-1 Détermination du taux de lipides

Le dégraissage du fruit de la coloquinte a permis l'élimination de 8.6 % de matière grasse.

1-2 Détermination du rendement des extraits du fruit de la coloquinte

Après extraction, récupération des extraits sous forme de poudre ou pâte, de couleurs différentes avec des rendements variables, le **tableau n°8** résume les caractéristiques de chacun de ces produits.

Tableau n°8: Quelques caractéristiques des extraits préparés à partir de fruit de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*).

Caractéristiques	Masse (g)	Aspect	Couleurs	Rendement (%)	Solubilité
Extrait aqueux (AQ)	1,7	Poudre	Jaune claire	5,7	Eau
Extrait eau-méthanol (EM)	1.96	Poudre	Marron foncé	6.73	Méthanol –Eau
Extrait acétate d'éthyle (AE)	1.05	Poudre	Jaune claire	3.50	Méthanol
Extrait n-butanol (n-B)	1.19	Poudre	Marron orangé	4.00	Méthanol-Eau Eau
Hexane (EH)	-	Produit Hygroscopique	Vert claire	-	-

Selon le **tableau n° 8**, on remarque que la plus part de nos extraits ont été récupérés sous forme de poudre de couleur différente, à l'exception de l'extrait hexanique qui présente l'aspect hygroscopique. L'extrait eau-méthanol présente le rendement d'extraction le plus élevé, il est de 6.73 %, suivie par l'extrait aqueux 5.7 %, alors que les extraits acétate d'éthyle et n-butanol présentent de faible rendement 3.5 % et 4 % respectivement.

De plus ces extraits présentent une bonne solubilité dans le mélange méthanol-eau et dans le méthanol, à l'exception de l'extrait aqueux qui est soluble uniquement dans l'eau.



2- Les tests phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau n°9**.

Tableau n° 9: Résultats des tests phytochimiques d'extraits de fruit de la coloquinte.

Les composés		Extrait aqueux	Extrait eau-méthanol	Extrait acétate d'éthyle	Extrait n-butanol	Extrait Hexane
Les flavonoïdes		+ (Jaune clair)	+ (Orange clair)	+ (Orange clair)	++ (Orange)	-
Tanin	Galliques	-	-	-	-	-
	Cathéchiques	-	+	+	++	-
Les alcaloïdes	Mayer	+	-	-	++	-
	Wagner	+++	+	+	+++	-
Saponosides	triterpéniques	-	-	-	-	+++
	Stéroïdiennes	++ (Interphase rouge)	-	-	-	-
Terpénoïdes		+++	+	+++	++	+++ (Interphase marron)
Coumarines		++ (Fluorescence)	+ (Faible fluorescence)	+++ (Fluorescence)	+	-
Les quinones libres		-	++ (Jaune foncé)	++	+	-
Les anthraquinones		-	-	+ (vert fluorescence)	-	-
Les sucres réducteurs		+++	+++	+	+	-
Les amines		+++ (Violet foncé)	++ (Violet clair)	-	++ (violet clair)	-

(+++): Test fortement positif.

(++): Test positif.

(+): Test faiblement positif.

(-): Test négatif.

Selon les résultats mentionnés dans le **tableau** ci-dessus, on constate l'absence totale des anthraquinones, saponosides triterpéniques, et les tanins galliques dans les quatre extraits. Seul l'extrait hénanique présente un test fortement positif dans la classe de saponosides triterpéniques.

Par contre on note un test positif (++) des tanins catéchiques pour l'extrait n-butanol et faiblement positif pour les extraits eau-méthanol (EM) et acétate d'éthyle (AE), avec une absence totale dans les extraits aqueux, hénanique. Concernent les alcaloïdes on note un test positif seulement pour les extraits aqueux et n-butanol.

Alors que les flavonoïdes sont présents dans tous les extraits, et en forte quantité dans l'extrait n-butanol. De plus les saponosides stéroïdiens sont présent seulement dans l'extrait aqueux.

Les quinones libres sont absentes dans l'extrait aqueux et hénanique se trouvent en quantité remarquable dans les autres extraits. On note également la présence des coumarines dans tous nos extraits, mais en forte quantité dans l'extrait acétate d'éthyle. Les sucres réducteurs sont présents en forte quantité dans l'extrait aqueux, eau-méthanol et faiblement positif dans les autres extraits (n-butanol, et l'extrait acétate d'éthyle), avec absence totale pour l'extrait hénanique

Les tests phytochimiques révèlent aussi un test fortement positif des amines dans les extraits : aqueux, eau-méthanol, et n-butanol, avec une absence totale dans l'extrait acétate d'éthyle et hénanique.

3- Dosage de polyphénols et flavonoïdes totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des espèces étudiées ont été déterminées en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, ce dernier forme un complexe rédox avec l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀) lors de l'oxydation des phénols.

Les résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux dans nos extraits sont représentés dans le **tableau n°10**. Les courbes étalons de l'acide gallique et la catéchine sont représentés dans les **figures 9, 10** respectivement.

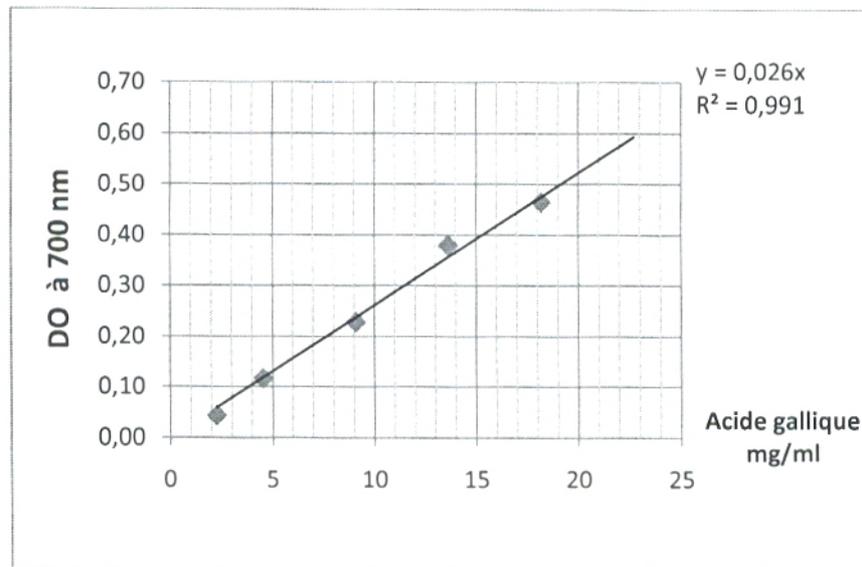


Figure n°9 : Courbe étalon de l'acide gallique.

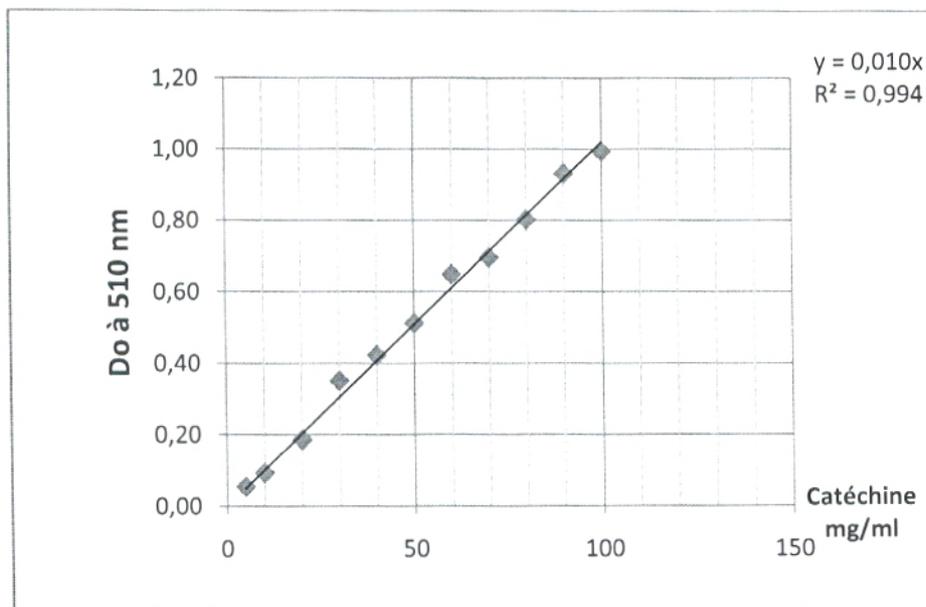


Figure n°10: Courbe étalon de la catéchine.

Tableau n°10 : Résultats du dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits de fruit de *Citrullus colocynthis*.

	Polyphénols		flavonoïdes totaux	
	($\mu\text{g.Eq}$ acide gallique/mg d'extrait)	($\mu\text{g.Eq}$ acide gallique/100g de matière végétale)	($\mu\text{g.Eq}$ catéchine/mg d'extrait)	(μg Eq catéchine/100 g de matière végétale)
Aaqueux	41,34	235,66	11,95	68,16
Eau-méthanol	34,59	232,83	14,68	98,84
Acétate d'éthyle	30,95	108,34	21,42	74,97
n-butanol	47,13	188,53	35,68	142,75

Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que l'extrait n-butanol est riche en composés phénoliques avec un taux de 47.134 μg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait, suivie par l'extrait aqueux 41,34 $\mu\text{g.Eq}$ acide gallique /mg d'extrait, pour l'extrait eau-méthanol renferme 34,59 $\mu\text{g.Eq}$ acide gallique /mg d'extrait, tandis que l'extrait acétate d'éthyle ne contient que 30,95 $\mu\text{g.Eq}$ acide gallique/ mg d'extrait.

Le dosage de flavonoïdes totaux montre que la teneur la plus élevée est celle de l'extrait n-butanol, il renferme 35.68 $\mu\text{g.Eq}$ catéchine/mg d'extrait, l'extrait acétate d'éthyle contient 21,42 $\mu\text{g.Eq}$ catéchine/ mg de d'extrait pour l'extrait eau-méthanol 14,68 $\mu\text{g.Eq}$ catéchine/mg d'extrait, alors que l'extrait aqueux contient une faible teneur en flavonoïdes 11,95 $\mu\text{g.Eq}$ catéchine/mg d'extrait.

4- chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation partielle des extraits préparés (aqueux, eau-méthanol, acétate d'éthyle, n-butanol), une chromatographie sur couche mince a été réalisée, en utilisant plusieurs systèmes éluants de polarité différentes, ainsi que certains standards comme : la myricétine, la catéchine, l'acide gallique et la quercétine, les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau n°11**.

Tableau n° 11: Résultats de quelques analyses chromatographiques (CCM) des différents extraits de fruit de la coloquinte à 254 nm.

	Système (V/V)	Extraits				Témoins			
		AQ	EM	AE	n-B	R _f			
		R _f				Cat	Myr	AG	QU
H ₂ O / MeOH	(40/60)	0,95	0,96	0,96	0,96	0,98	0,95	0,71	0,73
	(20/80)	0,92	0,92	0,92	0,91	0,92	0,88	0,82	0,82
	(30/70)	0,94	0,93	0,94	0,94	0,95	0,91	0,74	0,8
CHCl ₃ / MeOH	(60/40)	0,93	0,92	0,94	0,92	0,87	0,76	0,92	0,88
	(40/60)	0,90	0,90	0,90	0,99	0,88	0,80	0,88	0,87
CHCl ₃ / MeOH / H ₂ O	(40/60/0,2)	0,94	0,94	0,94	0,94	0,92	0,75	0,94	0,92
	(60/25/0,2)		0,89 0,93 0,98	0,82 0,96 0,99	0,71 0,77 0,83 0,96	0,83	0,66	0,96	0,91
	(50/50/0,2)	0,94	0,92	0,89	0,92	0,88	0,75	0,92	0,89
	(70/15/0,1)	0,34	0,11 0,22 0,26 0,32 0,43	0,17 0,22 0,28 0,59 0,70 0,84	0,09 0,21 0,25 0,31 0,40	0,09	0,07	0,45	0,30
CHCl ₃ / MeOH / EtOAc / H ₂ O	(65/30/15/0,2)	0,49 0,55	0,44 0,47 0,52 0,59	0,48 0,50 0,55 0,61 0,79	0,48 0,50 0,56 0,61	0,47	0,28	0,73	0,60
	(20/50/30/0,2)		0,87 0,93	0,86	0,88	0,95	0,81	0,95	0,93
	(20/60/20/0,2)	0,74	0,92	0,86	0,88	0,90	0,79	0,93	0,93
	(30/40/30/0,2)		0,69	0,82 0,95	0,77	0,80	0,64	0,94	0,93
	(30/50/20/0,2)	0,91	0,89	0,82	0,93	0,94	0,81	0,98	0,96
	(75/20/5/0,2)	0,45 0,55	0,44 0,48	0,42 0,53 0,73	0,36 0,44	0,32	0,27	0,60	0,48

CHCl ₃ / MeOH / EtOAc / CH ₃ COOH / H ₂ O	(60/25/10/5 /0,2)	0,67 0,71	0,54 0,58 0,65 0,74	0,47 0,57 0,63 0,72 0,88	0,40 0,53 0,56 0,63 0,70	0,53	0,55	0,81	0,71
	(60/30/5/5 /0,2)	0,81 0,83	0,75 0,80 0,88	0,64 0,73 0,75 0,80 0,83	0,56 0,71 0,74 0,80 0,88	0,69	0,67	0,88	0,78
CHCl ₃ MeOH / CH ₃ COOH / H ₂ O	(65/30/5 /0,2)	0,94	0,94	0,93	0,92	0,93	0,87	0,93	0,92
EtOAc / CH ₂ O ₂ / Eau	(8/1/1)	0,43 0,60	0,38 0,42 0,52 0,64	0,42 0,45 0,54 0,56 0,68 0,85	0,43 0,46 0,57 0,68 0,73	0,96	0,93	0,95	0,96
EtOAc / CHCl ₃ / MeOH	(80/23,5/20)	0,60	0,42 0,48 0,62	0,43 0,48 0,60	0,43 0,46 0,60	0,81	0,78	0,90	0,85
	(60/23,5/40)	0,91	0,90	0,90	0,90	0,92	0,87	0,95	0,92
	(65/28,5/50)	0,84 0,89	0,84 0,89	0,81 0,87	0,75 0,84 0,89	0,90	0,81	0,93	0,89
BAW	(40/50/10)	0,78 0,81 0,85	0,76 0,81 0,85	0,76 0,80 0,84 0,87	0,69 0,73 0,76 0,81	0,93	0,92	0,95	0,92

Rf : Rapport frontale.

EtOAc : Acétate d'éthyle

MeOH : Méthanol

Cat : Catéchine (Jaune orangé à 254 nm)

Myr : Myrcétine (Jaune à 254 nm)

AG : Acide gallique (couleur foncé à 254 nm)

QU : Quercétine (Jaune clair à 254 nm)

BAW : n-butanol /acide acétique/eau

CHCl₃ : Chloroforme

CH₂O₂ : Acide formique

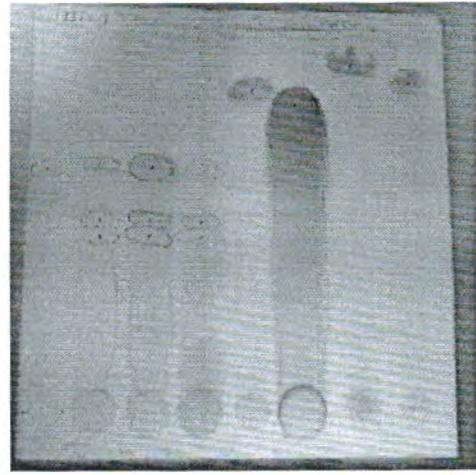
CH₃COOH : Acide acétique

AQ : Extrait aqueux

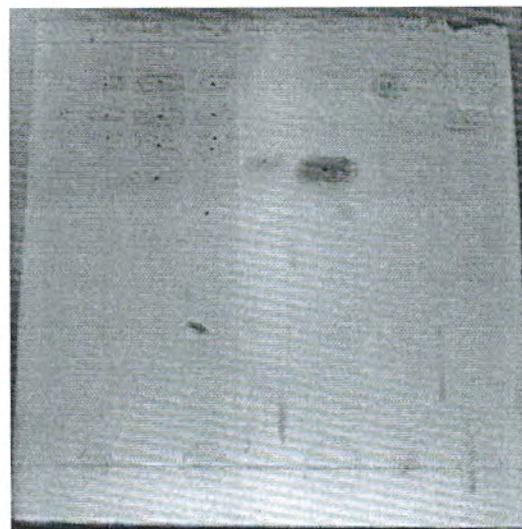
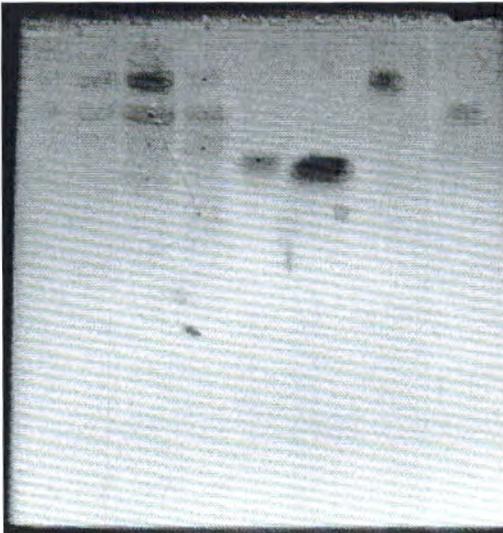
EM : Extrait eau-méthanol

AE : Extrait acétate d'éthyle

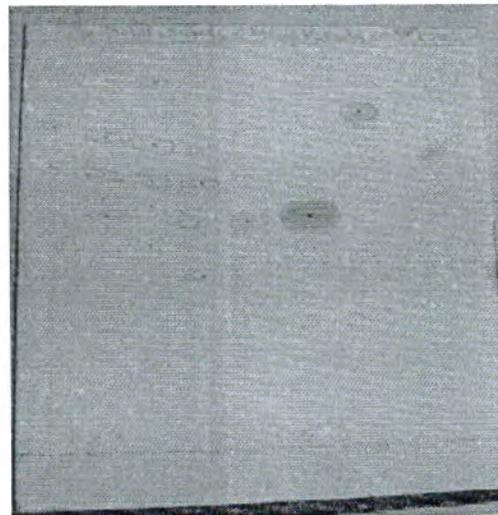
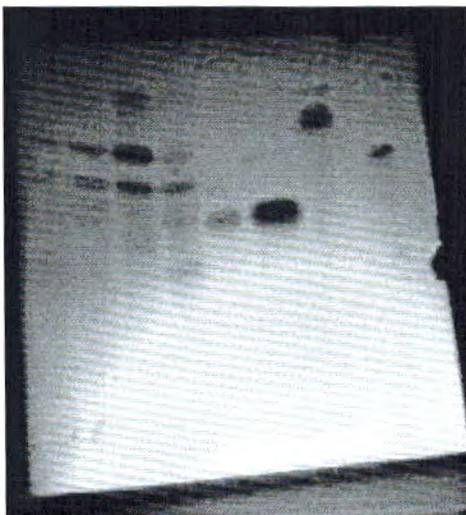
n-B : Extrait n-butanol



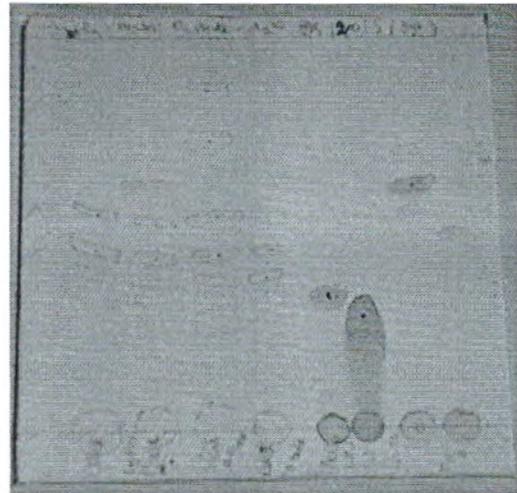
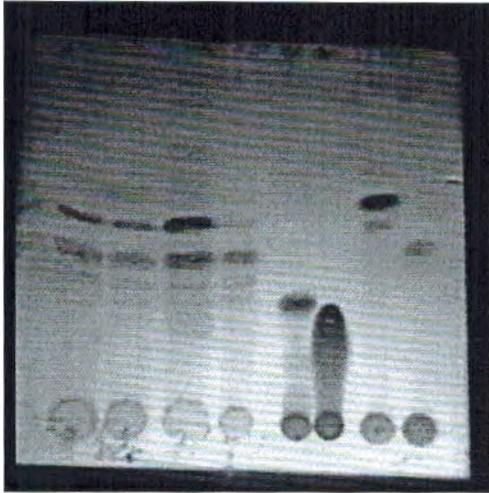
A- Plaque CCM (254 nm) au système acétate d'éthyle/chloroforme/méthanol (80/23,5/20).



