République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de recherche

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

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

DOMAINE : SNV

FILIERE : Sciences biologiques
SPECIALITE : « Biochimie Appliquée »

Présenté par :

Mme BENZERDJEB Meriem Sanaa

M^{lle} BENSAID Kawther

Evaluation de l'activité antioxydante et inhibitrice de l'α-amylase de quelques extraits des graines de citrouille « *Cucurbita pepo* »

Soutenu, le 23 juin 2026 Devant le jury :

Nom et Prénom	Grade	Qualité	Université
Dr. MEDJDOUB H.	MCA	Présidente	Université de Tlemcen
Dr. ADIDA H.	MCA	Examinatrice	Université de Tlemcen
Dr. BELKACEM N.	MCA	Promotrice	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2025-2026



Remerciement

Nous remercions le Dieu, notre créateur de nous avoir donné la forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail

Tout d'abord nous tenons surtout à adresser les plus vifs remerciements à **Mme Belkacem N.,** Maître de conférences A au département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen- quelle nous fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Nous tenons à remercier profondément **Mme Medjdoub H.,** Maître de Conférences A au département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen- d'avoir accepté de présider le jury.

On exprime notre profonde gratitude et remerciements à **Mme Adida H**., Maître de conférences A au département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen- d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Un grand merci est adressé à tous les membres du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimiques, Synthèse et Activité biologique » de l'Université de Tlemcen pour leur gentillesse et leur aide.

Enfin, ont remercient gracieusement toute personne qui a contribuée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicaces

Tout d'abord, je remercie Allah, le bon Dieu tout puissant, de m'avoir Donné la force nécessaire pour survivre et l'audace indispensable pour surmonter toutes les difficultés.

Je dédie ce modeste travail, fruit de plusieurs années d'études, à toutes les personnes qui ont illuminé mon chemin :

À mon cher père, à celui qui a été mon soutien et mon secours, à celui qui a planté en moi l'amour de la connaissance et du travail, devenant ainsi l'emblème de ma réussite, la couronne qui orne ma tête et m'accompagne dans mon ascension vers les sommets. À celui dont j'ai appris la patience et la lutte, à celui qui me fait lever la tête avec fierté et honneur.

À ma bien-aimée, ma mère chérie, à celle que Dieu a placé le paradis sous ses pieds, à celle qui m'a inondé de l'abondance de sa tendresse, à celle qui a brûlé pour éclairer mon chemin, à celle qui a connu la faim pour me rassasier, a veillé pendant que je dormais, s'est fatiguée pour que je me repose, a pleuré pour que je sourie, et m'a abreuvé de la source de sa douceur et de sa sincérité. À celle qui m'a élevé petit et m'a conseillé grand, la pupille de mes yeux et le réconfort de mon cœur. Que Dieu prolonge sa vie et la place comme une tente au-dessus de ma tête.

A mon cher mari Mustafa Lhebri merci Pour ton soutien indéfectible, ta patience infinie et tes encouragements constants tout au long de ce parcours universitaire. Ta présence à mes côtés a été ma plus grande source de motivation. Que ce travail soit le reflet de notre complicité et de notre avenir.

Mes chères sœurs et frère : Sara et Yasmine et Ibrahim pour leurs encouragements,

leur appui permanent et leur soutien moral.

.

Mdm BENZERDJEB Meriem Sanaa.



Dédicaces

À Dieu le Tout-Puissant, Qui m'a donné la force, la patience et le courage de mener à bien ce travail. Vos bénédictions m'ont guidé tout au long de mon parcours universitaire.

À mes chers parents, Aucune dédicace ne saurait exprimer mon amour et ma gratitude pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation. Merci pour votre soutien inconditionnel, vos prières quotidiennes et votre confiance en mes capacités. Que ce travail soit le reflet de votre dévouement.

À ma précieuse famille, Frères, sœurs et proches, pour votre présence chaleureuse, vos encouragements constants et l'amour que vous m'entourez au quotidien.

Mlle BENSAID Kawther

الملخص

تتمحور هذه الدّراسة حول تقييم التركيب الكميائي الكمّي و النوعي لبذور اليقطين و كذا دراسة الفعالية المضادة للأكسدة بطريقتين: إختبار تثبيط الجذر الحر (DPPH) وإختبار القدرة المرجعة للحديد (FRAP) إضافة إلى تقييم فعالية تثبيط إنزيم الألفا–أميلاز لعدة مستخلصات (مائى, ماء/إيثانول , ماء/أسيتون).

أظهر التحليل الكّمي أن المستخلص الهيدروأسيتوني هو الأغنى بالبوليفينولات الكلية (20,91 ± 1,17 ملغ مكافئ حمض الغاليك في الغرام من المستخلص) والفلافونويدات (18,57 ± 1,39 ملغ مكافئ كاتيشين في الغرام من المستخلص) ، في حين تميز المستخلص المائي بمحتوى عالٍ جداً من العفص المكثف (172,44 ± 2,24 ملغ مكافئ كاتيشين في الغرام من المستخلص). ومن جهة أخرى، أظهر النشاط المضاد للأكسدة، الذي تم تقييمه بواسطة إختبار تثبيط الجذر الحر DPPH ، أن المستخلص المائي يمتلك أفضل قدرة تثبيط بتركيز نصفي قدره 49,5 ملغ/مل، متفوقاً بذلك على المستخلصين الهيدروأسيتوني (63,06 ملغ/مل) والهيدروإيثانولي (119,3 ملغ/مل)، رغم بقائه أقل من الشاهد الإيجابي حمض الأسكوربيك (0.106 ملغ/مل). وفي السّياق ذاته، أكّد إختبار إرجاع الحديد القدرة العالية للمستخلص الهيدروإيثانولي حيث سجل الفعالية الأعلى بتركيز نصفي قدره 42,67 ملغ/مل. وأخيراً، كشف تقييم تثبيط إنزيم الألفا أميلاز عن فعالية بذور اليقطين، حيث حقق المستخلص الهيدروإيثانولي نسبة تثبيط بلغت 68% عند تركيز 54 ملغ/مل، بينما أظهر المستخلص الهيدروأسيتوني كفاءة أقل بوصوله إلى نسبة تثبيط قدرها 16% عند تركيز 52 ملغ/مل.

تثبت هذه النتائج أهمية بذور اليقطين كمصدر طبيعي لاستخلاص الجزيئات الحيوية الفعالة ذات الخصائص المضادة للأكسدة والنشاط المثبط للألفا أميلاز.

<u>الكلمات المفتاحية</u>: *Cucurbita pepo* ، بذور القرع، متعددات الفينول، النشاط المضاد للأكسدة، إختبار DPPH ، إختبار FRAP ، تثبيط إنزيم ألفا–أميلاز.

Résumé

Ce travail a porté sur l'évaluation phytochimiques qualitative et quantitative des graines de courge (*Cucurbita pepo*) ainsi que sur l'étude des potentiels antioxydant par deux méthodes (DPPH et FRAP) et inhibiteur de l'α-amylase *in vitro* de différents extraits (aqueux, hydroéthanolique et hydroacétonique). L'analyse quantitative révèle que l'extrait hydroacétonique est le plus riche en polyphénols totaux (18,57 ±1,39 mgEAG/gE) et en flavonoïdes (20,91 ± 1,17 mgEQC/gE), tandis que l'extrait aqueux se distingue par une teneur exceptionnellement élevée en tanins condensés (172,44 ±2,24 mgEQC/gE). L'activité antioxydante, évaluée par le test de piégeage du radical libre DPPH, a démontré que l'extrait aqueux possède le meilleur pouvoir inhibiteur avec une IC_{50} de 49,5 mg/mL, surpassant les extraits hydroacétonique (63,06 mg/mL) et hydroéthanolique (119,3 mg/mL), bien que restant inférieure à celle du témoin positif, l'acide ascorbique (IC_{50} = 0,106 mg/mL). Parallèlement, le test FRAP de réduction du fer confirme la forte capacité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique qui affiche l'efficacité la plus prometteuse avec une EC_{50} de 42,67 mg/mL. Enfin, l'évaluation du potentiel antidiabétique via l'inhibition de l'α-amylase a mis en évidence un effet dose-dépendant remarquable pour les extraits testés ; l'extrait hydroéthanolique atteint un pourcentage de 68% d'inhibition à 54 mg/mL, tandis que l'extrait hydroacétonique se montre moins performant en atteignant un taux d'inhibition de 16% à une concentration de 52 mg/mL.

L'ensemble de ces résultats valorise les extraits de *Cucurbita pepo* comme des sources naturelles majeures de molécules bioactives dotées de propriétés antioxydantes et d'une activité inhibitrice enzymatique d'intérêt pour la gestion du diabète.

<u>Mots clés</u> : *Cucurbita pepo*, graines de courge, composés phénoliques, activité antioxydante, DPPH, FRAP, inhibition de l'α-amylase.

Abstract

This work focused on the qualitative and quantitative phytochemical evaluation of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo*), as well as the assessment of their antioxidant potential using two methods (DPPH and FRAP) and their *in vitro* α-amylase inhibitory activity in different extracts (aqueous, hydroethanolic, and hydroacetonic).

Quantitative analysis revealed that the hydroacetonic extract was the richest in total polyphenols (18.57 ± 1.39 mg GAE/gE) and flavonoids (20.91 ± 1.17 mg QE/gE), whereas the aqueous extract was characterized by an exceptionally high content of condensed tannins (172.44 ± 2.24 mg QE/gE). Antioxidant activity, evaluated by the DPPH free radical scavenging assay, demonstrated that the aqueous extract exhibited the highest inhibitory capacity with an IC_{50} value of 49.5 mg/mL, outperforming the hydroacetonic (63.06 mg/mL) and hydroethanolic (119.3 mg/mL) extracts, although remaining lower than that of the positive control, ascorbic acid (IC_{50} = 0.106 mg/mL). In parallel, the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay confirmed the strong antioxidant potential of the hydroethanolic extract, which displayed the most promising activity with an EC50 value of 42.67 mg/mL.

Finally, the evaluation of the antidiabetic potential through α-amylase inhibition revealed a remarkable dose-dependent effect for the tested extracts. The hydroethanolic extract achieved 68% inhibition at a concentration of 54 mg/mL, whereas the hydroacetonic extract was less effective, reaching only 16% inhibition at a concentration of 52 mg/mL.

Overall, these findings highlight *Cucurbita pepo* extracts as important natural sources of bioactive compounds with antioxidant properties and enzyme inhibitory activity of potential interest for diabetes management.

<u>Key words</u> : *Cucurbita pepo*, pumpkin seeds, polyphenol compounds, antioxidant activity, DPPH, FRAP, α-amylase inhibition.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Un organigramme récapitulatif sur la classification des antioxydants. 122
Figure 2: Mécanismes physiopathologiques de l'hyperglycémie chronique et de ses complications. 19
Figure 3: Variabilité morphologique des graines de courge 26
Figure 4: Mécanisme d'action antiparasitaire de la cucurbitine des graines de courge. 29
Figure 5: Exemples de valorisation nutritionnelle et applications alimentaires des graines de *Cucurbita pepo* (pain, biscuits et produits de boulangerie)..... 31
Figure 6: Produits cosmetiques formules a base d'huile de graines de courge et leurs applications dermatologiques et capillaires..... 32
Figure 7: Organigramme récapitulatif des voies biosynthétiques des métabolites secondaire. 343
Figure 8: Structure chimique de quelques composée phénolique et précurseurs biosynthétiques……..35
Figure 9: Les Principales Structures Des Composés Phénoliques. 35
Figure 10: Les Principaux Classe Des Composées Phénoliques..... 37
Figure 11: Mécanisme de l'activité antioxydante des flavonoïdes dans la cellule végétale. ... 39
Figure 12: Graines de Cucurbita pepo avant et après broyage(photo prise au laboratoire). 42
Figure 13: Protocole récapitulative d'extraction et dévaluation des graines de courge *Cucurbita pepo*……..44
Figure 14: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux..... 58
Figure 15: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes..... 58
Figure 16: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés..... 58
Figure 17: Pourcentage d'inhibition du radicale DPPH par l'extrait aqueux de *C. pepo*. 61
Figure 18: Pourcentage d'inhibition du radicale DPPH par l'extrait eau/Ethanol de *C. pepo*. 62
Figure 19: Pourcentage d'inhibition du radicale DPPH par l'extrait eau/acétone de *C. pepo* ..... **Erreur ! Signet non défini.**
Figure 20: Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique..... 64
Figure 21: Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de *C. pepo*. 66
Figure 22: Pouvoir réducteur de l'extrait Eau/éthanol de *C. pepo*. 67
Figure 23: Pouvoir réducteur de l'extrait Eau/acétone de *C. pepo*. 68
Figure 24: Pouvoir réducteur de BHA 68
Figure 25: Pourcentage d'inhibition de l'α-amylase par l'extrait Eau/éthanol de *C. pepo*. ..... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 26: Pourcentage d'inhibition de l'α-amylase par l'extrait Eau/acétone de C. pepo 71
Figure 27: Pourcentage d'inhibition de l'α-amylase par l'acarbose 71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les espèces réactives de l'oxygène 5
Tableau 2: Les principales sources endogènes liées au fonctionnement normal des cellules ... 6
Tableau 3: Les principales sources Exogènes qui provoquent une production accrue de radicaux libres dans l'organisme 7
Tableau 4: méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant *in vivo* 133
Tableau 5: Les valeur typique pour l'huile de *Cucurbita Pepo*. 276
Tableau 6: Rendement et caractéristique des différents extraits de *Curcubita pepo* 554
Tableau 7: Résultats des analyses phytochimiques des extraits de *Curcubita pepo* 57
Tableau 8: Teneurs en composés phénoliques des différents extraits de *Curcubita pepo* 59
Tableau 9: Valeurs des IC_{50} des trois extraits de Cucurbita pepo et l'acide ascorbique 64
Tableau 10: Valeurs des EC_{50} des trois extraits de Cucurbita pepo et le BHA. 69

LISTE DES ABREVEATIONS

ADA	American Diabetes Association
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGEs	Advanced Glycation End-products (Produits de Glycation Avancée)
ARN	Acide Ribonucléique
BHA	Butylhydroxyanisole
CAT	Catalase
DNSA	Acide 3,5-Dinitrosalicylique
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle
DT1	Diabète de Type 1
DT2	Diabète de Type 2
EC_{50}	Concentration Efficace à 50 %
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ERN	Espèces Réactives de l'Azote
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GPx	Glutathion Peroxydase
GR	Glutathion Réductase
GSH	Glutathion Réduit
GSSG	Glutathion Oxydé
HbA1c	Hémoglobine Glyquée
HGPO	Hyperglycémie Provoquée par Voie Orale
HGPP	Hyperglycémie Postprandiale
H_2O_2	Peroxyde d'Hydrogène
IC_{50}	Concentration Inhibitrice à 50 %
LDL	Low Density Lipoprotein
MDA	Malondialdéhyde
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduit
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NO	Monoxyde d'Azote
$ONOO^-$	Peroxynitrite
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids (Acides Gras Polyinsaturés)
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End-products
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxyde Dismutase
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TrxR	Thioredoxine Réductase
UV	Ultraviolets
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

Table de matières

INTRODUCTION……..……..1

Partie 1 : Synthèses Bibliographiques

Chapitre I : Le Stress Oxydatif

1.Définition des radicaux libres 4

1.1.Les espèces réactives de l'oxygène (ERO/ROS) 4

1.2.Les espèces réactives de l'azote (RNS/ERN) 5

2.Les sources de production des espèces réactives 6

2.1.Sources Endogènes 6

2.2.Sources Exogènes 6

3.Concept de stress oxydatif ……..…….…….7

3.1.Définition et équilibre redox 7

3.2.La comparaison entre l'eustress et déstresse 8

4.Cibles moléculaires et dommages oxydatifs 8

4.1.Les Lipides (Peroxydation Lipidique) 9

4.2.Les Protéines (Oxydation des Protéines) 9

4.3.Les Acides Nucléiques (ADN et ARN) 9

4.4.Les Glucides (Glycolisations) 10

5.Les systèmes de défense antioxydants (enzymatique et non enzymatique) 10

5.1.Défenses enzymatiques 10

5.2.Défenses non enzymatiques 10

6.Stress oxydatif et physiopathologie 12

Chapitre II : Le diabète sucré et l'hyperglycémie postprandiale

1.Définition du diabète sucré 15

2.Classification étiologique du diabètesucré 15

2.1.Le Diabète de Type 1 (DT1) : Diabète Insulino-dépendant 16

2.2.Le Diabète de Type 2 (DT2) : Diabète Non Insulino-dépendant 16

3. Physiopathologie et complications du diabète sucré 16

3.1. Physiopathologie générale : Les mécanismes de l'hyperglycémie 16

4. Les mécanismes moléculaires de la toxicité du glucose 20

5. Les complications chroniques du diabète 20

5.1.Complications Microangiopathiques 20
5.2.Complications Macroangiopathiques 21
6.Les mécanismes biochimiques synergétiques qui cause l'hypoglicemie 21
7.L'hyperglycémie post-prondiale et inhibition des enzymes digestives et quelque plante à effets inhibiteur d'α-amylase et α-glycosidase 21
7.1.L'Hyperglycémie postprandiale (HGPP) 21
7.2.Rôle des enzymes digestives : α-amylase et α-glucosidase 22
7.2.1.Le médicament de référence : L'Acarbose 22
8.Exemples de plantes médicinales à effet inhibiteur 23

Chapitre III : Les Graines de Courge

1. Rappels botaniques et origines 24
2. Classification botanique 24
3. Nom de la graine de *Cucurbita pepo* dans différentes région d'Algérie…….....……24
4. Description de la graine 26
5. Intérêts thérapeutiques et pharmacologiques 27
6. Utilisation, agroalimentaires et industrielles 29
7. Application cosmétique et pharmaceutique 30

Chapitre IV : Les Métabolites Secondaires

1. Caractéristiques principales 32
2. Rôles ecologiques et biologiques 34
3. Classification chimique 35
3.1.Les Composés phénoliques 35
3.2.Les Terpénoïdes (ou Isoprénoïdes) 35
3.3.Les Composés azotés 35
4. Importance economique et pharmacologique des metabolites secondaires 36
5. Fonctions des métabolites secondaires 37
5.1.Protection contre le stress oxydatif au niveau de la cellule humaine …….37
5.2.Protection contre le stress oxydatif au niveau de la cellule végétale..…….37
5.2.1.Défense contre les microorganismes et les herbivores 37
5.2.2.Défense chimique..... 38
5.2.3.Signalisation cellulaire et fluidité membranaire 38
5.2.4.Protection contre le stress oxydatif 38

Partie 2: Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal 41
2. Préparation des extraits de *Cucurbita pepo* 42
2.1. Préparation de l'extrait aqueux 42
2.2. Préparation de l'extrait hydroéthanolique 42
2.3. Préparation de l'extrait hydroacétonique 42
3. Analyse phytochimique 44
4. Dosage des composés phénoliques 45
4.1. Dosage de polyphénols totaux 45
4.2. Dosage des Flavonoïdes 46
4.3. Dosage des tanins 47
4.4. Expression des résultats 47
5. Evaluation de l'activité antioxydante 48
5.1. Piégeage du radical libre DPPH· (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) 48
5.2. Réduction du fer par la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) 49
5.3. Expression des résultats 49
6. Evaluation de l'activité inhibitrice de l'α-amylase 50
6.1. Préparation des réactifs 50
6.2. Mode opératoire 51
6.3. Expression des résultats 52

Résultats et Interprétation

1. Rendement d'extraction 54
2. Résultats de l'analyse phytochimique 55
3. Teneurs en composés phénoliques 57
4. Résultats de l'activité antioxydante 59
4.1. Piégeage du radicale DPPH par les extraits de *Curcubita pepo* 59
4.1.1. Piégeage du radicale DPPH par l'extrait aqueux 59
4.1.2. Piégeage du radicale DPPH par l'extrait eau/éthanol 60
4.1.3. Piégeage du radicale DPPH par l'extrait eau/acétone 61
4.1.4. Piégeage du radicale DPPH par l'acide ascorbique 62
4.1.5. Calcul des IC_{50} 63
4.2. Pouvoir réducteur des extraits de *Cucurbita pepo* par la méthode FRAP 64

4. 2.1. Réduction du fer par l'extrait aqueux de *Cucurbita pepo* 64
4. 2.2. Réduction du fer par l'extrait eaux/éthanol de *Cucurbita pepo* 65
4. 2.3. Réduction du fer par l'extrait eaux/acétone de *Cucurbita pepo* 66
4.2.4. Réduction du fer par le BHA 67
4.2.5. Calcul des EC_{50} 68
5. Résultats de l'inhibition de l'α-amylase 69
Discussion 73
Conclusion 77
Références bibliographiques 79

INTRODUCTION

Face à l'augmentation croissante des pathologies chroniques à l'échelle mondiale, la recherche scientifique se tourne de plus en plus vers la valorisation des substances naturelles d'origine végétale. Parmi ces affections, le diabète de type 2 et les troubles physiologiques liés au stress oxydant représentent des défis majeurs pour la santé publique. Bien que l'arsenal thérapeutique moderne propose divers médicaments de synthèse, ces derniers s'accompagnent souvent d'effets secondaires non négligeables. C'est dans ce contexte que les propriétés fonctionnelles des aliments et des coproduits agricoles suscitent un intérêt grandissant pour le développement d'alternatives thérapeutiques ou nutritionnelles plus sûres (**Mitchell *et al.*, 2014).**

La courge (*Cucurbita pepo*), une plante largement cultivée à travers le monde, est traditionnellement reconnue pour ses qualités nutritionnelles. Cependant, ses graines, souvent considérées comme des sous-produits de l'industrie agroalimentaire, recèlent un potentiel biologique exceptionnel. Elles constituent une source précieuse de composés bioactifs, notamment des polyphénols, des flavonoïdes, des tocophérols (vitamine E) et des acides gras insaturés (**Aruah *et al.*, 2016).**

D'une part, ces phytocomposants confèrent aux graines de courge une remarquable activité antioxydante. En piégeant les radicaux libres et en limitant la peroxydation lipidique (la dégradation des graisses sous l'effet de l'oxygène), ces molécules aident à maintenir l'homéostasie cellulaire et à prévenir le stress oxydant, un phénomène pathologique impliqué dans le vieillissement prématuré et de nombreuses maladies dégénératives (**Dotto and Chacha, 2020**).

D'autre part, des études récentes mettent en lumière leur potentiel antidiabétique. Les mécanismes suggérés incluent l'inhibition des enzymes clés de la digestion des glucides (comme l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et la protection des cellules bêta du pancréas contre les dommages oxydatifs. L'évaluation conjointe de ces deux activités est particulièrement pertinente, car le stress oxydant et le diabète sont intimement liés, l'hyperglycémie chronique alimentant la production de radicaux libres (**Giacco and Brownlen, 2010**).

L'objectif de ce travail de mémoire est d'évaluer scientifiquement les activités antioxydante et antidiabétique des extraits de graines de courge (*Cucurbita pepo*). Cette étude vise non seulement à caractériser leur profil bioactif, mais aussi à contribuer à la valorisation

de cette ressource naturelle dans le domaine des aliments fonctionnels ou de la phytothérapie (**Newman and Grag, 2020**).

Cette étude commence par une synthèse bibliographique divisée en quatre chapitres, abordant successivement le stress oxydatif, le diabète et l'hyperglycémie postprandiale, la graine de courge, ainsi que les métabolites secondaires. Elle se poursuit par une partie expérimentale structurée autour du matériel et des méthodes, suivis des résultats et de leur interprétation. Cette section pratique se concentre spécifiquement sur l'analyse phytochimique, l'activité antioxydante et l'inhibition par l'alpha-amylase. L'ensemble du travail se termine par une discussion approfondie et une conclusion générale.

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Le Stress Oxydatif

1. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes, molécules ou ions possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, ce qui leur confère une grande instabilité chimique et une forte réactivité. Afin de retrouver leur stabilité, ces espèces réactives peuvent capter des électrons provenant de molécules voisines telles que les lipides, les protéines ou l'ADN, provoquant ainsi des altérations cellulaires et tissulaires. Dans les organismes vivants, les radicaux libres sont produits naturellement au cours du métabolisme cellulaire, notamment lors de la respiration mitochondriale, mais leur production peut également être favorisée par des facteurs environnementaux tels que les rayonnements UV, la pollution, les métaux lourds ou certains agents chimiques. Lorsque leur production dépasse les capacités de défense antioxydante de l'organisme, un état de stress oxydatif peut s'installer, entraînant des dommages cellulaires importants **(Barry Halliwell *et al.*, 2015).**

1.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO/ROS)

Les ROS regroupent l'ensemble des molécules dérivées de l'oxygène Moléculaire (O_2). Les classent en deux catégories selon leur structure électronique :

- **Les formes radicalaires :** Ce sont les radicaux libres proprement dits. Ils possèdent un électron non apparié.
- **Anion superoxyde (O_2) :** premier radical formé par la réduction d'oxygène bien que peu réactif directement, il est le précurseur de la plupart des autres ROS.
- **Radical hydroxyle (OH) :** c'est l'espèce la plus réactive et la plus dangereuse en biomolécules (ADN, lipide, protéines).
- **Radical hydroperoxyle (HO_2) :** forme protonée du superoxyde capable de pénétrer les membranes lipidiques. **(Prior et al., 2017)**

  Le tableau suivant présente une synthèse des principales espèces réactives de l'oxygène (ERO), en précisant leur nature radicalaire, leurs principaux mécanismes de formation ainsi que leurs impacts délétères sur les constituants cellulaires. Ces données mettent en évidence la haute toxicité de ces composés (**tableau 1).**

Tableau 1:Les espèces réactives de l'oxygène (ERO / ROS) (Prior *et al.*, 2017)

Radicaux libre	Forme	Origine	Dommages
Radical hydroxyle	Radicalaire	Réaction de Fenton	Très toxique, attaque ADN, protéines et lipides
Radical hydroperoxyle	Radicalaire	Radical hydroperoxyle	Peroxydation lipidique
Radical pyroxyle	Radicalaire	Peroxydation lipidique	Dégradation des lipides membranaires
Radical alkoxyle	Radicalaire	Décomposition des peroxydes	Altération des protéines et lipides
Oxygène singulet	Non radicalaire	Oxygène singulet	Destruction des acides aminés
Ozone	Non radicalaire	Ozone	Altération des voies respiratoires
Peroxynitrite	Non radicalaire	Réaction entre NO et O_2•−O_2 O_2•−	Peroxynitrite
Hypochlorite	Non radicalaire	Activité des neutrophiles	Action antimicrobienne mais cytotoxique

1.2. Les espèces réactives de l'azote (RNS/ERN)

Les RNS sont des molécules dérivées de l'azote, issues principalement de l'interaction entre le monoxyde d'azote (NO) et les ROS.

- **Monoxyde d'azote (NO) :** Un radical libre gazeux qui joue un rôle crucial dans la signalisation vasculaire (vasodilatation).
- **Peroxynitrite (ONOO-) :** Formé par la réaction ultra-rapide entre le superoxyde **(O_2-)** et le monoxyde d'azote **(NO)**. C'est un agent hautement cytotoxique responsable du stress nitrosatif.

- **Dioxyde d'azote (NO_2) :** Un oxydant fort souvent issu de la décomposition du peroxynitrite **. (Prior et al., 2017)**

2. Les sources de production des espèces réactives

La production des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), ou Réactive Oxygène Species (ROS), est un processus biologique fondamental. Elles proviennent de sources internes au Métabolisme cellulaire (endogènes) ou de facteurs environnementaux (exogènes). Voici un récapitulatif structuré des principales sources :

2.1. Sources endogènes

Ces sources sont liées au fonctionnement normal des cellules, principalement au sein des organites spécialisés **(tableaux 2**).

Tableau 2: Les principales sources endogènes liées au fonctionnement normal des cellules (Benzie , Strain, 2022).

La Mitochondrie	C'est la source principale. Lors de la respiration cellulaire (chaîne de Transport des électrons), une petite fraction de l'oxygène (environ 1 à 3%) subit une réduction incomplète, générant l'anion superoxyde (O_2).
Le Réticulum Endoplasmique	Intervient via le repliement des protéines et l'action des enzymes du cytochrome P450, qui produisent des ROS comme sous-produits de la détoxification.
Les Peroxysomes	Ces organites produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) lors du catabolisme des acides gras à longue chaîne.
Les Cellules Immunitaires (Phagocytes)	Lors de l'explosion oxydative (oxydative burst), les macrophages et Neutrophiles utilisent l'enzyme NADPH oxydase pour produire des ROS afin de détruire les agents pathogènes.
Enzymes Spécifiques	La xanthine oxydase, les lipoxygénases et les cyclooxygénases.

2.2. Sources exogènes

Il s'agit de facteurs externes qui provoquent une production accrue de radicaux libres dans l'organisme **(tableau 3).**

Tableau 3: Les principales sources Exogènes qui provoquent une production accrue de radicaux libres dans l'organisme (Sies, 2017)

Polluants Environnementaux	Fumée de cigarette, gaz d'échappement et métaux lourds (plomb, cadmium, mercure).
Rayonnements	Les rayons Ultraviolets (UV), les rayons X et les radiations ionisantes qui provoquent la radiolyse de l'eau dans les tissus.
Régime alimentaire et xénobiotiques	Consommation excessive d'alcool, aliments transformés, et certains médicaments (ex: paracétamol à haute dose, chimiothérapies).
Le Stress Psychologique	Des études montrent que le stress chronique augmente le cortisol, ce qui peut perturber l'équilibre oxydatif mitochondrial.