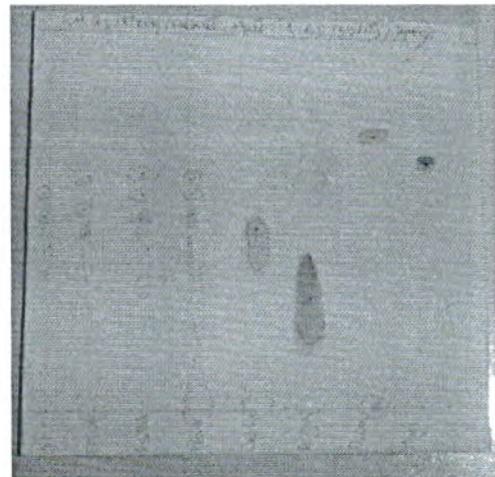
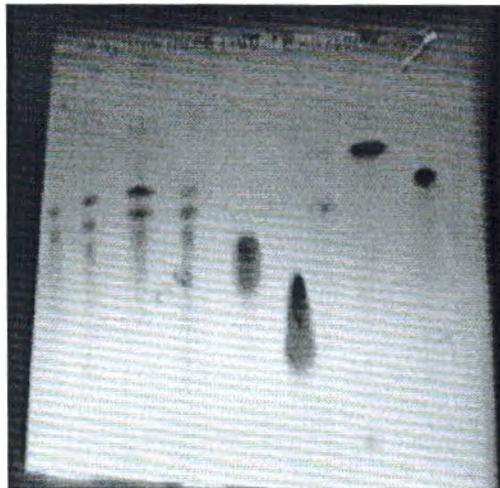
B-Plaque CCM (254 nm) au système Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle : Acide acétique : Eau (60/30/5/5/0.2).



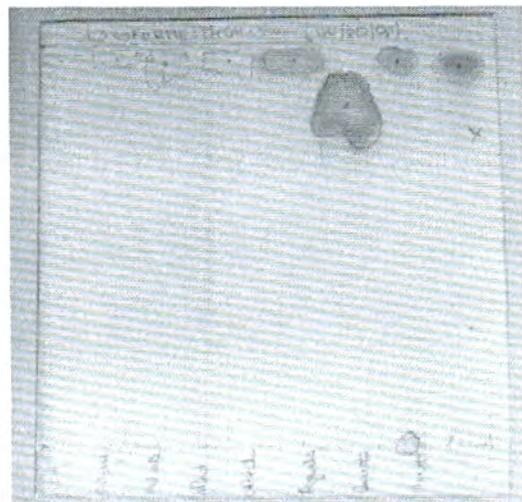
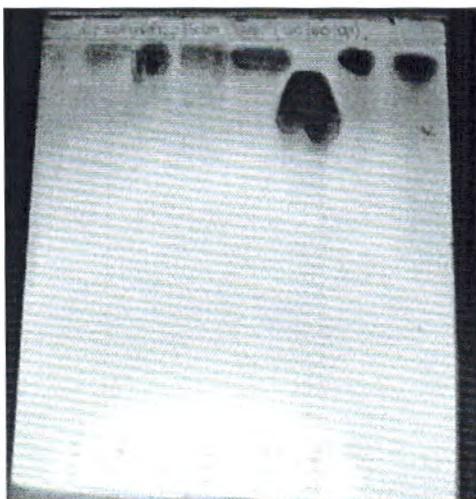
C-Plaque CCM (254 nm) au système Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle : Acide acétique : Eau (60/25/10/5/0.2).



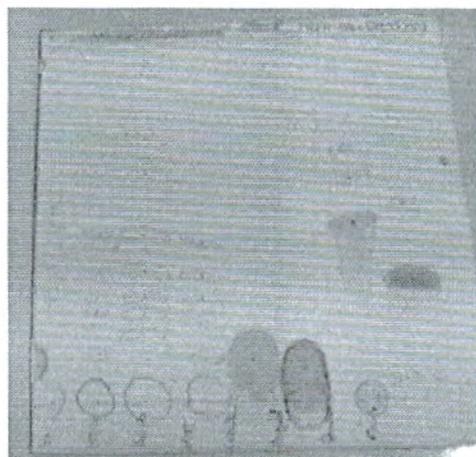
D- Plaque CCM (254 nm) au système **Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle : Eau (75/20/5/0.2)**,



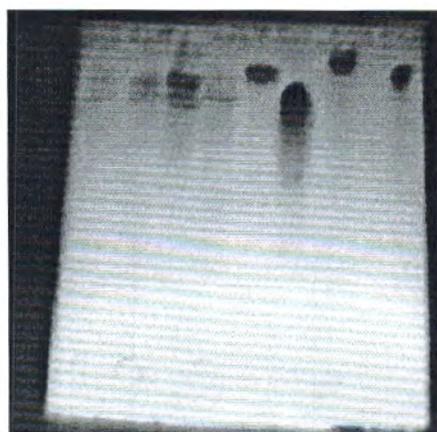
E- Plaque CCM (254 nm) au système **Chloroforme : Méthanol : Acétate d'éthyle : Eau (65/30/15/0.2)**



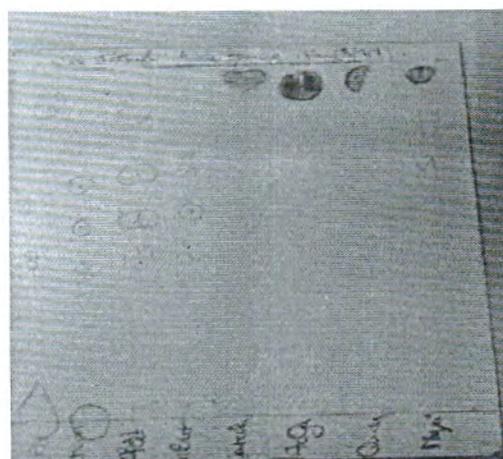
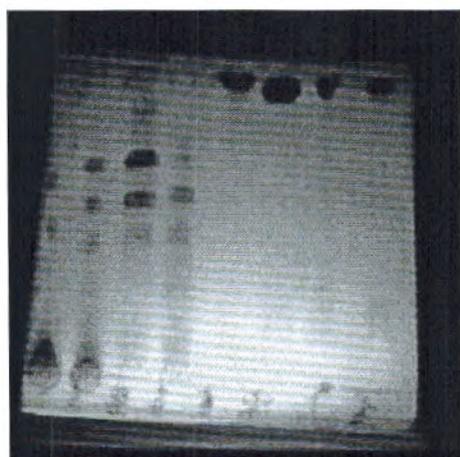
F- Plaque CCM (254 nm) au système **Chloroforme : Méthanol : Eau (40/60/0.2)** 41



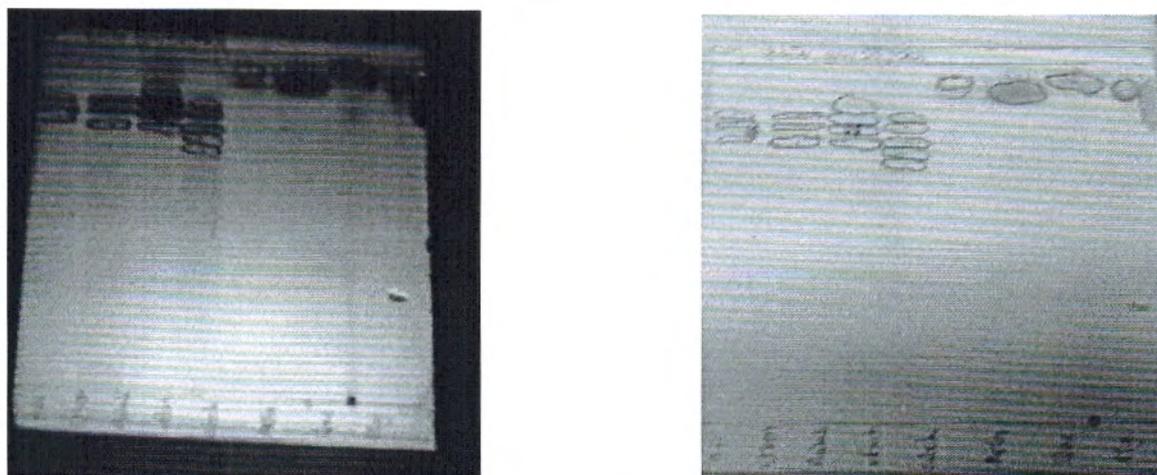
G -Plaque CCM (254 nm) au système **Chloroforme : Méthanol : Eau (70/15/0.2)**



H- Plaque CCM (254 nm) au système **Acétate d'éthyle : chloroforme : Méthanol (65/28.5/50)**.



I- Plaque CCM (254 nm) au système **Acétate d'éthyle : Acide formique : Eau (8/1/1)**



J- Plaque CCM (254 nm) au système **n-butanol : acide acétique : Eau (40/50/10)**

Figure 11: Séparation des extraits de la coloquinte sur CCM.