3. Concept de stress oxydatif

Le concept de stress oxydatif (ou stress oxydant) est fondamental en biologie cellulaire et en médecine. Il désigne une rupture de l'équilibre physiologique entre la production de Molécules pro-oxydantes et les capacités de défense de l'organisme **(Halliwell et Gutteridge, 2015).**

3.1. Définition et équilibre redox

Le stress oxydatif survient lorsque la concentration ERO dépasse la capacité d'une cellule à les neutraliser ou à réparer les dommages qu'elles causent **(Halliwell et Gutteridge, 2015)**

- **L'équilibre redox (Réduction-Oxydation)**

Dans un état physiologique normal, la cellule maintient un équilibre dynamique appelé homéostasie redox. Cet équilibre repose sur deux plateaux :

- **Les Pro-oxydants :** Principalement les radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) ou des molécules non radicalaires mais réactives comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ils sont produits naturellement par la respiration mitochondriale, l'inflammation ou des facteurs externes (pollution, UV, tabac) **(Birben *et al.*, 2012).**

- **Les Défenses Antioxydantes :**

- Enzymatiques : Superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase (GPx).
- Non-enzymatiques : Vitamines C et E, glutathion, polyphénols.

Lorsque la production de ROS est modérée, elle joue un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire (contrôle de la croissance, adaptation au stress). C'est le déséquilibre prolongé ou massif qui devient pathologique **(Droge, 2015).**

3.2. La comparaison entre l'eustress et déstresse

Le concept a été affiné, notamment par le chercheur Helmut Sies, pour distinguer les effets bénéfiques des effets délétères de l'oxydation **(Sies et Jones, 2020).**

- **L'Eustress oxydatif (Le "bon" stress)**

L'eustress correspond à une exposition à de faibles concentrations de ROS. Au lieu d'endommager la cellule, ces molécules agissent comme des messagers secondaires.

Fonction : Régulation de l'expression des gènes, adaptation métabolique (ex : l'exercice physique produit des ROS qui renforcent les défenses antioxydantes à long terme).

Cible : Modification réversible des protéines (ex : oxydation des thiols) **(Esterbauer *et al.*, 2017)**

- **Le Déstresse oxydatif (Le "mauvais" stress)**

Le déstresse survient lorsque le flux de ROS est trop élevé, submergeant les systèmes de contrôle.

Fonction : Dommages structurels irréparables.

Conséquences : Peroxydation des lipides (destruction des membranes), mutations de l'ADN, dénaturation des protéines. Il est impliqué dans le vieillissement prématuré et les maladies chroniques (cancer, Alzheimer, diabète) **(Sies, 2021).**

4. Cibles moléculaires et dommages oxydatifs (sous type)

Le stress oxydatif survient lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les capacités antioxydantes de l'organisme. Ces ROS attaquent quatre cibles moléculaires principales : les lipides, les protéines, les acides nucléiques (ADN/ARN) et les glucides **(Haliwelle *et al.*, 2016).**

4.1. Les Lipides (Peroxydation Lipidique) : Les acides gras polyinsaturés (PUFA) des membranes cellulaires sont les cibles les plus vulnérables en raison de leurs doubles liaisons carbone-carbone.

Sous-types de dommages

- ✓ **Formation d'hydroperoxydes lipidiques :** Résultat de l'attaque initiale par un radical (ex : OH·).
- ✓ **Aldéhydes réactifs :** Dégradation des hydroperoxydes en composés secondaires tels que le Malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (4-HNE). Ces derniers sont toxiques et peuvent diffuser pour endommager d'autres molécules **(Haliwelle *et al.*, 2014).**

4.2. Les Protéines (Oxydation des Protéines) : L'oxydation des protéines peut entraîner une perte de fonction enzymatique, une fragmentation ou une agrégation **(Stadtman *et al.*, 2015)**

Sous-types de dommages

- ✓ **Carbonylation :** Introduction de groupements carbonyles (aldéhydes/cétones) sur les chaînes latérales de la proline, l'arginine, la lysine ou la thréonine. C'est le marqueur le plus utilisé.
- ✓ **Oxydation des groupements thiols (-SH) :** Formation de ponts disulfures réversibles ou irréversibles (acides cystéiques) sur la cystéine et la méthionine.
- ✓ **Nitration des tyrosines :** Formation de 3-nitrotyrosine par le peroxynitrite ($ONOO^-$) **(Stadtman *et al.*, 2013).**

4.3. Les Acides nucléiques (ADN et ARN) : L'ADN mitochondrial est particulièrement exposé car il est proche de la chaîne de transport des électrons (source de ROS) et possède moins de mécanismes de réparation que l'ADN nucléaire.

Sous-types de dommages

- ✓ **Modifications de bases :** La plus fréquente est la formation de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxo-dG).
- ✓ **Coupures de brins :** Rupture du squelette sucre-phosphate (simples ou doubles brins).
- ✓ **Liaisons croisées (Cross-links) :** Liaisons anormales ADN-ADN ou ADN-protéines. **(Adams *et al.*, 2009).**

4.4. Les Glucides (Glycolisations) : Les sucres peuvent subir une auto-oxydation ou réagir avec les protéines.

Sous-types de dommages :

- ✓ **Produits de glycation Avancée (AGE) :** Formés par la réaction de Maillard entre des sucres réducteurs et des groupes aminés, amplifiée par l'oxydation.
- ✓ **Fragmentation des polysaccharides :** Notamment l'acide hyaluronique dans le liquide synovial **(Bayen, 2016)**.

5. Les systèmes de défense antioxydants (enzymatique et non enzymatique)

Le système de défense antioxydant est un réseau complexe conçu pour maintenir l'équilibre Redox et protéger les cellules contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ce système se divise principalement en deux catégories : les défenses enzymatiques et les défenses non enzymatiques **(Niki *et al.*, 2014).**

5.1. Défenses enzymatiques

Ces enzymes constituent la première ligne de défense intracellulaire en neutralisant directement les radicaux libres et les peroxydes.

- **Superoxyde dismutase (SOD) :** Elle catalyse la dismutation du radical superoxyde ($O_2 \cdot -$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en dioxygène (O_2). On distingue plusieurs isoformes selon le cofacteur métallique (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD).
- **Catalase (CAT) :** Principalement située dans les peroxysomes, elle transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$.
- **Glutathione peroxydase (GPx) :** Cette enzyme réduit les hydroperoxydes organiques et le H_2O_2 en utilisant le glutathione réduit (GSH) comme donneur d'électrons.
- **Glutathione réductase (GR) :** Bien qu'elle ne neutralise pas directement les ERO, elle est essentielle car elle régénère le GSH à partir du glutathione oxydé (GSSG).
- **Thioredoxine réductase (TrxR) :** Elle participe au maintien de l'état réduit des thioredoxines, cruciales pour la synthèse d'ADN et la signalisation cellulaire **(Sies, 2017).**

5.2. Défenses non enzymatiques

Cette catégorie regroupe des molécules de faible poids moléculaire qui peuvent être produites par l'organisme (endogènes) ou apportées par l'alimentation (exogènes).

Antioxydants endogènes :

- **Glutathione (GSH) :** Le principal antioxydant non enzymatique intracellulaire. Il agit comme un piégeur direct de radicaux et comme cofacteur pour la GPx.
- **Acide urique :** Un puissant antioxydant dans le plasma humain, efficace contre les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet.
- **Mélatonine :** Une hormone capable de traverser toutes les barrières biologiques pour neutraliser les radicaux libres.
- **Bilirubine :** Produit de dégradation de l'hème, elle protège contre l'oxydation des lipides **(Finkel , Holbrook, 2000)**

Antioxydants exogènes (Alimentaire) :

- **Vitamine E (α-tocophérol) :** Antioxydant liposoluble majeur qui protège les membranes cellulaires de la lipoperoxidation.
- **Vitamine C (Acide ascorbique) :** Antioxydant hydrosoluble qui neutralise les ERO dans les fluides biologiques et régénère la vitamine E.
- **Caroténoïdes (β-carotène, lycopène) :** Pigments végétaux qui piègent l'oxygène singulet.
- **Polyphénols (Flavonoïdes, tanins) :** Présents dans le thé, le vin et les fruits, ils possèdent des propriétés chélatrices de métaux et de piégeage de radicaux **(Finkel *et al.*, 2000)**

La figure 1 représente la classification des antioxydants selon plusieurs catégories.

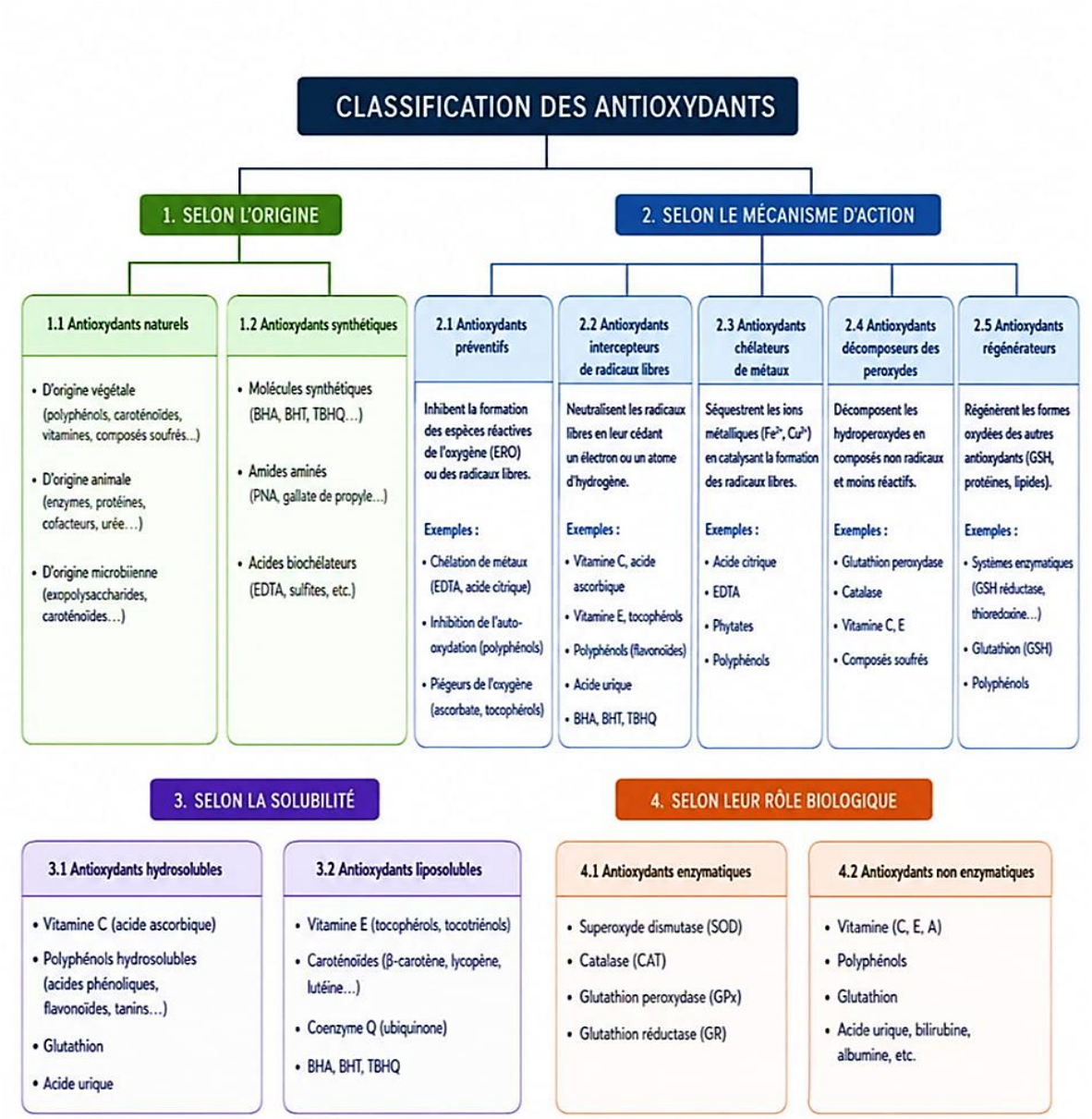


Figure 1:Un organigramme récapitulatif sur la classification des antioxydants (Apak et al., 2016)

6. Stress oxydatif et physiopathologie

Le stress oxydatif est impliqué dans un large spectre de maladies chroniques :

- **Cardiovasculaires :** Oxydation des LDL, point de départ de l'athérosclérose.
- **Neurodégénératives :** Le cerveau est très sensible (consommation élevée d'O_2) ; impliqué dans Alzheimer et Parkinson.
- **Métaboliques :** Insulinorésistance et complications du diabète.

- **Inflammation :** Le stress oxydatif active le facteur NF-KB, qui stimule la production de cytokines pro-inflammatoires **(Droge, 2000).**

  Les principales méthodes utilisées pour évaluer le potentiel antioxydant *in vitro* en précisant pour chacune leur principe chimique le mécanisme d'action évaluer ainsi que leur mode d'expression **(tableau 4).**

Tableau 4: Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant *in vitro* (Apak *et al.*, 2016)

Test antioxydante	Principe	Mécanisme évalué	Expression des résultats
DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)	Réduction du radical DPPH• violet en DPPH-H jaune	Piégeage des radicaux libres	% inhibition IC_{50}
FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	Réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+}	Pouvoir réducteur	Absorbance à 593 nm
ABTS (ABTS•$^{+}$)	Décoloration du radical cation ABTS•$^{+}$	Piégeage des radicaux libres	% inhibition
ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	Inhibition de l'oxydation d'une sonde fluorescente	Capture des radicaux peroxyles	Valeur ORAC
CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)	Réduction de Cu^{2+} en Cu^{+}	Pouvoir réducteur	Absorbance à 450 nm
TBARS	Dosage des produits de peroxydation lipidique	Inhibition de l'oxydation des lipides	Teneur en malondialdéhyde (MDA)
β-carotène/acide linoléique	Protection du β-carotène contre la décoloration	Inhibition de la peroxydation lipidique	Pourcentage de protection
Pouvoir réducteur (Reducing Power Assay)	Réduction du ferricyanure en ferrocyanure	Don d'électrons	Absorbance à 700 nm
Chélation des métaux	Complexation des ions métalliques (Fe^{2+}, Cu^{2+})	Prévention de la formation des radicaux	Pourcentage de chélation
Hydroxyl Radical Scavenging Assay	Neutralisation des radicaux hydroxyles (OH•)	Piégeage des radicaux très réactifs	% d'inhibition
Superoxyde Radical Scavenging Assay	Neutralisation des radicaux superoxydes (O_2•$^{-}$)	Capture des ERO primaires	% d'inhibition

Chapitre II : Le diabète et l'hyperglycémie postprandiale

1. Définition du diabète Sucré

Le diabète sucré regroupe un ensemble hétérogène de troubles métaboliques chroniques caractérisés par une hyperglycémie chronique. Cette élévation permanente du taux de glucose dans le sang résulte soit d'un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, soit d'une anomalie de l'action de cette hormone sur ses tissus cibles (insulinorésistance), soit de la combinaison de ces deux mécanismes. À long terme, ce déséquilibre métabolique profond induit des altérations fonctionnelles et anatomiques touchant les vaisseaux sanguins, le système nerveux et divers organes, notamment les yeux, les reins et le cœur**(Adam, 2011)**

Critères biologiques de diagnostiques :

- Une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/L (7,0 mmol/L) mesurée à deux reprises.
- Ou une glycémie supérieure ou égale à 2,00 g/L (11,1 mmol/L) deux heures après une charge orale de 75 g de glucose (test d'hyperglycémie provoquée par voie orale, HGPO).
- Ou un taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) supérieur ou égal à 6,5% **(ADA, 2026).**

2. Classification etiologique du Diabète Sucré

La classification moderne du diabète sucré repose sur les mécanismes physiopathologiques qui causent la maladie. Bien qu'il existe d'autres formes de diabète (diabète gestationnel, diabètes monogéniques de type MODY, etc.), les deux formes principales sont le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2).

2.1. Le Diabète de Type 1 (DT1) : Diabète Insulino-dépendant

Le diabète de type 1 représente environ 5 à 10 % de l'ensemble des cas de diabète. Il est caractérisé par une insulino-déficience absolue, ce qui signifie que le corps ne produit presque plus d'insuline **(ADA, 2026).**

Il se divise en deux sous-catégories :

- **Le Diabète de type 1A (Auto-immun) :** C'est la forme la plus fréquente. Elle résulte d'une destruction sélective et progressive des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas par le système immunitaire du patient (lymphocytes T). Ce processus auto-immun est médié par la présence d'auto-anticorps spécifiques circulants (anticorps anti-GAD, anti-IA2, anti-insuline et anti-ZnT8) **(Atkinson *et al.*, 2014).**

- **Le Diabète de type 1B (Idiopathique) :** Cette forme est beaucoup plus rare Elle présente les mêmes symptômes d'insulino-déficience absolue, mais sans aucune preuve d'auto-immunité (absence d'auto-anticorps). Son origine reste inconnue et elle touche principalement les populations d'origine africaine ou asiatique. **(Atkinson *et al.*, 2014).**

2.2. Le Diabète de type 2 (DT2) : Diabète Non Insulino-dépendant

Le diabète de type 2 est de loin la forme la plus répandue, représentant 90 à 95 % des cas mondiaux **(Organisation Mondiale de la Santé « OMS », 2019).** Contrairement au type 1, le DT2 se caractérise par une insulinorésistance périphérique associée à un déficit relatif de la sécrétion d'insuline **(DeFronzo *et al.*, 2015).**

La physiopathologie du DT2 évolue généralement en deux temps :

- **L'insulinorésistance :** Les cellules de l'organisme (muscles, foie, tissu adipeux) deviennent moins sensibles à l'insuline. Pour compenser cela, le pancréas sécrète davantage d'insuline (hyperinsulinisme) afin de maintenir une glycémie normale.
- **L'épuisement pancréatique :** Au fil des années, les cellules β du pancréas s'épuisent et ne parviennent plus à sécréter suffisamment d'insuline pour surmonter la résistance. C'est à ce moment que l'hyperglycémie chronique s'installe.

  Cette forme est multifactorielle **:** elle combine une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux majeurs comme la sédentarité, le surpoids, l'obésité viscérale et le vieillissement **(ADA, 2026).**

3. Physiopathologie et complications du diabète sucré

3.1. Physiopathologie générale : Les mécanismes de l'hyperglycémie

La régulation de la glycémie dépend d'un équilibre strict entre la production hépatique de glucose et son utilisation par les tissus périphériques (muscles et tissu adipeux), un processus orchestré par l'insuline (hormone hypoglycémiante sécrétée par les cellules β pancréatiques). Dans le diabète sucré, deux anomalies majeures rompent cet équilibre **(Akmal et Khan, 2023).**

. L'insulinopénie absolue (Physiopathologie du DT1)

Dans le diabète de type 1, l'infiltration des îlots de Langerhans par des lymphocytes T (insulite) conduit à la destruction sélective des cellules β. Lorsque plus de 80 à 90 % de ces cellules sont détruites, la carence en insuline devient absolue. L'absence d'insuline empêche la pénétration du glucose dans les cellules musculaires et adipeuses via les transporteurs GLUT4,

et lève l'inhibition de la production de glucose par le foie (glygogénolyse et néoglucogénèse), provoquant une hyperglycémie majeure (**Atkinson *et al.*, 2014).**

. L'Insulinorésistance et le déficit Relatif (Physiopathologie du DT2)

Dans le diabète de type 2, les récepteurs à l'insuline des tissus cibles deviennent moins sensibles à l'hormone. Au niveau musculaire, cela bloque le recrutement des transporteurs GLUT4. Au niveau hépatique, le foie continue de libérer du glucose dans le sang même en période postprandiale (après un repas). Pour surmonter cette résistance, le pancréas entre en hyperinsulinisme compensatoire. À terme, la toxicité directe du glucose (glucotoxicité) et des acides gras libres (lipotoxicité) induit l'apoptose (mort cellulaire) progressive des cellules β, menant à un déficit insulino-sécrétoire relatif (**DeFronzo *et al.*, 2015) (figure 2).**

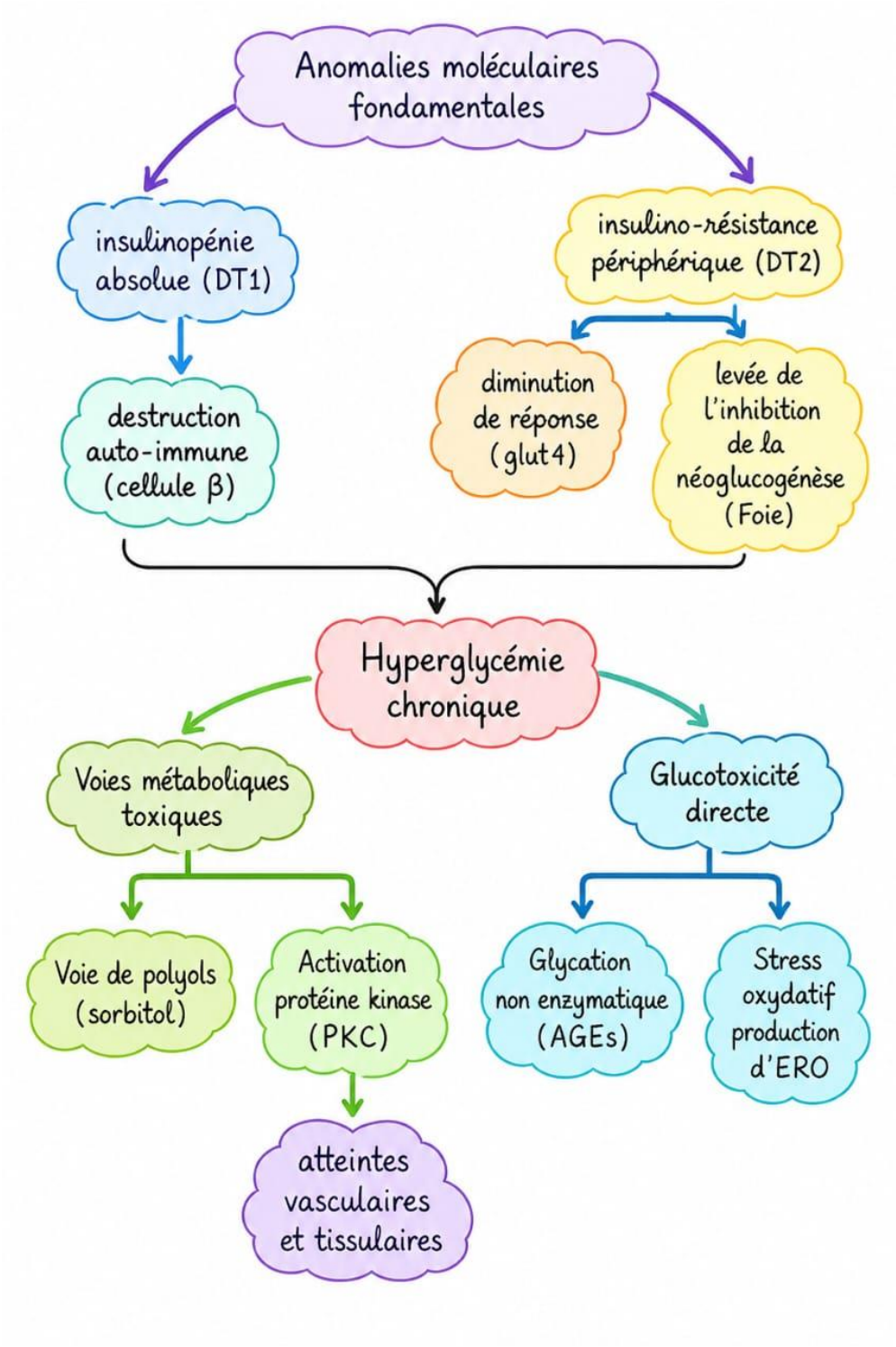


Figure 2: Mécanismes physiopathologiques de l'hyperglycémie chronique et de ses complications (DeFronzo et al., 2015)

4. Les mécanismes moléculaires de la toxicité du glucose

L'hyperglycémie chronique agresse les cellules par trois voies biochimiques majeures :

- **La glycation non enzymatique des protéines :** Le glucose se fixe sur les protéines structurales (comme le collagène des vaisseaux), formant des produits de glycation avancée (AGEs pour Advanced Glycation End-products). Les AGEs altèrent les propriétés mécaniques des vaisseaux et se fixent sur des récepteurs spécifiques (RAGE), déclenchant une inflammation chronique **(Brownlee, 2005)**
- **La voie des polyols :** L'excès de glucose intracellulaire est métabolisé en sorbitol par l'aldose réductase. L'accumulation de sorbitol crée un stress osmotique et consomme le NADPH, affaiblissant les défenses antioxydantes cellulaires.
- **Le stress oxydatif :** L'hyperproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale est le dénominateur commun qui active toutes les voies de destruction tissulaire **(Brownlee, 2005)**

5. Les complications chroniques du diabète

- Les complications du diabète sont le reflet direct des atteintes vasculaires causées par la glucotoxicité. On les sépare classiquement en complications microvasculaires (petits vaisseaux) et macrovasculaires (gros vaisseaux). **(ADA, 2026).**

5.1. Complications microangiopathiques

Elles sont spécifiquement liées à la durée et à la sévérité de l'hyperglycémie.

- **La rétinopathie diabétique :** C'est la première cause de cécité acquise chez l'adulte dans les pays développés. L'altération des capillaires rétiniens entraîne une ischémie (privation d'oxygène), provoquant la sécrétion de facteurs de croissance angiogéniques (VEGF) et l'apparition de néovaisseaux fragiles qui saignent (retinopathie proliférante) **(ADA, 2026).**
- **La néphropathie diabétique :** Elle débute par une hyperfiltration glomérulaire, suivie d'une microalbuminurie (présence d'albumine dans les urines entre 30 et 300 mg/24h). Elle évolue progressivement vers l'insuffisance rénale terminale à cause de la sclérose des glomérules rénaux **(National Kidney Foundation, 2023).**

5.2. Complications macroangiopathiques

Elles correspondent à une accélération du processus d'athérosclérose (formation de plaques de graisse dans les artères), potentialisée par l'insulinorésistance et l'inflammation.

- **La cardiopathie ischémique :** Multipliée par un facteur de 2 à 4 chez le patient diabétique, elle se manifeste par l'infarctus du myocarde, souvent silencieux en raison de la neuropathie autonome cardiovasculaire.
- **L'accident vasculaire cérébral (AVC) :** Le diabète augmente significativement le risque d'AVC ischémique par sténose (rétrécissement) des artères carotides.
- **L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) :** Elle altère la vascularisation des jambes, contribuant de façon critique, en synergie avec la neuropathie, à la genèse des gangrènes du pied (**Michels *et al.*, 2014).**

6. Les mécanismes biochimiques synergétiques qui causent l'hypoglycémie

- **Inhibition des enzymes clés du métabolisme des glucides :** Les composés bioactifs (notamment les peptides et les polyphénols) agissent comme des inhibiteurs naturels de l'α-amylase et de l'α-glucosidase. En bloquant ces enzymes, les graines de courge ralentissent la dégradation des glucides complexes dans l'intestin, limitant ainsi les pics de glycémie postprandiale **(Monica *et al.*, 2020).**
- **Régénération des cellules β pancréatiques :** Les polysaccharides et certains alcaloïdes comme la trigonelline présents dans les graines favorisent la protection et la régénération des cellules β des îlots de Langerhans, stimulant ainsi la sécrétion d'insuline **(Adams *et al.*, 2011).**
- **Amélioration de la sensibilité à l'insuline :** La présence massive des oligo-éléments (Zinc, Chrome, Cobalt) améliore la liaison de l'insuline à ses récepteurs périphériques, facilitant la capture du glucose par les tissus cibles (poids musculaire et adipeux). L'administration de poudre ou d'extraits de graines chez des modèles de rats diabétiques induits (par l'alloxane ou la streptozotocine) montre une réduction significative de la glycémie à jeun et une amélioration du profil lipidique (HbA1c, cholestérol LDL) **(Pour *et al.*, 2023).**

7. L'hyperglycémie post-prondiale et inhibition des enzymes digestives

7.1. L'hyperglycémie postprandiale (HGPP)

L'hyperglycémie postprandiale correspond à l'élévation du taux de glucose dans le sang (glycémie) juste après la prise d'un repas. Chez un sujet sain, le pic glycémique survient environ

60 minutes après le repas et dépasse rarement 1,4 g/L (7,8 mmol/L), avant de revenir à la normale en 2 heures grâce à l'insuline.