AQ : Extrait aqueux
EM : Extrait eau-méthanol
AE : Extrait acétate d'éthyle
n-B : Extrait n-butanol

Cat : Catéchine (Jaune orangé à 254 nm)
Myr : Myrcétine (Jaune à 254 nm)
AG : Acide gallique (couleur foncé à 254 nm)
QU : Quercétine (Jaune clair à 254 nm)

Après révélation sous lampe UV à 254 nm et comparaison des R_f des différentes taches obtenues avec celles des témoins utilisés, on constate que :

Afin de permettre une meilleure séparation des composés phénoliques on a essayé de diminuer la polarité de ce solvant ; pour cela nous avons choisis les proportions **chloroforme/méthanol/eau (70/15/0,1)** on a obtenu une seule tache dans l'extrait aqueux et plusieurs taches dans les extraits eau-méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol. Deux taches aux R_f 0.09, 0.31 présente dans l'extrait n-butanol peut correspondre à la catéchine, et le quercétine, aucun R_f des autres extraits ne correspond aux témoins. Ces extraits sont insolubles dans ce système d'où une mauvaise solubilité, et une mauvaise migration des extrait dans la ligne de dépôts. De même, le système aux proportions **60/25/0.1**, n'a donnée aucune tache pour l'extrait aqueux et trois taches pour les extraits eau-méthanol, acétate d'éthyle et quatre taches pour l'extrait n-butanol. Une taches aux R_f 0.96 présente dans les extraits acétate d'éthyle et n-butanol peut correspondre à l'acide gallique, et la tache au R_f 0.83 présente dans les extraits : n-butanol et l'acétate d'éthyle peut correspondre à la catéchine.

Un autre système à base **chloroforme/méthanol/ acétate d'éthyle/acide acétique/eau (60/25/10/5/0.2)** a permis de séparer quatre taches pour l'extrait eau-méthanol, 5 taches au niveau de l'extrait acétate d'éthyle et n- butanol, ainsi que 2 taches pour l'extrait aqueux (**figure 11-C**) dont l'une correspond à la quercétine, présente également dans les extraits acétate d'éthyle, aqueux, et n-butanol. Et deux taches aux R_f 0.55, 0.53 présentent dans les extraits : n-butanol et eau-méthanol et peut correspondre respectivement à la myrcétine et la catéchine. Ces extraits sont solubles dans ce système aucune tache dans la ligne de dépôts.

Afin de permettre une meilleure séparation des composés phénoliques on a essayé de diminuer la polarité de ce solvant ; pour cela nous avons choisis les proportions **(60/25/10/5/0.2)chloroforme/méthanol/ acétate d'éthyle/acide acétique/eau**, on a obtenu 2 taches pour l'extrait aqueux, 5 taches au niveau de l'extrait acétate d'éthyle et n- butanol et 3 taches pour l'extrait eau-méthanol, dont une correspond à l'acide gallique, est présente aussi dans les extraits eau-méthanol et n- butanol. Ce système révèle la présence des acides phénoliques (acide gallique) et absence de flavonoïdes aucun R_f des extraits ne correspond aux témoins de flavonoïde (la catéchine, la quercétine, et la myrcétine). Alors qu'il présente une bonne solubilité pour ces extraits (aucune tache dans la ligne de dépôts).

Avec le système **chloroforme/méthanol/ acétate d'éthyle/eau** aux proportions **(65/30/15/0.2)** on a obtenu 2 taches pour l'extrait aqueux, 5 taches au niveau de l'extrait acétate d'éthyle et 4 taches pour l'extrait n- butanol et eau-méthanol on remarque aussi qu'une tache d'un R_f de 0,49 correspondant à la catéchine est présente dans les quatre extraits, et une autre tache d'un R_f de 0,60 correspondant à la quercétine est présente dans les extraits n- butanol et acétate d'éthyle. La diminution de la polarité aux proportions **(75/20/5/0.2)** a révélé 2 taches pour l'extrait aqueux, acétate d'éthyle et n- butanol et 3 taches au niveau d'extrait eau-méthanol, on remarque aussi qu'une tache d'un R_f de 0,48 correspondant à la quercétine est présente dans l'extrait eau-méthanol.

Le système **acétate d'éthyle/acide formique/eau (8/1/1)** a permis la séparation de 2 taches pour l'extrait aqueux, 4 pour l'extrait eau-méthanol, 6 pour l'extrait acétate d'éthyle, et 5 taches pour l'extrait n- butanol, aucun R_f des extraits ne correspond aux témoins avec une absence totale des acides phénoliques et des composés flavonoïques.

Un autre système à base d'**acétate d'éthyle/chloroforme/méthanol (80/23,5/20)** a permis de séparer trois taches pour l'extrait eau-méthanol, acétate d'éthyle et l'extrait n-butanol ainsi que une tache pour l'extrait aqueux, aucun R_f des extraits ne correspond aux témoins.

Ce même système aux proportions **(65/28.5/50)**, on remarque une séparation de 2 taches au niveau de l'extrait aqueux, acétate d'éthyle et eau-méthanol et 3 taches pour l'extrait n-butanol, on remarque aussi qu'une tache d'un R_f de 0,89 correspondant au quercétine présente au niveau des quatre extraits.

Le système **n-butanol/acide acétique/ Eau (BAW)** aux proportions **(40/50/10)** a permis la séparation 3 taches au niveau de l'extrait aqueux, et eau-méthanol et 4 taches pour l'extrait acétate d'éthyle et n-butanol. Aucun R_f des extraits ne correspond aux témoins.

5-Le pouvoir réducteur de *Citrullus colocynthis*

Les tableaux suivants représentent le pouvoir réducteur de la vitamine C utilisée comme contrôle positif (**tableau n°12**) et des extraits de la coloquinte, aqueux, eau-méthanol et acétate d'éthyle, n-butanol à différentes concentrations (**tableau n°13**).

Tableau n°12: Pourcentages de réduction du DPPH par la vitamine C après 30 min d'incubation

Concentrations de la vitamine C (mg/ml)	0.01	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2	0.3
% de réduction du DPPH	5.71	26.55	33.94	42.85	45.88	73.78	91.76

Tableau n°13: Pourcentages de réduction du DPPH par les extraits aqueux, eau- méthanol, acétate d'éthyle, n-butanol de fruit de la coloquinte

Les extraits	Concentrations final des extraits (µg/ml)						
	75	125	250	375	500	625	775
Aqueux	1,23	1,40	23,82	37,83	76,18	82,66	80,39
Eau- méthanol	17,13	22,85	36,24	47,66	54,00	81,83	86,29
Acétate d'éthyle	18,80	20,50	28,72	38,38	46,74	72,58	83,16
n-butanol	4,29	15,59	27,20	47,07	53,97	82,85	92,78

Le pourcentage de réduction du DPPH augmente avec l'augmentation des concentrations de la vitamine C et des extraits après 30 min d'incubation. On remarque qu'il y a une différence de résultats entre les trois extraits comparés avec ceux de la vitamine C.

On Remarque que les quatre extraits, à une concentration de 30 mg/ml, peuvent réduire respectivement 92,78 %, 86,29 %, 83,16 % et 80,39 % du DPPH après 30 min d'incubation, ces valeurs sont comparées avec ceux de l'acide ascorbique qui à une concentration de 0.3 mg/ml peut réduire 91.76 % du DPPH.

Les concentrations des extraits et de l'acide ascorbique qui inhibent 50% du DPPH déterminés graphiquement (**figures n° 12.13.14.15.16**) sont mentionnées dans le tableau suivant

Tableau n° 14 : IC₅₀ des extraits aqueux, eau- méthanol, acétate d'éthyle, n-butanol de fruit de la coloquinte et de la vitamine C

Les extraits	Vitamine C	Aqueux	Eau- méthanol	Acétate d'éthyle	n-butanol
IC ₅₀ (mg/ml)	0.11	7	8	11	7
Activité antiradicalaire 1/ IC ₅₀	9.09	0.142	0.125	0.090	0.142