Chez les patients atteints de diabète de type 2 (DT2), ce mécanisme est altéré en raison de l'insulinorésistance ou d'une baisse de l'insulinosécrétion. La gestion de l'HGPP est aujourd'hui considérée comme une priorité thérapeutique majeure, car sa répétition chronique est directement corrélée au développement de complications macrovasculaires (maladies cardiovasculaires) et microvasculaires (rétinopathie, néphropathie) en induisant un stress oxydatif tissulaire sévère **(Derosa et Maffioli, 2012).**

7.2. Rôle des enzymes digestives : α-amylase et α-glucosidase

La digestion des glucides complexes (comme l'amidon) en glucose absorbable est un processus séquentiel hautement dépendant de deux hydrolases clés du système digestif :

- **L'α-amylase (pancréatique et salivaire) :** Elle catalyse la première étape en hydrolysant les liaisons internes α-(1,4) des polysaccharides complexes (amidon, glycogène) pour les transformer en oligosaccharides plus courts, principalement en maltose, maltotriose et α-dextrines.
- **L'α-glucosidase :** Cette enzyme est ancrée sur la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin grêle (entérocytes). Elle prend le relais en hydrolysant les oligosaccharides et disaccharides restants en monosaccharides, principalement en glucose, qui est la seule forme directement absorbable par l'organisme **(Kazeem *et al.*, 2013).**
- **Stratégie Thérapeutique :** L'inhibition compétitive de ces deux enzymes permet de ralentir la vitesse de dégradation des glucides complexes. L'absorption intestinale du glucose est ainsi étalée dans le temps, ce qui atténue significativement le pic glycémique postprandial.**(Kazeem *et al.*, 2013).**

7.2.1. Le médicament de référence : L'acarbose

L'acarbose (commercialisé sous le nom de Glucor ou Precose) est un pseudo-tétrasaccharide d'origine microbienne (Actinoplanes utahensis). Il s'agit de l'inhibiteur de l'α-glucosidase de référence utilisée en clinique et systématiquement employé comme témoin positif dans les screenings *in vitro* de substances naturelles.

Mécanisme d'action : L'acarbose possède une structure chimique qui mime l'état de transition des oligosaccharides lors de l'hydrolyse enzymatique. Il se fixe de manière réversible et compétitive sur le site actif de l'α-glucosidase intestinale (et à un degré moindre sur l'α-amylase pancréatique). En bloquant ces sites, il retarde la libération de glucose libre dans la lumière intestinale **(Akmal et Khan, 2023).**

8. Exemples de plantes médicinales à effet inhibiteur d'α-amylase et α-glycosidase

La recherche de composés naturels capables de mimer l'acarbose (souvent des polyphénols, des flavonoïdes ou des tanins) est en pleine expansion afin de limiter les effets secondaires digestifs (flatulences, ballonnements) liés à l'acarbose synthétique **(Syzygium *et al.*, 2021)** Les plantes suivantes sont dotées de propriétées inhibitrices des enzymes digestives :

- ***Cucurbita pepo* (Courge/Graines de citrouille) :** Les extraits de graines de courge, riches en composés phénoliques, tocophérols et cucurbitacines, démontrent une excellente activité inhibitrice double (sur l'α-amylase et l'α-glucosidase), ce qui valide scientifiquement leur usage traditionnel dans la gestion du diabète **(Jambolan *et al.*, 2023).**
- ***Camellia sinensis* (Thé vert) :** Les feuilles de thé vert contiennent de fortes concentrations de catéchines, notamment l'épigallocatéchine gallate (EGCG). Les groupements galloyle de ces molécules se lient aux protéines enzymatiques, modifiant leur conformation tridimensionnelle et bloquant l'accès au substrat (**Tadera *et al.*, 2006).**
- ***Syzygium cumini* (Prunier de Java/Jambolan) :** Les extraits d'écorce et de graines de cette plante tropicale sont riches en acides gallique et ellagique, ainsi qu'en anthocyanes. Ils exercent une inhibition robuste de l'α-glucosidase intestinale, souvent supérieure à celle de l'acarbose lors de tests comparatifs *in vitro* **(Tedera *et al.*, 2006).**

Chapitre III : Les Graines de Courge

1. Rappels botaniques et origines

La graine de courge est une graine dicotylédone produite par les plantes du genre Cucurbita.

- **Formation :** Elle se développe à l'intérieur de la cavité centrale du fruit (une baie à péricarpe épais appelée péponide).
- **Structure :** Elle est composée d'une amande riche en lipides et protéines, entourée d'un tégument souvent lignifié (la coque).
- **Particularité :** Il existe des variétés dites "sans coque" dont le tégument est réduit à fine membrane facilitant l'extraction de l'huile **(Bardaa *et al.*, 2016).**

2. Classification botanique

La graine de courge appartient à la famille des Cucurbitaceae. Bien qu'il existe de nombreuses espèces de courges, la majorité des graines consommées pour leurs propriétés thérapeutique proviennent de l'espèce de *Cucurbita pepo* et plus particulièrement de la variété *Cucurbita pepo* ver. styriaca .

- Famille : Cucurbitaceae.
- Genre : Cucurbita.
- Genre especes scientifique : *Cucurbita Pepo* **(Bardaa *et al.*, 2016).**

3. Noms de la graine de *cucurbita pepo* dans différentes régions d'Algérie

Le Centre (Alger, Blida...) et l'Ouest (Oran, Tlemcen...) : On utilise majoritairement le terme Zri'et el kabouya (زريعة الكابويا), "zri'a" signifiant graines et "kabouya" désignant la courge ou la citrouille.

L'Est (Constantine, Annaba, Sétif...) : On l'appelle souvent Zri'et el jrayri (زريعة الجرايري) ou simplement Zri'at el qra'a (زريعة القرعة).

En Kabylie (Tizi Ouzou, Béjaïa) : Le fruit est nommé Takhsayt ou Takhlout, et ses pépins sont appelés A'eqqa n tekhsayt (أعقا ن تخسايت).

Dans le Sud : On retrouve l'appellation Zri'et el khardel (dans certaines oasis) ou plus classiquement Boudhour el qra'a (بذور القرع) sous une forme plus proche de l'arabe littéral.

Dans le langage commercial et chez les herboristes (attarine) à travers tout le pays, vous la trouverez aussi sous le nom générique de بذور اليقطين (Boudhour el yaqteen) ou بذور القرع (Boudhour el qra'a**) (Baba Aissa, 1999).**

4. Description de la graine

La graine de courge (*Cucurbita Pepo*) est, d'un point de vue botanique, une semence oléagineuse issue d'un fruit de type baie à péricarpe épais (péponide). Voici une description détaillée de sa morphologie et de sa structure **(Dotto et Chacha, 2020).**

A. Morphologie externe



Figure 3: Morphologie des graines de courge (Dotto et Chacha, 2020).

La graine se présente sous une forme ovoïde et aplatie, se terminant par une extrémité légèrement pointue où se situe le micropyle.

- Le tégument : C'est l'enveloppe protectrice externe. Chez la plupart des variétés, il est lisse, coriace et de couleur blanc-crème ou jaunâtre.
- Les dimensions : Elles varient selon les cultivars, mais mesurent généralement entre 10 et 20 mm de longueur.
- Variété "sans écale" : Il existe des variétés (comme la courge de Styrie) dont les graines subissent une mutation génétique empêchant la lignification du tégument. Elles apparaissent alors vert foncé, car la membrane est fine et laisse voir la chlorophylle des tissus internes **(Montesano *et al.*, 2018).**

B. Composition chimique des graines

La graine de courge (*Cucurbita pepo*) est reconnue comme une source exceptionnelle de nutriments essentiels et de composés phytochimiques. Voici une synthèse de sa composition physicochimique **(Syed *et al.*, 2019).**

a. Profil lipidique :

Les lipides représentent environ 40 % à 50 % de la masse totale de la graine. L'huile de pépins de courge est caractérisée par une forte proportion d'acides gras insaturés (environ 75-80 %).

- **Acides gras polyinsaturés (AGPI) :** Principalement l'acide linoléique (Oméga-6), représentant 35 % à 55 %.
- **Acides gras monoinsaturés (AGMI) :** Acide oléique (Oméga-9), entre 25 % et 38 %.
- **Acides Gras Saturés (AGS) :** Acide palmitique (9-13 %) et acide stéarique (5-7 %).

L'huile de courge est caractérisée par une forte dominance d'acides gras essentiels :

- **Acide linoléique (Oméga-6) :** 40−60%
- **Acide oléique (Oméga-9) :** 25−40%
- **Acide palmitique :** 10−15% **(Mentesano *et al.*, 2018)**

Tableau 5: Les Valeurs typique pour l'huile de *Cucurbita pepo* (Mentesano *et al.*, 2018)

Paramètre	Signification	Valeurs usuelles
Indices d'acides	Etat de dégradation (lipolyse)	4 mg KOH/g
Indices de péroxyde	Etat d'oxydation primaire	10meq O_2/kg
Indices de saponification	Longueur moyenne des chaines grasses	185-198 mg KOH/g
Indices diode	Degré d'insaturation globale	110-130g 12/100g

b. Profil protéique :

Les graines de courge sont une source de protéines de haute qualité, constituant 25 % à 35 % de la graine.

- **Acides aminés :** Elles contiennent tous les acides aminés essentiels, avec des teneurs particulièrement élevées en arginine, acide glutamique et acide aspartique **(Medjakovic *et al.*, 2016).**

c. Micronutriments :

La graine de courge est un "super-aliment" minéral, particulièrement riche en cofacteurs enzymatiques.

- **Magnésium :** Essentiel pour les réactions biochimiques et la régulation du stress.
- **Zinc :** Crucial pour l'immunité et la santé prostatique.
- **Fer :** Teneur élevée pour une source végétale.
- **Phosphore et Potassium.**

- **Vitamines :** Présence notable de vitamine E (tocophérols) et de vitamines du groupe B (B1, B2, B6). **(Medjakovic *et al.*, 2016).**

C. Composés Bioactifs :

Ces composés confèrent à la graine ses propriétés antioxydantes et thérapeutiques.

- **Phytostérols :** Principalement le β-sitostérol. Sa structure proche du cholestérol aide à réguler la cholestérolémie et soutient la fonction urinaire.
- **Composés phénoliques :** Acides phénoliques et flavonoïdes qui luttent contre le stress oxydatif cellulaire.
- **Tocophérols :** (α, γ, et δ-tocophérol) agissant comme des antioxydants puissants protégeant les membranes cellulaires **(Gossell *et al.*, 2019).**

5. Intérêts thérapeutiques et pharmacologiques

Les graines de courge (*Cucurbita Pepo*) sont reconnues depuis longtemps en pharmacognosie pour leur richesse en composés bioactifs, notamment les phytostérols, les acides gras insaturés, les tocophérols et les minéraux comme le zinc **(Adams *et al.*, 2022).**

Voici une synthèse des intérêts thérapeutiques et pharmacologiques selon vos axes :

✓ Santé du système urinaire

C'est l'utilisation la plus documentée cliniquement. Les graines de courge sont principalement indiquées dans le traitement des troubles de la miction liés à l'hypertrophie bénigne de la prostate.

- **Mécanisme :** Les phytostérols (notamment le Δ7-stérol) inhibent la 5-alpha-réductase, bloquant ainsi la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT), responsable de la croissance prostatique.
- **Vessie :** Elles améliorent également les symptômes de la "vessie hyperactive" en renforçant les muscles du plancher pelvien, elle réduit l'irritabilité de la vessie et améliore le flux urinaire **(Fruhwirth *et al.*, 2017 ; Akiene *et al.*, 2022)**

✓ Activité antioxydante

Les graines de courge agissent comme un bouclier contre le stress oxydatif grâce à une synergie de molécules (vitamine E et composés phénoliques).

Elles permettent la neutralisation des radicaux libres et réduisent la peroxydation lipidique. Cette activité est cruciale pour prévenir les dommages cellulaires liés aux maladies chroniques et au vieillissement prématuré **(Fruhwirth *et al.*, 2017 ; Akiene *et al.*, 2022)**

✓ **Propriétés métaboliques**

L'impact métabolique des graines de courge concerne principalement la gestion du glucose et des lipides.

- **Effet antidiabétique :** Des études suggèrent que les protéines et les polysaccharides des graines ont des effets hypoglycémiants, aidant à réguler la glycémie postprandiale. **(Hajhashemi *et al.*, 2019).**
- **Effet hypolipidémiant :** Grâce à leur teneur élevée en acide linoléique (Oméga-6) et en phytostérols, elles contribuent à la réduction du cholestérol LDL ("mauvais cholestérol") et à l'amélioration du ratio HDL, prévenant ainsi l'athérosclérose **(Hajhashemi *et al.*, 2019).**

✓ **Effets antiparasitaires**

Traditionnellement, les graines de courge sont utilisées comme vermifuge naturel (particulièrement contre les ténias et les ascaris).

- **La Cucurbitine :** C'est l'acide aminé actif responsable de cette action. Elle ne tue pas directement le parasite mais paralyse son système musculaire, l'empêchant de se fixer aux parois intestinales, ce qui facilite son expulsion par les voies naturelles **(Glossell, 2019) (figure 4).**

  La cucurbitine présente dans les graines possède des propriétés anthelminthiques reconnues, notamment contre les vers solitaires **(Fruhwirth *et al.*, 2017).**

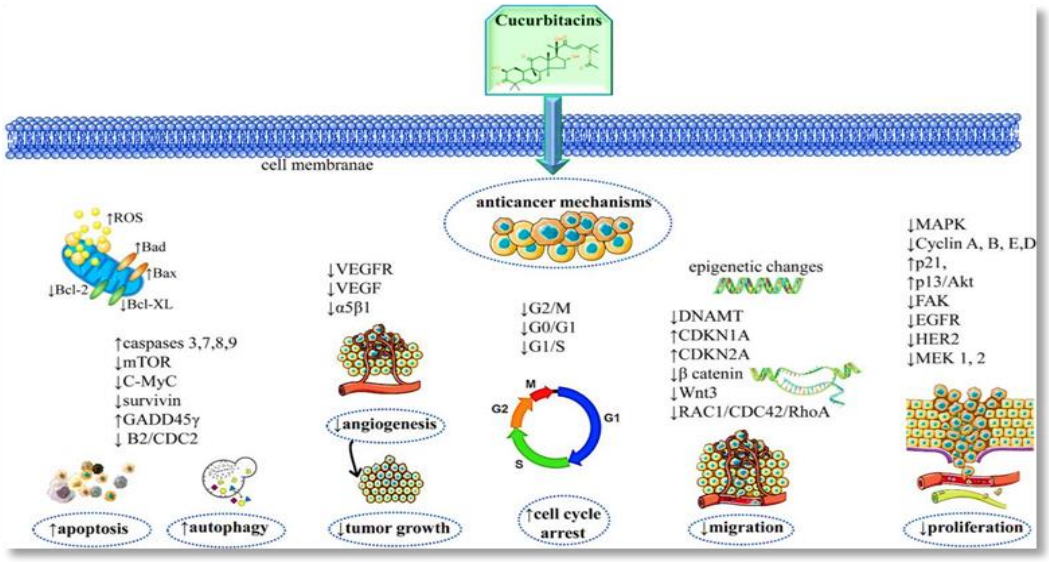


Figure 4: Mécanisme d'action antiparasitaire de la Cucurbitine des graines de courge (Glossell, 2019)

6. Utilisation agroalimentaires et industrielles

Les graines de courge font l'objet d'un intérêt croissant en raison de leur densité nutritionnelle et de leurs propriétés bioactives. Voici une synthèse de leur valorisation dans les secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique **(Syed *et al.*, 2019).**

✓ Valorisation en alimentation humaine

L'intégration des graines de courge dans l'alimentation humaine se fait sous plusieurs formes, portées par leur richesse en protéines (25-35%), en acides gras insaturés et en micronutriments (zinc, magnésium) **(Syed *et al.*, 2019).**

✓ Ingrédients fonctionnels et snacks

- Consommation directe : Graines entières grillées ou séchées, utilisées comme snacks ou garnitures (salades, soupes).
- Boulangerie et pâtisserie : Incorporation de graines entières ou de farine de tourteau (résidu après extraction de l'huile) pour enrichir le pain et les biscuits en protéines et en fibres.

✓ Huile de pépins de courge

Considérée comme une huile de spécialité, elle est extraite par pression à froid. Elle est riche en acide linoléique (Oméga-6) et en acide oléique (Oméga-9). Son goût de noisette intense la rend populaire pour l'assaisonnement **(Bucar *et al.*, 2016).**

✓ **Substituts de protéines végétales**

La farine de graines de courge est utilisée comme émulsifiant naturel dans certaines préparations de viande ou comme base pour des compléments protéinés destinés aux sportifs et aux régimes végétariens **(Rezig *et al.*, 2012).**



Figure 5: Exemples de valorisation nutritionnelle et applications alimentaires des graines de *Cucurbita Pepo* (Pain, Biscuits Et Produits de boulangerie).

7. Application cosmétique :

L'huile de graines de courge est un ingrédient précieux pour les soins de la peau et des cheveux :

- **Propriétés anti-âges :** Sa teneur élevée en vitamine E (tocophérols) et en caroténoïdes protège les cellules contre le stress oxydatif.
- **Soin capillaire :** Des études suggèrent que l'huile peut freiner la chute des cheveux en inhibant l'enzyme 5-alpha réductase.
- **Hydratation :** Les acides gras essentiels renforcent la barrière lipidique cutanée. **(Fruhwirth *et al.*, 2017).**



- **Figure 6: Produits cosmétiques formules à base d'huile de graines de courge et leurs applications dermatologiques et capillaires (Fruhwirth *et al.*, 2017)**

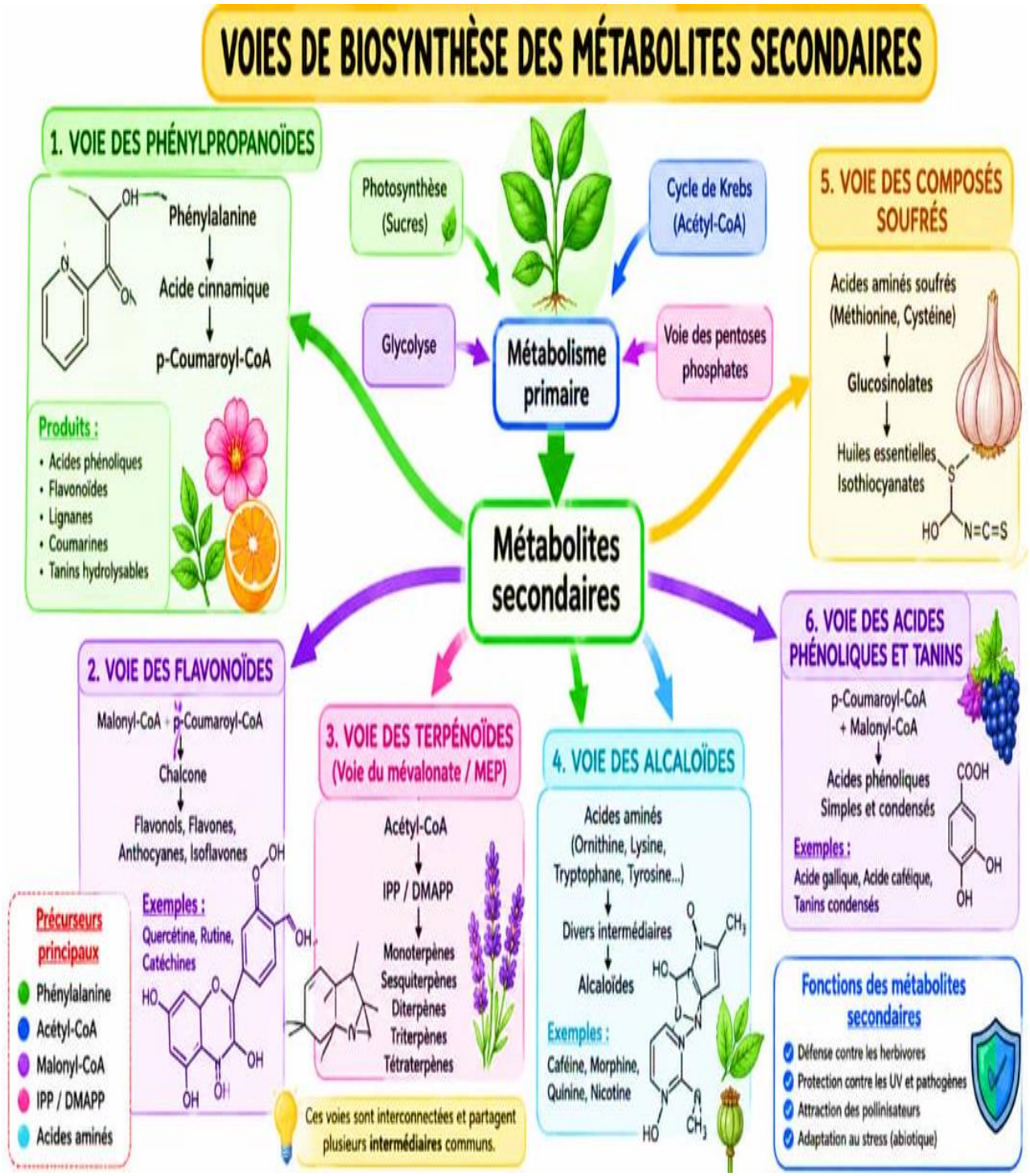
Chapitre IV : Les Métabolites Secondaires

Les métabolites secondaires (également appelés métabolites spécialisés) sont des composés organiques synthétisés par les plantes, les champignons et les micro-organismes. Contrairement aux métabolites primaires (glucides, lipides, protéines), ils ne participent pas directement à la croissance, au développement ou à la reproduction de l'organisme. Cependant, ils sont essentiels à sa survie à long terme et à ses interactions avec l'environnement **(Bruneton, 2016).**

1. Caractéristiques principales

- **Diversité structurale immense :** Il existe des centaines de milliers de métabolites secondaires différents, souvent spécifiques à une famille, un genre ou même une espèce précise.
- **Production restreinte :** Ils sont souvent synthétisés dans des types cellulaires spécifiques, à des stades de développement particuliers ou en réponse à des stress environnementaux.
- **Coût énergétique :** Leur biosynthèse demande beaucoup d'énergie à l'organisme, ce qui prouve leur importance adaptative **(Taiz *et al.*, 2015).**

La figure 7 illustre les voies biosynthétiques des métabolites secondaires, ainsi les figures 8 et 9 représentes les principales structures des composes phénoliques et précurseur biosynthétique.



- **Figure 7: Organigramme récapitulatif des voies biosynthétiques des métabolites secondaires (Taiz *et al.*, 2015)**

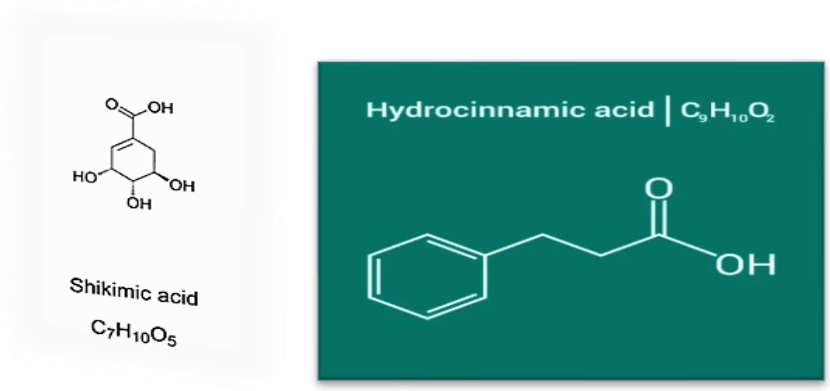


Figure 8: Structure chimique de quelques composés phénoliques et précurseurs biosynthétiques(Wink, 2010).

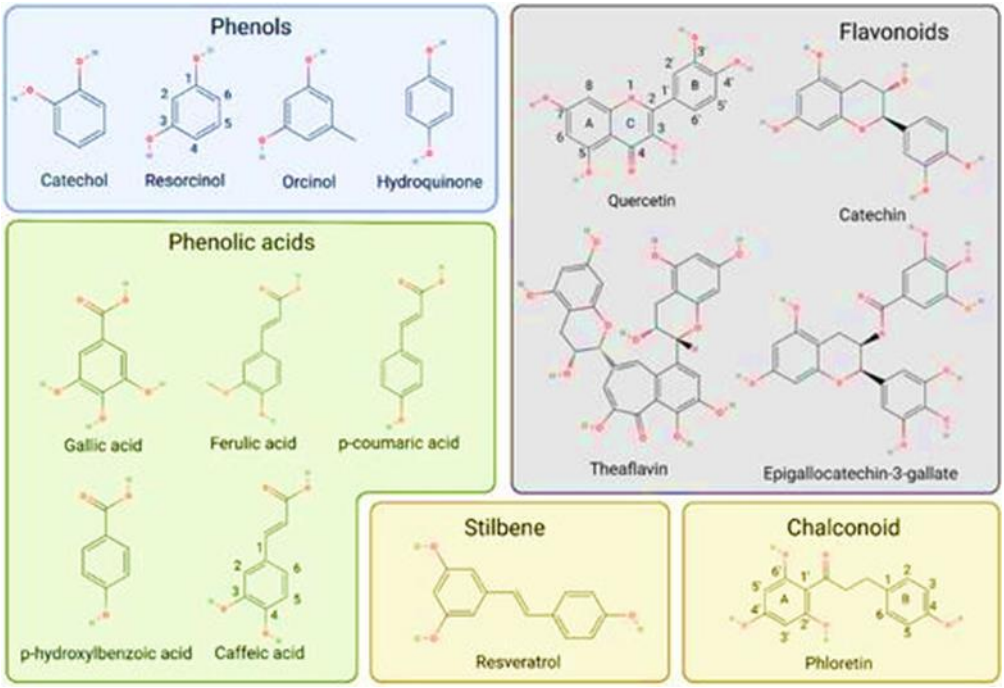


Figure 9: Les principales structures des composés phénoliques(Wink, 2010)

2. Rôles Ecologiques et biologiques

Les métabolites secondaires servent d'interface entre l'organisme et son environnement. Leurs fonctions principales incluent :

- **Défense contre les prédateurs :** Rôle de répulsif ou de toxine contre les herbivores, les insectes et les mollusques.
- **Défense antimicrobienne :** Propriétés antifongiques, antibactériennes et antivirales pour bloquer les agents pathogènes.

- **Allélopathie :** Inhibition de la croissance des plantes concurrentes voisines.
- **Attraction :** Pigments (anthocyanes) et molécules volatiles (terpènes) pour attirer les pollinisateurs ou les disperseurs de graines.
- **Protection contre les stress abiotiques :** Écrans contre les rayons UV (flavanols) ou antioxydants contre le stress hydrique et thermique **(Wink, 2010).**

3. Classification chimique

Les métabolites secondaires sont classés en trois grands groupes biosynthétiques :

3.1. Les Composés phénoliques

Caractérisés par la présence d'au moins un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyle (−OH).

- **Exemples :** Flavonoïdes, tanins, coumarines, lignines.

Rôles : Pigmentation, antioxydants, protection UV.

3.2. Les Terpénoïdes (ou Isoprénoïdes)

Formés par l'assemblage d'unités à 5 atomes de carbone (l'isoprène). C'est la classe la plus vaste.

- **Exemples :** Huiles essentielles (monoterpènes), caroténoïdes, saponines, caoutchouc.

Rôles : Volatils attractifs/répulsifs, hormones végétales (gibbérellines).

3.3. Les Composés azotés

Molécules contenant un ou plusieurs atomes d'azote.

- **Exemples :** Alcaloïdes (caféine, morphine, nicotine, cocaïne), glucosinolates, glycosides cyanogènes.

Rôles : Toxines puissantes pour la défense contre les herbivores

La figure 10 représente un organigramme récapitulatif qui résume les principales classes des composées phénoliques.