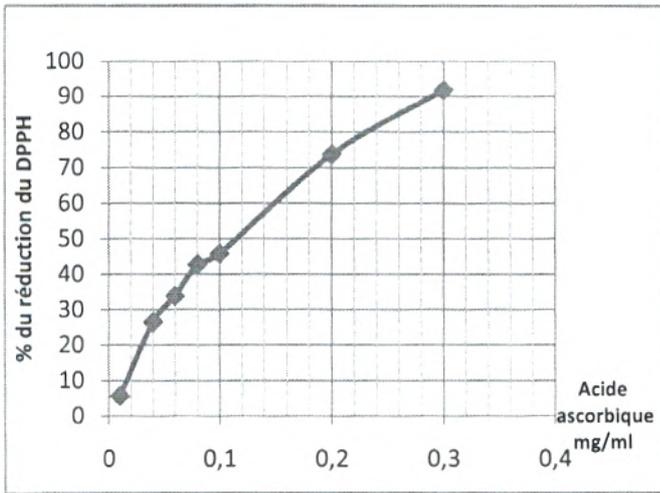


Figure n°12 : l'activité antiradicalaire d'acide ascorbique

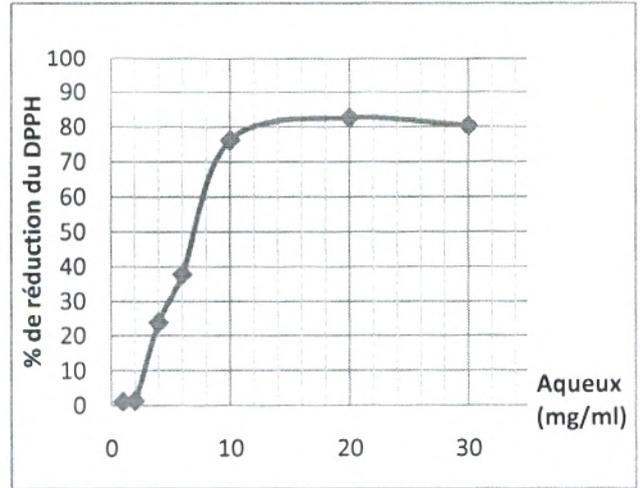


Figure n°13 : l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux

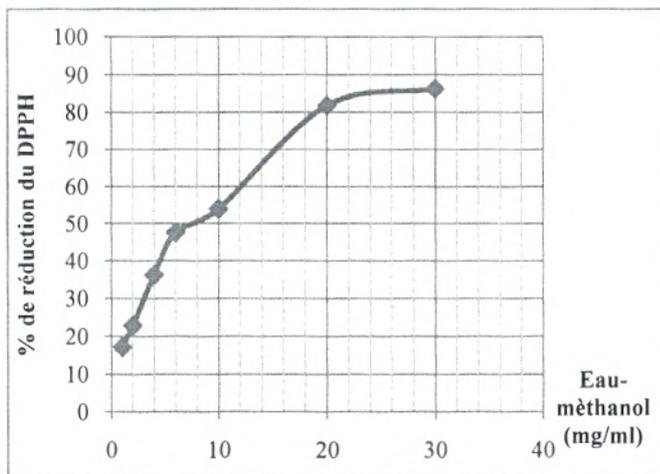


Figure n°14 : l'activité antiradicalaire l'extrait eau-méthanol

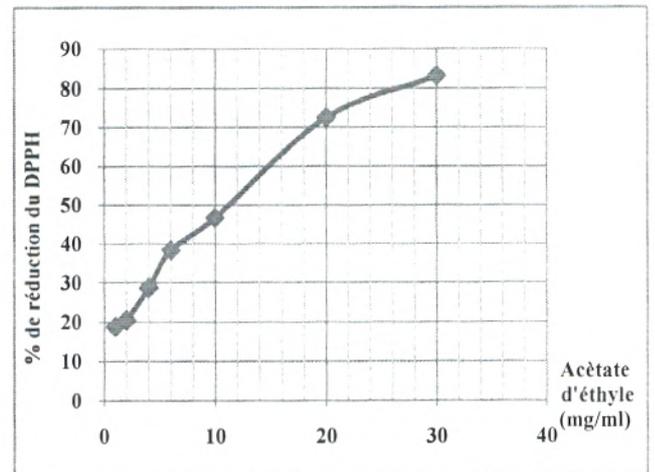


Figure n°15 : L'activité antiradicalaire l'extrait acétate d'éthyle

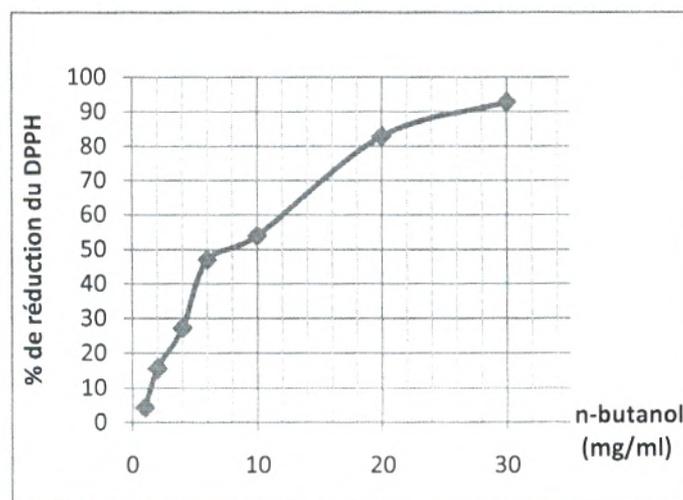


Figure n°16: l'activité antiradicalaire l'extrait n-butanol

Les IC_{50} déterminés graphiquement varient d'un extrait à l'autre, IC_{50} la plus faible 7 mg/ml pour l'extrait aqueux et n-butanol suivit par l'extrait eau-méthanol 8 mg/ml. IC_{50} la plus élevée 11 mg/ml pour l'extrait acétate d'éthyle et pour l'acide ascorbique représente IC_{50} 0.11 mg/ml. En comparant ces résultats avec la vitamine C on constate que l'extrait n-butanol et aqueux possèdent le plus fort pouvoir antioxydant car ils présentent IC_{50} la plus faible (7 mg/ml).



De plus, on suggère que le rendement d'extraction dépend de, la saison de récolte, la partie de la plante utilisée, la méthode d'extraction et les caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés, notamment leur polarité, il s'en suit que la solubilité des substances contenus dans la matière végétale dépend de ces propriétés.

L'examen phytochimique réalisé sur les quatre extraits nous a révélé l'absence totale des anthraquinones, saponosides triterpéniques, et les tanins galliques dans les quatre extraits. Seul l'extrait hexanique a révélé la présence de saponosides triterpéniques. De plus les saponosides stéroïdienne sont présent seulement dans l'extrait aqueux.

Par contre la présence des tanins catéchiques pour l'extrait n-butanol extraits eau - méthanol (EM) et acétate d'éthyle (AE), avec une absence total dans les extraits aqueux, hexanique. Concernent les alcaloïdes seulement pour Les extraits aqueux, n-butanol.

Alors que les flavonoïdes, coumarines sont présents dans tous les extraits. Les quinones libres sont absentes dans l'extrait aqueux et hexanique mais se trouvent en quantité remarquable dans les autres extraits. Les sucres réducteurs sont présents dans l'extrait aqueux, eau-méthanol et les autres extraits (n-butanol, et l'extrait acétate d'éthyle), avec absence totale pour l'extrait hexanique. Les tests phytochimiques révèlent aussi un test fortement positif des amines dans les extraits : aqueux, eau-méthanol, et n-butanol, et une absence totale dans l'extrait acétate d'éthyle et hexanique.

Certains tests réalisés sur l'extrait aqueux sont confirmés par l'étude de **Sediki (2009)** et **Benmehdi (2000)** ont révélé la présence des d'alcaloïdes, stéroïdes et flavonoïdes. Par ailleurs, nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Bentabet (2010)** qui a constaté la présence des tanins catéchiques, flavonoïdes et des coumarines, et l'absence des alcaloïdes, saponosides, sucres réducteurs et anthraquinones dans les extraits et n-butanol des graines de la coloquinte

Cependant on assiste à quelques différences entre nos résultats et ceux obtenus par **Djedidi et Sahi (2009)** qui ont révélé la présence des tannins, et saponosides dans chaque extrait, avec une présence d'alcaloïdes seulement dans l'extrait aqueux. Les amines sont présentes dans l'extrait aqueux et l'extrait eau/méthanol alors que les terpenoides sont positifs seulement dans l'extrait eau-méthanol; la présence des coumarines est notée dans l'extrait acétate d'éthyle.

Le fruit de la coloquinte renferme également des terpènes, **Serger et al (2005)**, ont isolé quatre tritérpènes tétracycliques : 2-o- β D glucopyranosylcucurbitacine I, J, K et L, à partir de fruit de la coloquinte

De plus deux alcaloïdes sont déterminés dans tous les organes de la plante ($C_{10}H_{15}NO_3$) et ($C_{16}H_{24}NO_3$), le troisième ($C_{20}H_{36}NO_6$) est présent au niveau des graines, pulpes, feuilles et racine [**Affifi et al, 1973**].

De même **Maatooq et al (1997)** selon une analyse chimique d'extrait eau-méthanol du fruit de la coloquinte (RMN, SM) ont identifié six flavonoïdes : 3`méthoxy-iso-orientine, isoorientine, 8-C-p-hydroxybenzoil-isovitexine, 6-C-p- hydroxybenzoylvitexine et 8-C-p hydroxylbenzoyl isovitexine 4-O-glycoside. **Delazar et al (2006)**, ont isolé et identifié trois flavonoides glycosylés à partir du fruit de la coloquinte. Nos résultats des amyloses chromatographiques ont révèlent la présence de flavonoïdes identifiés comme la catéchine, quercétine, myrcétine et des acides phénoliques comme l'acide gallique, ce résultat a été confirmé par les résultats obtenues par **Benhabib (2011)** qui démontrée la présence dans ces extraits de quercétine, myrcétine, catéchine, et l'acide gallique.

Pour cela on peut conclure qu'il n'ya pas une grande différence entre les composants chimiques des extraits de la graine et le fruits entier mis a part les alcaloïdes, les sucres réducteurs et les coumarines qui apparaissent dans tout les extraits de fruits entier et absent dans les autres extraits.

La présence de coumarines peut conférer à la plante des propriétés anticoagulantes et anti-inflammatoires. Les holosides peuvent avoir des effets hémostatiques, ce qui justifie leur utilisation traditionnelle sur des plaies, des blessures, des anémies et des bronchites [**Bruneton, 1993**].

Après avoir effectuer le screening phytochimique qualitatif, on s'est intéressé à faire le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux dans nos quatres extraits. Les résultats obtenus ont démontré la richesse de l'extrait n-butanol en polyphénols et flavonoïdes totaux avec un taux de 47.13 $\mu\text{g.Eq}$ acide gallique/mg d'extrait et 35.68 $\mu\text{g.Eq}$ catéchine/mg d'extrait suivie par l'extrait aqueux avec un taux 41.34 $\mu\text{g.Eq}$ acide gallique/mg d'extrait et 11.95 $\mu\text{g.Eq}$ catéchine/mg d'extrait, ces résultats confirment les résultats des tests phytochimiques, qui assurent la présence de tanins catéchiques et de flavonoïdes dans ces extraits en faible quantité. Pour ce qui est de l'extrait eau-méthanol, nos dosages ont révélé

avec un taux 34.59 µg.Eq acide gallique/mg d'extrait et 14.68 µg.Eq catéchine/mg d'extrait, Pour ce qui est de l'extrait acétate d'éthyle, nos dosages ont révélé la présence de 30.95 µg.Eq acide gallique/mg d'extrait et 21.42 µg.Eq catéchine/g d'extrait. Ces résultats et d'autres ceux de **Benhabib (2011)** restent inférieur par apport aux doses obtenus par **Bentabet (2010)** qui a révélé des teneurs de l'ordre de 335 mg.Eq catéchine/g de matière sèche et de 134 mg.Eq acide gallique/g de matière sèche. Ce résultat confirme la richesse du pulpe de la graine en polyphénols et flavonoïdes, qui sont facilement récupérable dans un mélange eau/méthanol.

L'étude de **Djedidi et Sahi (2009)** a montré des teneurs plus élevées en polyphénols et flavonoïdes totaux dans l'extrait aqueux qui sont de l'ordre de 0,33% Eq d'acide gallique et 0,25% Eq de kaemophérol, et des valeurs semblables dans l'extrait eau-méthanol , avec un taux de 0,40% Eq d'acide gallique et 0,11% Eq de kaemophérol. Ces résultats confirment la richesse de la graine de la coloquinte en polyphénols et flavonoïdes par apport à l'épicarpe de la graine.

Les résultats obtenus de **Djedidi et Sahi (2009)** se rapprochent des résultats de **Kumar et al (2008)** qui ont déterminé 0.74% eq d'acide gallique de et 0.13% eq de kaemophérol dans l'extrait méthanolique du fruit de la coloquinte. Ce résultat peut être expliqué par la sélectivité du solvant utilisé l'acétate d'éthyle qui permet d'extraire le maximum de composés phénoliques [**Bruneton, 1999**].

Autre étude effectuée sur les racines de la coloquinte obtenus par **Ben hsouna et al (2012)** ont déterminés 205 mg GAE/g dans l'extrait acétate d'éthyle, suivie par l'extrait méthanolique (85 mg GAE / g). Les contenus obtenus dans les extraits hexanique (12 mg GAE / g) et aqueux (35 mg GAE / g) sont beaucoup plus petits. Les flavonoïdes totaux varie de 20,3 à 48,5 mg QE / g, dans L'extraits acétate d'éthyle et aqueux.

De ce fait, on constate que les extraits acétate d'éthyle et le mélange eau- méthanol restent les meilleur solvants pour assurer une meilleure extraction de composés phénoliques.

Toute fois il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car plusieurs facteurs peuvent influencer sur la répartition qualitative et quantitative des composés phénoliques dans nos extraits, essentiellement les facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol...etc. [**Ebrahimi et al ; 2008**] ainsi que la période de récolte, le stade du développement et la partie de la plante utilisée [**Miliauskas et al ; 2004**], de plus, la méthode d'extraction et de quantification. La sélectivité du solvant utilisée peuvent

également influencer sur la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux [Lee et al ; 2003].

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires [Marc Fr et al, 2004.].

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocopherol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) [Rice-Evans, et al, 1995.]

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO^\bullet par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux ABTS $^\bullet$ (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH $^\bullet$ (diphenyl-picrylhydrazyle).[Sharma Om et al, 2009].

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH $^\bullet$ est recommandé pour des composés contenant SH^\bullet , NH^\bullet et OH^\bullet groupes. Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles en provenance de thé vert, des jus de fruits et de raisins, pépins et pulpes, très riches en composés phénoliques. [Yi-Zhong Cai et al 2006.].

Pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH $^\bullet$ ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH $^\bullet$ [Cristina Popovici et al, 2009]

Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité antiradicalaire en pourcentage % RSA (Radical Scavenger Activity), ou l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant. Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène). [Cristina Popovici et al, 2009].

L'indice relative % RSA montre seulement la capacité de l'échantillon, à une concentration fixée, de réduire ou non les radicaux et dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène à l'augmentation de ces indices relatifs [Bensouana et al 2012].

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective IC₅₀ (ou l'inverse 1/IC₅₀) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH• dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC₅₀ est petite. L'indice CE₅₀ montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• avec 50%. [Cristina Popovici et al, 2009].

Concernant l'activité antiradicalaire de nos extraits : aqueux, eau méthanol, acétate d'éthyle et n-butanol de fruit de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) solubilisés dans le méthanol, on a constaté que les autres extraits, à une concentration de 30 mg/ml, peuvent réduire respectivement 80.39%, 86.29%, 83.16% et 92.78% du DPPH, après 30 min d'incubation, ces valeurs sont comparées avec ceux de l'acide ascorbique qui à une concentration de 0.3 mg/ml peut réduire 91.76% du DPPH.

Les IC₅₀ déterminés graphiquement varient d'un extrait à l'autre: 7 mg/ml pour les extraits aqueux et n-butanol, 8 mg/ml et 11 mg/ml pour les extraits eau-méthanol, acétate d'éthyle, alors que l'acide ascorbique le IC₅₀ est de 0.11 mg/ml. Selon ces résultats on constate que les extraits n-butanol et aqueux possèdent le pouvoir antioxydant le plus fort par rapport aux autres extraits suivi par l'extrait acétate d'éthyle et eau-méthanol. Ces variations de l'activité antioxydante peuvent être liées principalement aux taux des polyphénols et flavonoïdes car l'extrait n-butanol renferme 47.13 µg.Eq acide gallique/mg d'extrait suivi par l'extrait aqueux avec un taux 41.34 µg.Eq acide gallique/mg d'extrait par rapport à l'extrait

eau-méthanol 34.59 µg.Eq acide gallique/mg d'extrait, acétate d'éthyle 30.95 µg.Eq acide gallique/mg d'extrait,

Par ailleurs, nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Boutchiche (2011)** qui a démontré qu'à faible dose de l'ordre de 1 à 3 mg/ml aucun effets antioxydant n'a été observer pour aucun extraits, par contre à forte concentration 30 mg/ml, ils peuvent réduire respectivement 80.84%, 88.86%, 91.89% et 90.58% du DPPH, après 30 min d'incubation. Ces valeurs sont comparées avec ceux de l'acide ascorbique qui à une concentration de 6.25 µg/ml peut réduire 93.64% du DPPH. Les IC₅₀ déterminés graphiquement varient d'un extrait à l'autre, IC₅₀ la plus élevée 469.66 µg/ml pour l'extrait aqueux suivit par l'extrait eau-méthanol 207.69 µg/ml et n-butanol 188.87 µg/ml. IC₅₀ la plus faible 183.77 µg/ml pour l'extrait acétate d'éthyle et pour l'acide ascorbique reprèsent IC₅₀ 1.09 µg/ml.

D'autres résultats de **Djedidi et Sahi (2009)** Concernant l'activité antioxydante des extraits : acétate d'éthyle, eau-méthanol et aqueux des graines de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) solubilisés dans le méthanol, ont démontré que les trois extraits, à une concentration de 2 mg/ml, peuvent réduire respectivement 88.73%, 66.19% et 74.46% du DPPH, après 30 min d'incubation, ces valeurs sont comparées avec ceux de l'acide ascorbique qui à une concentration de 0.04 mg/ml peut réduire 89.5% du DPPH. Les IC₅₀ déterminés graphiquement varient d'un extrait à l'autre: 0.33mg/ml pour l'extrait acétate d'éthyle, 0.5mg/ml pour l'extrait eau/méthanol, 0.6 mg/ml pour l'extrait aqueux et 0.015mg/ml pour le contrôle qui est l'acide ascorbique. Selon ces résultats on constate que l'extrait acétate d'éthyle possède le pouvoir antioxydant le plus fort par rapport aux autres extraits.

De même **Kumar et al (2008)**, ont démontré qu'une concentration de 2.5 mg/ml de l'extrait méthanolique de l'épicarpe du fruit de *Citrullus colocynthis* peut réduire 88% du DPPH après 30 min d'incubation.

De plus **Ben hsouna et al (2012)** ont déterminé dans les extraits de la racine de *citrullus colocynthis* une puissante activité antiradicalaire pour l'extrait aqueux IC₅₀ = 1,85µg / ml, suivie par l'acétate d'éthyle IC₅₀ = 3,80 µg/ml et extrait méthanolique IC₅₀ = 19,5 µg / ml, contre l'acide ascorbique IC₅₀ = 3,1 µg / ml.

Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont révélé que les extraits de fruit de *citrullus colocynthis* présentent un pouvoir réducteur du radical libre DPPH intéressant, dont le pourcentage de réduction du DPPH est dose dépendant ; plus on augmente la concentration de l'extrait plus le pourcentage de réduction est important. Cette activité antiradicalaire est probablement liée à la présence de polyphénols et flavonoïdes dans les extraits de la coloquinte. Le dosage a révélé la richesse de ces extraits en ces composés essentiellement acide gallique, quercétine, myrcétine et catéchine.

Ce travail est préliminaire, pour cela, il serait intéressant de réaliser d'éventuelles études en utilisant des techniques de pointes pour l'identification des structures de nos composés tel que : la chromatographie sur colonne, HPLC, CPG, spectrométrie de masse.

De plus pour l'activité antiradicalaire il serait intéressant de tester *in vitro* d'autres méthodes pour l'activité antiradicalaire en utilisant d'autres méthodes, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) et FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter). Et *in vivo* pour tester l'activité antioxydante des extraits de la coloquinte sur les perturbations de stress oxydatif.

Références

1. **Abdel-Aal, ESM. and Attia, RS. 1993.** Characterization of Black cumin (*Nigella sativa*) seeds 1-Chemical composition and lipids. Alexandria Sci Exch. 14: 467-482.
2. **Abuja P.M and Albertini R. (2001).** Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clinica Chimica Acta. 306: 1-17.
3. **Afifi,M.D;Sayed,M.S; Balbaa,S.I. 1973.** Nitrogenous bases of different organ of *Citrullus colocynthis*. Planta Medica. 24 (3): 260-265.
4. **Afolabi C, Akinmoladun E, Ibukun O, Emmanuel A, Obuotor E. M. and Farombi E.O.2007.** Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimu*. Scientific Research and Essay. 2 (5): 163-166.
5. **Ahamet S. 2003.** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca*L. (*Balanitaceae*). Thèse de doctorat en Pharmacie, Bamako.
6. **Akroum S. 2006.** Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba* L. Mémoire de magister en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri de Constantine.
7. **Akroum S. 2011.** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de doctorat en physico-Toxicologie. Université Mentouri de Constantine.
8. **Aouissa I. W. R. 2002.** Etude des activités biologiques et de la toxicité aigüe de l'extrait aqueux des feuilles de *Mangifera indica* L (*Anacardiaceae*). Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako.
9. **Ardestani A ; Yazdanparast R ; 2007.** Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxydation, Food and chemical toxicology ; 45, 2402-2411.