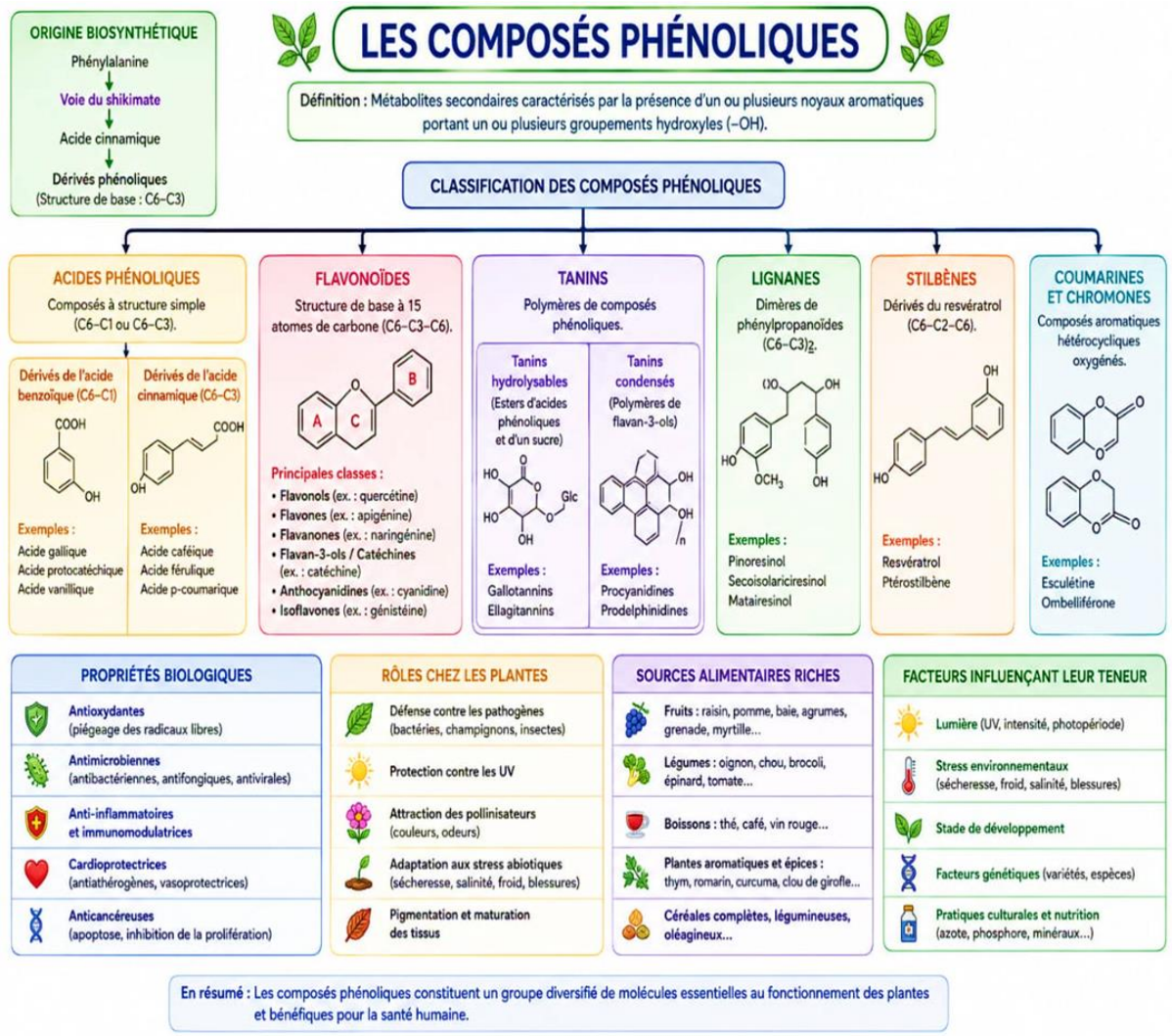


Figure 10: Les principales classes des composées phénoliques (Mcgrowder, 2019)

4. Importance économique et pharmacologique des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires constituent une source précieuse de molécules bioactives largement exploitées dans les domaines pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique et agricole. Sur le plan économique, ils sont utilisés comme colorants naturels, arômes, parfums, conservateurs alimentaires et biopesticides, contribuant ainsi au développement de nombreuses industries. Les composés phénoliques, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpènes et les tanins sont particulièrement recherchés pour leurs propriétés biologiques et leur forte valeur commerciale. De nombreuses plantes médicinales doivent leur intérêt économique à la présence de ces métabolites, qui font l'objet d'une production et d'une commercialisation à grande échelle.

Sur le plan pharmacologique, les métabolites secondaires présentent une grande diversité d'activités biologiques. Ils possèdent notamment des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antivirales, antifongiques, anticancéreuses et antidiabétiques. Plusieurs médicaments importants sont issus directement de ces composés naturels ou de leurs dérivés. Par exemple, la morphine est utilisée comme analgésique puissant, la quinine comme antipaludique, et le paclitaxel comme agent anticancéreux. Les composés phénoliques et les flavonoïdes contribuent également à la prévention de nombreuses maladies associées au stress oxydatif, notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Ainsi, les métabolites secondaires représentent une ressource essentielle pour la découverte de nouveaux médicaments et pour l'amélioration de la santé humaine **(Wink, 2014).**

Pour l'être humain, les métabolites secondaires sont une mine d'or :

- **Médecine :** Plus de 50 % des médicaments actuels sont dérivés de produits naturels (ex : le paclitaxel/Taxol contre le cancer, la quinine contre le paludisme).
- **Agriculture :** Utilisation comme biopesticides ou biostimulants naturels.
- **Alimentation et cosmétique :** Arômes, parfums, colorants naturels et conservateurs (antioxydants) **(Moller, 2015).**

5. Fonctions des métabolites secondaires

5.1. Protection contre le stress oxydatif au niveau de la cellule humaine

Lors de stress environnementaux (UV, sécheresse, métaux lourds), la cellule accumule des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Des métabolites comme les composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénoliques) agissent directement dans le cytosol comme antioxydants en piégeant ces radicaux libres, protégeant ainsi les macromolécules (ADN, protéines et lipides membranaires) de la dégradation **(Mcgrowder, 2019).**

5.2. Protection contre le stress oxydatif au niveau de la cellule végétale

5.2. 1. Défense contre les microorganismes et les herbivores : Les métabolites secondaires (**Exemples :** alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques) protègent la cellule végétale contre :

- ✓ Les Bactéries,
- ✓ Les Champignons,
- ✓ Les Insectes,
- ✓ Les Parasites.

5.2.2. Défense chimique (Compartimentation et toxicité)

- **Stockage vacuolaire :** De nombreux alcaloïdes, glycosides et anthocyanes sont séquestrés dans la vacuole pour éviter l'autotoxicite.
- **Mécanisme de défense :** En cas d'attaque par un pathogène ou un herbivore, l'intégrité cellulaire est rompue. Les métabolites entrent en contact avec des enzymes hydrolytiques (souvent situées dans les parois ou les plastes), libérant des composés hautement toxiques (ex. cyanure d'hydrogène, isomères toxiques) qui inhibent la réplication cellulaire du bioagresseur **(Wink, 2015).**

5.2.3. Signalisation cellulaire et fluidité membranaire

- **Stabilisation des membranes :** Les phytostérols (triterpènes) s'insèrent dans la bicouche lipidique cellulaire pour réguler sa fluidité et sa perméabilité face aux variations thermiques.
- **Transduction de signaux :** Certains métabolites agissent comme des molécules signalant l'activation de gènes de défense spécifiques via des voies de transduction intracellulaires (impliquant souvent l'acide jasmonique ou l'acide salicylique) **(Wink, 2015).**

5.2.4. Protection contre le stress oxydatif

Les composés phénoliques et flavonoïdes agissent comme antioxydants en neutralisant les radicaux libres dans la cellule (figure 11).

Le stress oxydatif chez les végétaux résulte d'une accumulation excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (•OH). Ces molécules sont produites naturellement au cours du métabolisme cellulaire, mais leur concentration augmente fortement sous l'effet de divers stress biotiques et abiotiques, notamment la sécheresse, la salinité, les températures extrêmes, les rayonnements UV et les attaques pathogènes. Pour se protéger, les plantes ont développé un système de défense antioxydant complexe comprenant des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques. Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et les peroxydases (POD), qui neutralisent les ERO et limitent leurs effets délétères sur les membranes cellulaires, les protéines et l'ADN. Par ailleurs, des composés non enzymatiques tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les caroténoïdes, l'acide ascorbique (vitamine C) et le glutathion participent activement à la protection cellulaire en piégeant les radicaux libres. Grâce à ces mécanismes de défense, les végétaux maintiennent l'équilibre redox

cellulaire et préservent leur croissance ainsi que leur développement face aux conditions environnementales défavorables **(Apel et Hirt, 2019).**

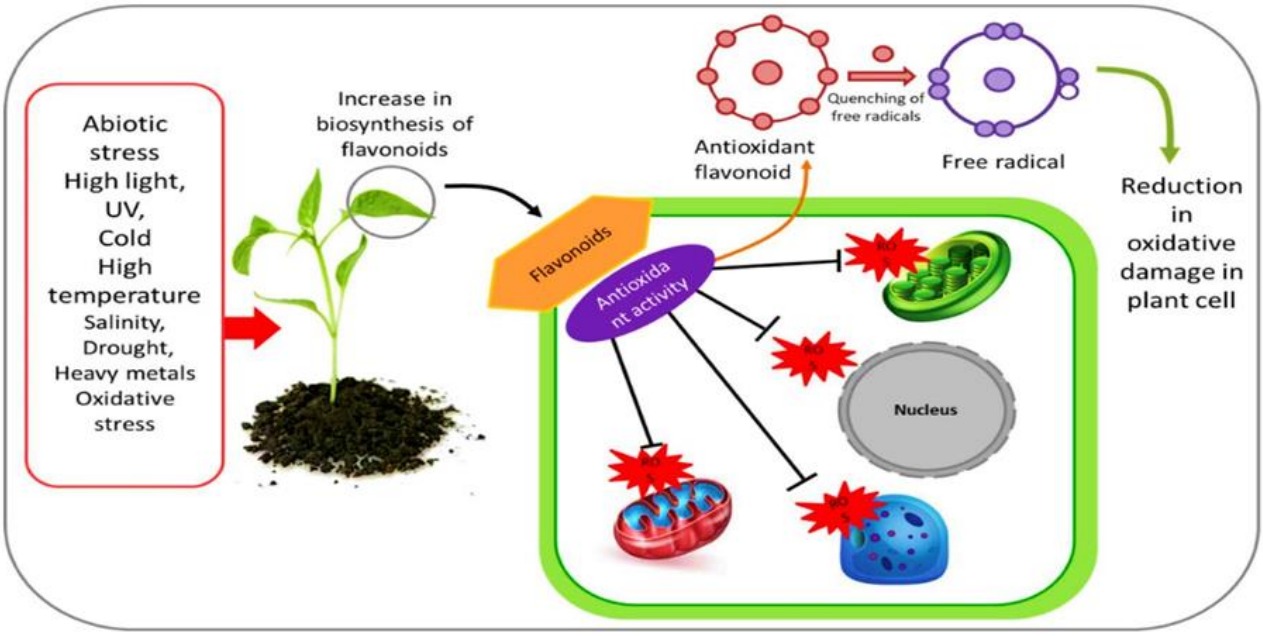


Figure 11: Mécanisme de l'activité antioxydante des flavonoïdes dans la cellule végétal(Apel et Hirt, 2019)



Partie expérimentale

Matériel et méthodes



L'évaluation des activités biologiques de notre extrait végétal a été entièrement réalisée au sein **du laboratoire de recherche "Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie, Synthèse et activité biologique**. Afin de valoriser quelques activités biologiques des graines *Cucurbita pepo,* les différentes étapes méthodologiques allant de la préparation des extraits jusqu'à la mise en évidence de leurs potentiels antioxydant et inhibiteur de l'α-amylase ont été menés selon des protocoles standardisés détaillés.

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de graines de *Cucurbita pepo* achetées auprès d'un herboriste local de la wilaya de Tlemcen. Les graines ont été sélectionnées sur la base de leur intégrité physique et de l'absence de signes visibles d'altération.

Avant leur utilisation, les graines ont été soigneusement nettoyées afin d'éliminer les impuretés et les matières étrangères, puis séchées et à température ambiante, à l'abri de la lumière. L'échantillon séché été broyés à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène La poudre obtenue a été conservée dans des récipients hermétiquement fermés et stockée dans un endroit sec jusqu'à son utilisation pour les différentes analyses physicochimiques et biologiques (figure 12).



Figure 12:Graines de *Cucurbita pepo* avant et après broyage

(Photo prise au laboratoire).

2. Préparation des extraits de *Cucurbita pepo*

Dans le but d'évaluer les activités antioxydante et antidiabétique des graines de *Cucurbita pepo*, trois extraits ont été préparés : un extrait aqueux, un extrait hydroéthanolique et un extrait hydroacétonique.

2.1. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux a été obtenu par décoction sous reflux. Une masse de 20 g de poudre de graines de *Cucurbita pepo* a été introduite dans un ballon contenant 200 mL d'eau distillée. Le mélange a été porté à ébullition sous reflux pendant 1 heure afin de favoriser l'extraction des composés bioactifs hydrosolubles Après refroidissement à température ambiante, le mélange a été filtré puis séché à sec à 40°C.

2.2. Préparation de l'extrait hydroéthanolique

L'extrait hydroéthanolique a été préparé selon le même protocole précédent dont 20 g de poudre de graines de *Cucurbita pepo* ont été mélangés avec 200 mL d'un mélange eau/éthanol (30:70, v/v). Le mélange a été soumis à une décoction sous reflux pendant 1 heure. Après refroidissement à température ambiante, l'extrait a été filtré puis concentré à 50°C. La phase aqueuse obtenue à été séchée à sec à 40°C.

2.3. Préparation de l'extrait hydroacétonique

Pour la préparation de l'extrait hydroacétonique, 20 g de poudre de graines ont été ajoutés à 200 ml d'un mélange eau-acétone (30:70, v/v). L'extraction a été réalisée par décoction sous reflux pendant 1 heure. Après refroidissement à température ambiante, l'extrait a été filtré puis concentré à 50°C. La phase aqueuse obtenue à été séchée à sec à 40°C.

Le protocole expérimental adopté pour l'extraction des composée bioactifs des graines de *Cucurbita pepo* et l'évaluation de leur propriété phytochimique est présenté dans l'organigramme ci-dessous (figure 13).