10. **Asghar M. N.Khan U and Bano N. 2011.** *In vitro* antioxidant and radical-scavenging capacities of *Citrullus colocynthis* (L) and *Artemisia absinthium* extracts using promethazine hydrochloride radical cation and contemporary assays. Food science and technology international.17(5):481-494.
11. **Asha Devi S, Ganjewala D. 2012.** Antioxidant activities of methanolic extracts of Sweet-Flag *Acorus calamus* leaves and rhizomes. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants.17: 1-11.
12. **Baskin S.I and Salem H. 1994.** Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. Academic press Inc. 363 : 25-62.
13. **Belloum. Z. 2007.** Etude phytochimique des plantes médicinales Algériennes, cas de l'espèce *Inula crithmoides* (L.). Thèse de Magister en chimie organique. Université Mentouri- Constantine.
14. **Ben hsouna anis, et Alayed Abdullah Sulaimain , 2012.** Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis and *in vitro* evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) roots to control pathogen and spoilage bacteria. African Journal of Biotechnology. 11(47). 10753-10760
15. **Benamor B. 2008.** Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par Détente Instantanée Contrôlée (DIC). Thèse de doctorat en Génie des procédés Industriels. Université de la Rochelle.
16. **Bènard C. 2009.** Etude de l'impact de la nutrition azote et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Université de Nancy INPL.
17. **Benhabib C.F, 2011.** Etude phytochimique de quelques extraits de graines de la coloquinte "*Citrullus colocynthis*". Mémoire de Master en Biochimie appliquée. Université de Tlemcen.

18. **Benmehdi, H ; 2000.** Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Thèse de magistère. Chimie organique appliquée. Université de Tlemcen.
19. **Bennekom W.P., Van Der Vijgh W.J.F., Bast A., 1996.** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. Biol. Med. 20 (3): 331- 342.
20. **Bentabet N ; 2010.** Contribution à l'étude de l'effet d'extrait acétate d'éthyle des graines de "*Citrullus colocynthis*" sur l'hyperglycémie des rats mâles "Wistar" rendus diabétiques par la streptozotocine. Mémoire de Master en Biochimie appliquée. Université de Tlemcen.
21. **Bergoin M. 2005.** Application du concept de raffinage végétal au safran du quercy (*Crocus sativus*) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants. Thèse de Doctorat en polytechnique. Toulouse.
22. **Bhat S. V; Nagasampagi B. A; Sivakumar M. 2005.** Chemistry of Natural Products. Narosa, New Delhi, India. Ch. 4, 237.
23. **Bnouham M ; Ziyat ; Mekhfi H ; Tahri A ; Lessayer H ; 2006.** Medicinal plants with potential antidiabetic activity a review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *Int Journal .Diabetes and metabolism*. 10: 33-50.
24. **Bodas R, Lopez S, Fernandez M, Garcia-Gonzalez R, Rodriguez A.B, Wallace R.J. et al. 2008.** *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 145 : 248–249.
25. **Boizot N et Charpentier J-P ; 2006** .Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés Phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des Techniques de l'Inra*: 79-82.

26. **Bonfili L., Cecarini V., Amici M., Cuccioloni M., Angeletti M., Keller J.N., Eleuteri A.M. 2008.** Natural polyphenols as proteasome modulators and their role as anti-cancer compounds. FEBS. 275: 5512-5526.
27. **Bors W.; Heller W. ; Michel C., Saran M. 1990.** Flavonoids as antioxidant: determination of radical-scavenging efficiencies. Methods Enzymol. 186 : 343-355.
28. **Bouhadjera K. 2005.** Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Thèse de doctorat en Chimie Organique Appliquée. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
29. **Boumaza A, 2009.** Effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation. Mémoire de Magister en Toxicologie cellulaire et moléculaire. Université Mentouri-Constantine.
30. **Boutchiche H.2011.** Mesure de l'activité antioxydante de quelque extrait de graines de *Citrullus colocynthis*. Mémoire de Master en Biochimie appliquée. Université de Tlemcen.
31. **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel- Wissenschaft and Technology, 28, 25-30.
32. **Bravo L. 1998.** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews. 56 (11): 317-333.
33. **Bruneton J ; 1993.** Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. TEC. DOC. PARIS.
34. **Bruneton J ; 1999 .** Pharmacognosie-phytochimie-plantes médicinales. Technique et documentation. Lavoisier 3^{ème} édition.
35. **Buchanan B; GruissemW ; Jones J. 2000 .** American Society of Plant Physiologists Natural Products (Secondary Metabolites) Chapter 24: Biochemistry & Molecular Biology of plants.

36. **Buddle B.M, Denis M, Attwood G.T, Alterman E, Janssen P.H, Rominus R.S. et al, 2011.** Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*. 188(1): 11-17.
37. **Burta, O., Tirlea, F., Burta, O.L., Qadri, S.M. 2008.**Phytotherapy in cardiovascular diseases: From ethnomedicine to evidence based medicine. *Journal of Biological Sciences* 8 (2): 242-247.
38. **Carter, I ; 1997.** Plantes protectrices pastèque sauvage. *Revue Pas à Pas Tear Fund (Angleterre)*. 32: 9.
39. **Cazarolli L.H, Zanatta L, Alberton E.H, Figueiredo M.S, Folador P, Damazio R.G, Pizzolatti M.G, Silva F.R. 2008.** Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini rev. med. Chem.* 8: 1429-1440.
40. **Chebil L. 2006.** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de doctorat en procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Institut national polytechnique de Lorraine.
41. **Colette E. 2003.** Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat en Pharmacie Bamako.
42. **Cristina Popovici , Ilonka Saykova , Bartek Tylkowski, 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 4, 25-39
43. **Darwish S.M; Belbaa S.T; Afifi S.S; 1974.**Theglycosidal content of the different organes of *Citrullus colocynthis*. *Planta Medica*: 26(3) :293-298.
44. **Delazar A ; Gibbons S ; Kosari A.R ; Nazemiyeh H ; Modarressi M ; Nahar L ; Satyajit D ; 2006.** Flavone C-Glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *DRAU*. 14(3): 109-114.

45. **Dewick, P. M. 2001.** Medicinal Natural Products. Wiley. Ch. 6,291.
46. **Diabate D. M. 2006.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques d'une recette traditionnelle utilisée dans le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate au Mali. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako.
47. **Djedidi R et Sahi R ; 2009.** Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des extraits de graines de "*Citrullus colocynthis*". DES en Biochimie. Université de Tlemcen.
48. **Ducke J.A ; 1983.** *Citrullus colocynthis* (L.) Schard. Handbook of Energy Crops
49. **Ducke S. 2002.** Phytochemical and ethnobotanical databases. USDA-ARS-NGRL. Beltsville Agricultural Research Center. EDT.
50. **Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G., Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj , 2008.** Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdzakova A (ed). P : 19-43.
51. **Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., et Yousefzadi M. 2008.** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. Food chemistry., 110 : 927-931.
52. **Eddouks M ; Ouahidi M.L ; Farid O ; Moufid A ; Khalidi A ; Lemhadri A ; 2007.** L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. Phytothérapie. 5 :194-203.
53. **El-Sayed S. A, Bazaid S. A, Shohayeb M, El-Sayed M. M and. El-Wakil E. A. 2012.** Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. growing in Taif, Saudi Arabia. European Journal of Medicinal Plants 2(2): 93-112.
54. **Farrukh A, Iqbal A, Zafar M. 2006.** Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. Turk J Biol 30: 177-183.

55. **Garcia-Gonzalez R, Lopez S, Fernandez M, Bodas R, Gonzalez J.S. 2008.** Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 147 : 38-39.
56. **Gerald N T, Lunga P K, Hippolyte K W, Jules-Roger K, Gerard V, Geraldine G, Haruhisa K and Yoshiteru O. 2011.** Antimicrobial and antioxidant properties of methanol extract, fractions and compounds from the stem bark of *Entada abyssinica* *Stend ex A. Satabie*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.57: 11
57. **Girotti –Chanu C. 2006.** Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l’effet de la cirsimarine , flavone extraite de mirotea de bilis. Thèse de Doctorat en biochimie. Institut national des sciences appliquées de Lyon.
58. **Govindarajan R,RastogiS, Vijayakumar M, Shirwaikar A, Rawat A K S, Mehrotra S,and Pushpangadan P. 2003.**Studies on the Antioxidant Activities of *Desmodium gangeticum*. *Biol. Pharm. Bull.* 26(10): 1424—1427.
59. **Gravot A. 2009.**Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Support de cours sur le métabolisme secondaire d’Antoine Gravot, Equipe pédagogique Physiologie Végétale .Université de Rennes.
60. **Guignard J.L. 2005.** Biochimie végétale. Paris: Dunod. 2^{ème} édition.
61. **Hadj Salem J. 2009.** Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria Retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat en procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Institut national polytechnique de Lorraine.
62. **Hale A.L. 2003.** Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating russet norkotah strains using aflep and microsatellite marker analysis. Office of graduate studies of texas A&M University. Genetics, 260.

63. **Halliwell B et Whiteman M. 2004.** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *British Journal of pharmacology*. 142: 31-2.
64. **Harborne J.B; Williams C.A. 2000.** Advances in flavonoid research science 1992. *Phytochemistry*. 55 :481-504.
65. **Harborne, J. B., and Herbert B. 1995.** *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Bristol: Taylor & Francis.
66. **Heller W, Forkmann G.** The flavonoids. *Advances in research science* 1986. In Harborne JB. *Secondary Plant Products*. *Encyclopedia of plant physiology*. Ed. Chapman & Hall, London, 1993.
67. **Hesse, M. 2002.** *Alkaloids – Nature’s Curse or Blessing ?*. Wiley VCH, Zürich.
68. **Igor Passi L B. 2002.** Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (*Rutaceae*). Thèse de doctorat en Pharmacie. Bamako.
69. **Iserin P ; Masson M ; Restellini J. P ; Ybert E ; De Laage de Meux A ; Moulard F ; Zha E ; De la Roque R ; De la Roque O ; Vican P ; Deelesalle –Féat T ; Biaujeaud; Ringuet J ; Bloth J et Botrel A 2001.** *Larousse des plantes medicinales : identification, Préparation, soins*. Ed Larousse. p10-12.
70. **Joël P. ; Karine B. ; Karine C. ; Jean-Olivier D. (2002).** Nutrition et stress antioxydant. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. 16 (4) : 233-239.
71. **Kandra L ; Gyenant G ; Zajacz A ; Batta G. 2004.** Inhibitory effects of tannins on human salivary α -amylase. *Biochemical Research Communications*. 319: 1265-1271.
72. **Kansole Michelline Marie Regina, 2009.** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologique de quelques Lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppositavahl* et *Orthosiphon pallidusroyle ex bent*. (D.E.A) en Biochimie et Microbiologie. Université Ouagadougou.

73. **Kaufman PB, Cseke LJ, Warber S, Duke JA, Brielmann HL.1999.** Natural Products from Plants. (CRC Press, Boca Raton, FL).
74. **Kebieche M. 2009.**Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de Doctorat en Biochimie. Université Mentouri-Constantine.
75. **Khenaka k. 2011.** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovine. Mémoire de magister en Biotechnologie Microbiennes. Université Mentouri Constantine.
76. **Krief S.2003.** Métabolites secondaires des plantes et composition animal : surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda, activités biologiques et études chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat en Ecologie et Chimie des Substances Naturelles. Muséum National d'histoire naturelle.
77. **Kumar S ; Kumar D ; Manjusha ; Saroha K. ; Singh N ; Vashishta B ; 2008.** Antioxydant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* schrad metabolic fruit extract. Actapharm ; 58 :215-220.
78. **Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P.J. etHault, J.R.S. 1989.** Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin gossypol and myricetin. Biochem. Pharmacol. 38, 2859-2865.
79. **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., et Lee C.Y. 2003.** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. Food chemistry, 51 : 7292-7295.
80. **Louis S.2004.** Diversité structurale et activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses. Thèse de doctorat, institut national des sciences appliquées de Lyon.
81. **Macheix J.J ; Fleuriet A ; Jay-Allemand C. 2005.** Les composées phénoliques des végétaux. Presse polytechnique et universitaire romande.

82. **Madi Aicha.2010.** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (*Thym et Sauge*) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de magister en biotechnologie végétal. Université Mentouri Constantine
83. **Maisuthisakul P, Suttajit M and Pongsawatmanit R (2007).** Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem.*, 100: 1409-1418.
84. **Mann, J. ; Davidson, R. S. ; Hobbs, J. B. ; Banthorpe, D. V. ; Harborne, J. B. 1994.** *Natural Products.* Longman. Ch. 7, 389.
85. **Marc Fr., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C. et all. 2004.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences* 20(4), 458-463.
86. **Martin S ; Andriantsitohaina R. 2002.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie.* 51 (6) : 304-315.
87. **Matooq G.T ; El-Sharkawy S.H ; Afifi M.S ; Rosazza P.N ; 1997.** C-p-hydroxybenzoylglyco-flavones from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry* ; 11(1) :187-190.
88. **MeradChiali R. 1973 ;** Contribution à la Connaissance de la Pharmacopée Traditionnelle Algérienne ; Thèse de Doctorat en Pharmacie ; Institut Des Sciences Médicales.
89. **Meziti A. 2009.** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L etude *in vitro* et *in vivo*. Mémoire en magister en biochimie appliquée. Université El-haj Lakhdar Batna.
90. **Miliauskas. G., Venskutonis P.R., et Van Beek T.A. 2004.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry.* 85 : 231-237.

91. **Mohammedi Z. 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère en produits naturels, activités biologiques et synthèse. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen.
92. **Moshonas M.G., Shaw P.E 1997.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 3545-3549.
93. **Moudir N.2004.** Les polyphénols de la propolis Algérienne. Mémoire de magister en Chimie. Université Mohamed Boudiaf M'sila.
94. **Nkhili E. 2009.** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments. Université D'Avignon Co-tutelle Université Cadi Ayyad.
95. **Nmila R ; Gross R ; Rachid H ; Roye M ; Menteghetti M ; Petit P ; Tijan M ; Ribes G ; Sauvaire Y;2000.** Insulino tropic effect of *Citrullus colocynthis* fruits extracts. PlantaMédica. 66: 418-423.
96. **OMS. 2000 OMS (Organisation Mondiale de la Santé); 2000.** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relative à la médecine traditionnelle. 1:1-79.
97. **Oswald M. 2006.** Déterminisme génétique de la biosynthèse des terpénols aromatiques chez la vigne. Thèse de doctorat en science du vivant aspect moléculaire de la biologie. Université Louis Pasteur Strasbourg.
98. **Ozawa T; Lilley T; Haslem E. 1987.** Polyphenols interactions. Biosci Biotech, Bioch; 60: 2023 -2027.
99. **Ozipek, M., Donmez, A. A., Calis, I., Brun, R., Ruedi, P. et Tasdemir, D. 2005.** Leishmanicidal cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus oleifolius*. Phytochemistry, 66 (10): 1168-1173.

100. **Peronny S. 2005.** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (*Lemur Catta*).Thèse de Doctorat en Eco-Ethologie. Muséum national d'histoire naturelle .Discipline
101. **Perret C. 2001.** Analysis de tannins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par *Btrytis cinerea* .Thèse de Doctorat .Université de Neuchatel.
102. **Puppo, A. 1992.** Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry*. 31: 85-88.
103. **Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B, 1995.** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
104. **Richter, G. 1993.** Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Presses polytechniques et universitaires romandes, Lansanne CH-1015.
105. **Roberts M.F. and Wink M. 1999.** Alkaloids - Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. Book Reviews. *Phytochemistry*, 52, 1177 – 1180
106. **Saleh A, Mubarak A, Khadija A and Abdulkhader H.2007.** Screening of antioxidant and radical scavenging activities of some omani medicinal plants. *Journal For Science*, 12 (1): 1-6
107. **Salunkh D. K; Jadhaw S.J; Kaddam S.S; Chavan J.K. 1982.** Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *crit, Rev Food Sci, Nutr.* 17(3): 277-305.
108. **Salvayre A.N et Salvayre R. 2005.** Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. *OCL.* 12 (5): 433-438.
109. **Samarth R.M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A.; 2008.** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract, *Food Chemistry*, 106, 868-873.

110. **Sanchez-Moreno ; 1998** A procedure to measure the antiradical efficiency polyphenols. J. Sci. Food Agric.,76, 270-276
111. **Sarni-Manchado P et Cheynier V. 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier Tec & Doc. p 398.
112. **Saulet S., lecoupeau J-P.,Vercauteren J. 2001.** Implication chimique et biologique de la présence de polyphenols dans le cacao. Deuxième journée scientifique de l' FR de sciences pharmaceutiques. Pharm. Bordeaux. 140:127-166.
113. **Seger C.H; Strum S; Mair M.E; Ellmerer E.P; Stuppner H; andCNMR H; 2005.** Signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L) Scharder and *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae). Magn. Reson. CHEM; 43: 489-491.
114. **Sharma Om P., Bhat T.K. 2009.** DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry, 113 (4), 1202.
115. **Sincich F; 2002.** Bedouin traditional medicine in the syrian steppe. Rome. Fao: 114-115.
116. **Singleton V.L., Rossi J.A.; 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-153.
117. **Soldermann N.2002.** Etude et développement du processus tandem réaction de dielsalder/ réarrangement de Ireland-Claisen : Aplication à la synthèse de la juvabione. Thèse de doctorat. Université de Neuchâtel.
118. **Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J. 2004.** Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology. 94: 219-243.
119. **Sutour Sylvain. 2011.** Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de méthodes de corse et de kumquats. Thèse de doctorat en Chimie organique et Analytique. Université de Corse Pascal Poli.

120. **Terra X., Valls J., Vitrac X., Mérrillon J.-M., Arola L., Ardèvol A., Bladé C., Fernández- Larrea J., Pujadas G., Salvadó J., Blay M. 2007.** Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFκB signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4357-4365.
121. **Thirunavukkarasu P, Ramkumar L, Ramanathan T and Silambarasan G. 2010.** Antioxidant activity of selected coastal medicinal plants. *World Journal of Fish and Marine sciences* 2(2): 134-137
122. **Urquiaga I. et Leighton F. 2000.** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.* 33(2): 55-64.
123. **Ursini F, Tubaro F, Rong J and Sevanian A. 1999.** Optimization of nutrition: Polyphenols and vascular protection. *Nutrition reviews.* 57 (8): 241-249.
124. **van Acker S.A.B.E.; van den Berg D.-J.; Tromp M.N.J.L.; Griffioen D.H.; van Bennekom W.P.; van der Vijgh W.J.F.; Bast A. 1996.** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine.* 20 (3): 331-342(12)
125. **Vermerius W ; Nicholson R ; 2006.** Isolation and identification of Phenolic Compounds, *Phenolic Compound biochemistry*, Published by Springer, Dordrecht, 35-62-151-191.
126. **Wink M. 2003.** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* 64: 3-5
127. **Yang C.S., Sang S., Lambert J.D., Lee M.-J. 2008.** Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 139-151.
128. **Yaniv Z ; shabelsky E ; Schafferman D ; 1999.** Colocynth: Potential arid land oil seed from an ancient cucurbit .*Press. Alexandeia.* 257-261.

129. **Yen G.C et Duh.P.D ; 1994.** Scavenging effect of methanolic extract of peanut hulls on free radical and and active oxygen species.J. Agri. Food Tech., vol42, pp 629-632.
130. **Yen G.C., Chen H.Y., Peng H.H. 1997.** Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. J. Agr. Food Chem. 45: 30-34.
131. **Yi-Zhong Cai, Mei Sun, Jie Xing, Qiong Luo, Harold Corke 2006.** Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Sciences, 78(25), 2872-2888.
132. **Yochum L., Kushi L.H., Meyer K., Folsom A.R. 1999.** Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. Am. J. Epidemiol. 149: 943-949.
133. **Zeghad N, 2009.** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de magister en biotechnologie végétal. Université Mentouri Constantine.
134. **Zheng, L., Zheng, J., Zhao, Y., Wang, B., Wu, L. et Liang, H. 2006.** Anti-tumor saponins from *Albizia julibrissin*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.16: 2765-2768.
135. **Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W; 1999.** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64:555-9.