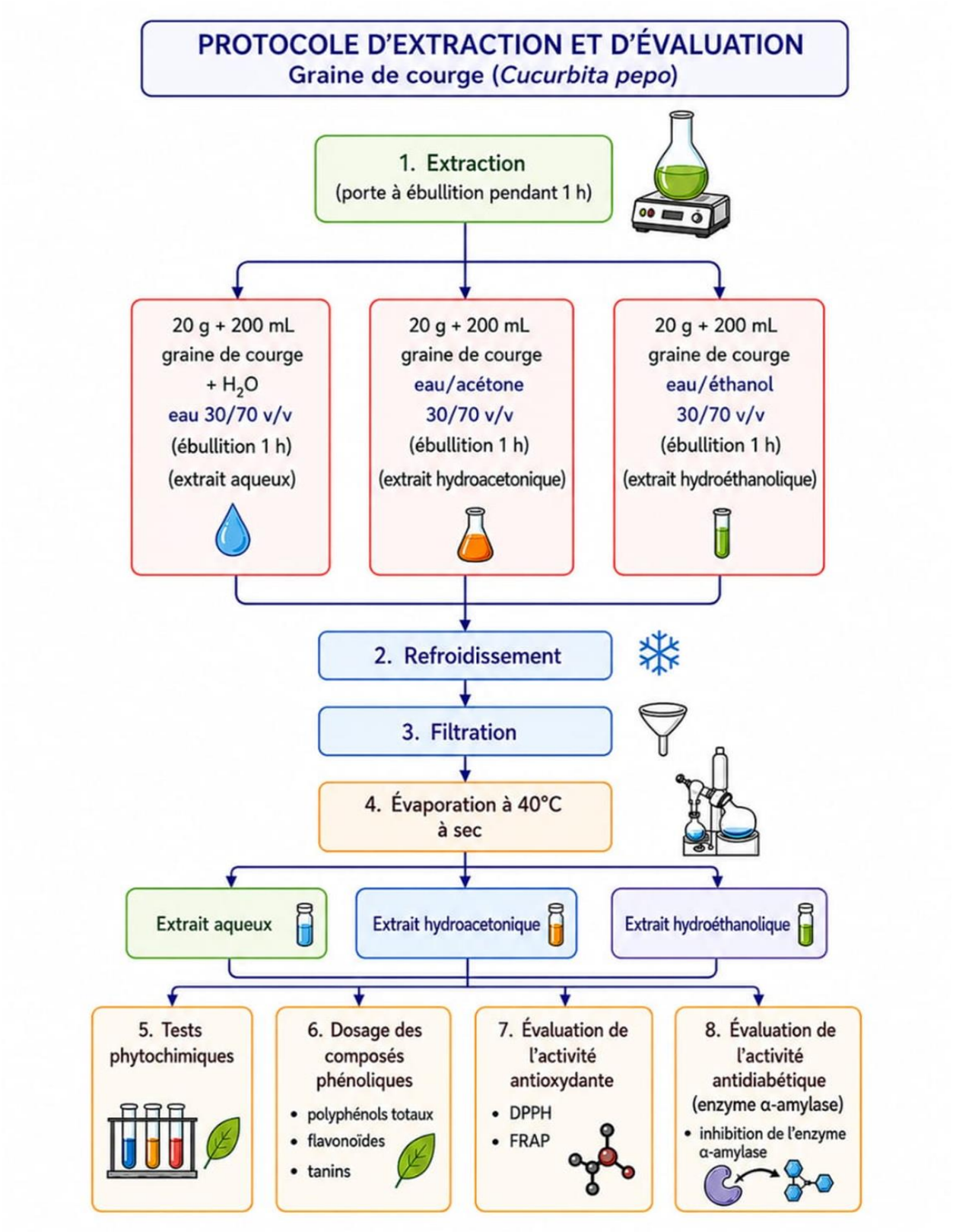


Figure 13: Schéma récapitulatif du protocole expérimental réalisé sur les graines de *Cucurbita pepo*.

3. Analyse phytochimique

Les extraits préparés ont été soumis à des tests de coloration et de précipitation en tubes, afin de détecter la présence ou l'absence des groupes de familles chimiques **(Harborne 1998 ; Bruneton, 1999)**.

- **Les tanins**

Pour caractériser les tanins, 1 mL de chaque extrait a été mélangé avec 0,25 mL d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ (1 %), le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 min. L'apparition d'une couleur bleu-noirâtre ou verdâtre indique la présence des tanins.

- **Les Flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont été recherchés en ajoutant pour chaque volume d'extrait 1 mL d'acide chlorhydrique concentré (HCl) puis quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une couleur rouge, orange ou rose indique la présence des flavonoïdes.

- **Les quinones libres**

Dans un tube à essai, 0,1 mL hydroxyde de sodium (NaOH à 1 %) a été ajouté à 1 mL de chaque extrait a analysé. L'apparition d'une couleur jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libre.

- **Les anthraquinones**

Les anthraquinones ont été mises en évidence en ajoutant 1 mL de NH_4OH (10 %). Après agitation, l'apparition d'une couleur violette, indiquée la présence des anthraquinones.

- **Les terpénoïdes**

Les terpénoïdes ont été recherchés à l'aide du test de Slakowski en ajoutant 0,4 mL de chloroforme et 0,6 mL d'acide sulfurique concentré à 1 mL d'extrait. L'apparition de deux phases et une couleur marron à l'interface indiquent la présence de terpénoïdes.

- **Les saponosides**

Les saponosides ont été recherchés par le test de mouse, après agitation de 10 mL de chaque extrait, une mouse supérieur à 1cm et qui persiste entre 10 et 20 min confirme la présence des saponosides.

- **Les alcaloïdes**

Les tests ont été réalisés par des réactions de précipitation avec le réactif de Mayer et Wagner**.** Dans deux tubes contenant 0,5 mL d'extrait, 0,5mL de réactif de Mayer était ajouté dans le premier tube et 0,5 mL de réactif de Wagner dans le deuxième. L'apparition d'un précipité blanc et marron indique la présence des alcaloïdes.

- **Les composés réducteurs**

Leur détection consiste à introduire 1 mL d'extrait dans un tube à essai, puis 2 mL de liqueur de Fehling (1 mL de réactif A et 1 mL de réactif B). Ensuite, l'ensemble était porté au bain-marie bouillant durant 10 min. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

4. Dosage des composés phénoliques

4.1. Dosage de polyphénols totaux

a. Principe

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par Vermerius et Nicholson en 2006. Le réactif utilisé est le Folin-Ciocalteu, qui est un mélange d'acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune.

Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif précédent. Elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 725 nm **(Vermerius et Nicholson, 2006)** .

b. Mode opératoire

- 0,1 mL de chaque extrait est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% ;
- Les tubes sont agités puis incubés pendant 5 min ;
- 100 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange ;
- Les tubes sont incubés pendant 30 min à température ambiante ;
- La lecture des densités optiques est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc à 700 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,8 et 1 mg/mL).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g E).

4.2. Dosage des Flavonoïdes

a. Principe

Le dosage des flavonoïdes est réalisé selon la méthode décrite par Ardestani et Yazdanparast en 2007.

C'est une méthode spectrophotométrique utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et la soude (NaOH) qui forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm **(Ardestani et Yazdanparast, 2007).**

.

b. Mode opératoire

- 500 µL de chaque extrait sont mélangés avec 2 mL d'eau distillée ;
- 150 µL d'une solution de nitrite de sodium ($NaNO_2$) à 15 % sont ajoutés au mélange ;
- Les tubes sont incubés pendant 6 min à température ambiante ;
- 150 µL de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 10% sont ajoutés ;
- Les tubes sont incubés pendant 6 min à température ambiante ;
- 2 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% sont ajoutés immédiatement ;
- Le volume total est ajusté à 5 mL avec l'eau distillée ;
- Les tubes sont agités, puis incubés pendant 15 min ;
- La lecture des densités optiques est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc à 510 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4; 0,5 ; 0,6 ; 0,8 et 1 mg/mL).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EQC/gE).

4.3. Dosage des tanins

a. Principe

Le dosage des tanins condensés est réalisé selon la méthode utilisant la vanilline. En milieu acide, les tanins condensés se dépolymérisent et par réaction avec la vanilline se transforment en anthocyanidols de couleur rouge. mesurables par spectrophotométrie à 500 nm **(Sun *et al.*, 1998)**.

b. Mode opératoire

- 50 µL de chaque extrait est mélangé avec 1500 µL de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v) ;
- Les tubes sont agités, ensuite 750 µL d'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné ;
- Le mélange est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min ;
- La lecture de l'absorbance est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc à 550 nm ;

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,1; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 ; 1 mg/mL).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EQC/g E).

4.4. Expression des résultats

Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés, sont calculées selon la formule suivante :

$$T = a*f/b$$

T : Teneur en composés phénoliques ;

a : Concentration à partir de la courbe d'étalonnage respective ;

f : Facteur de dilution ;

b : Concentration initiale de l'extrait.

5. Evaluation de l'activité antioxydante

5.1. Piégeage du radical libre DPPH· (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

a. Principe

Le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), est un radical libre instable qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 515 à 520 nm **(Bandoniene *et al.*, 2002 ; Gazi *et al.*, 2004).**

Afin de mesurer la capacité à réduire le radical DPPH• par des molécules dites « antioxydante », le test consiste à mettre une solution méthanolique de DPPH• de couleur violette à une concentration connue, en présence de différentes concentrations de la molécule testée. La forme réduite de couleur jaune n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à la longueur d'onde définie (515 nm) **(Atoui *et al.*, 2005 ; Majheniç *et al.*, 2007).**

b. Mode opératoire

- 50 µL de chaque extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 1950 µL d'une solution méthanolique de DPPH• à (6,34. 10^{-5} M) ;
- Pour chaque concentration un blanc est préparé contenant 50 µL de chaque extrait et 1950 µL de méthanol ;
- Le contrôle négatif est préparé, en mélangeant 50 µL de méthanol avec 1950 µL d'une solution méthanolique de DPPH• ;
- Après incubation à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre;
- L'acide ascorbique, est utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires.

c. Expression des résultats

✓ **Calcul des pourcentages d'inhibition**

Les résultats du test DPPH• sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculés à partir de la formule suivante :

$$\% I = [(AC - AT)/ AC] \times 100$$

% I: Pourcentage d'inhibition.

AC : Absorbance du contrôle.

AT : Absorbance du test effectué. .

✓ **Calcul des IC_{50}**

L'IC_{50} (concentration inhibitrice de 50%) est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH•.

Les IC_{50} sont calculées graphiquement par les régressions logarithmiques ou linéaires des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés. **(Maisuthisakul *et al.*, 2007 ; Fabri *et al.*, 2009 ; Scherer *et al.*, 2009)**.

5.2. Réduction du fer par la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

a. Principe

L'activité réductrice du fer des extraits est déterminée selon la méthode décrite par (**Oyaizu, 1986)**, qui est basée sur la réaction chimique de réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). La densité du milieu réactionnel de la couleur bleu du complexe ferreux (bleu de prussian due au $FeCl_3$) est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés **(Hubert, 2006 ; Ozturk *et al.*, 2007)**.

b. Mode opératoire

- 1 mL de l'échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) ;
- 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1% sont ajoutés au mélange ;
- Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 minutes, puis refroidi à température ambiante ;

- 2,5 mL de l'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés ;
- Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min ;
- 2,5 mL du surnageant sont ajoutés à 2,5 mL d'eau distillée ;
- 500 µL d'une solution de trichlorure du fer ($FeCl_3$) à 0,1% sont ajoutés en dernier ;
- La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre **(Karagôzler *et al.*, 2008).**
- Le BHA est utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires.

c. Expression des résultats

Pour la méthode FRAP, une augmentation de l'absorbance indique l'augmentation du pouvoir réducteur du fer par les échantillons testés (extraits ou contrôle positif).

A fin de comparer entre le pouvoir réducteur de ces échantillons, le paramètre calculé est l'EC_{50} (Efficience Concentration) ou concentration efficace qui indique la concentration de l'échantillon nécessaire pour obtenir une absorbance de 0,5 sur les graphes [Absorbances=*f*(concentrations)] à 700 nm **(Ferreira *et al.*, 2007 ; Tamuly *et al.*, 2014)**.

6. Evaluation de l'activité inhibitrice de l'α-amylase

L'activité inhibitrice de l'α-amylase a été évaluée selon la méthode de dosage des sucres réducteurs de Bernfeld (1955). Dans un milieu alcalin et à chaud, l'oxydation des groupements aldéhydes et cétones libres des sucres réducteurs, provoque simultanément la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNSA) de couleur jaune orange en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge orange qui absorbe à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel **(Bernfeld, 1955)**

6.1. Préparation des réactifs

- **Réactif 3,5-dinitrosalicylique (DNSA)**

1 g de DNSA est dispersé dans 40 mL d'eau distillée. Ensuite, 30 g de tartrate double de sodium et de potassium sont ajoutés légèrement sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'addition de 20 mL d'une solution de NaOH 2N rend le réactif limpide avec une couleur orange. Le volume obtenu est ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée. Le réactif obtenu est conservé à l'abri de la lumière et à +4°C.

- **Solution de l'α-amylase**

L'enzyme utilisée est l'α-amylase d'*Aspergillus oryzae* (E.C.3.2.1.1) sous forme lyophilisée (Sigma Aldrich), avec une activité spécifique de 30 UI/mg, conservée à 4°C.

L'optimum de l'activité α-amylasique d'*Aspergillus oryzae* est à pH 6 pour une température de 25°C.

L'α-amylase est solubilisé dans le tampon phosphate (0,02 M, pH 6) afin d'obtenir une activité enzymatique finale dans le milieu réactionnel de 1,3 UI/mL.

- **Solution de substrat**

L'amidon utilisé comme substrat de l'α-amylase à été préparé en chauffant initialement 100 mL de tampon phosphate (0,02 M, pH 6) dans un bécher jusqu'à atteindre une température de 60°C. Ensuite, 1 g d'amidon y a été introduit délicatement et de manière progressive, tout en maintenant une agitation continue afin d'assurer sa parfaite solubilisation et d'obtenir une solution homogène à **1%.**

- **Solution de l'acarbose**

L'acarbose « Larimel®50mg » est utilisé dans cette expérience comme contrôle positif (molécule de référence) afin de comparer son activité vis-à-vis de l'α-amylase par rapport à celle des extraits étudiés.

L'acarbose est solubilisé dans le tampon phosphate (0,02 M, pH 6) et les concentrations utilisées sont : 1, 2 , 5 mg/mL.

6.2. Mode opératoire

Cette méthode a été réalisée selon le protocole de **Thalapaneni *et al.*** (2008) :

- **Réaction enzymatique en absence d'inhibiteur**
  - Contrôle négatif : 0,5 mL de tampon phosphate + 0,5 mL d'amidon (1%) + 0,5 ml d'α-amylase
  - Blanc **:** 1 mL de tampon phosphate +0,5 mL d'amidon
- **Réaction enzymatique en présence des extraits**
  - Tube expérimentale : 0,5 mL d'extrait +0,5 ml d'amidon + 0,5 ml d'α-amylase
  - Blanc : 0,5 mL d'extrait +0,5 mL d'amidon + 0,5 mL tampon phosphate
- **Réaction enzymatique en présence d'acarbose**

- Contrôle positif : 0,5 mL d'acarbose + 0,5 d'amidon + 0,5 mL d'α-amylase
- Blanc : 0,5 mL d'acarbose + 0,5 mL d'amidon + 0,5 mL de tampon phosphate

Après ces différentes expériences, chaque tube a été agité et incubé à 25°C pendant 10 min. Après cette incubation 1 mL de DNSA a été ajouté dans chaque tube, ensuite les tubes ont été placés dans un bain mari bouillant pendant 8 min, suivie par un choc thermique dans un bain d'eau glacée afin de stopper la réaction entre le maltose et le réactif DNSA et à la fin, 2 mL de l'eau distillée ont été ajoutés dans chaque tube.

Les densités optiques sont lues par rapport à un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

6.3. Expression des résultats

Les absorbances mesurés ont permis de calculer les pourcentages d'inhibitions de l'α-amylase, en utilisant la formule suivante :

$$\%I = [(AC - AE)/ AC] \times 100$$

% I: Pourcentage d'inhibition.
AC : Absorbance de contrôle négatif
AE : Absorbance de l'échantillon

Résultats et Interprétation

1. Rendement d'extraction

La détermination du rendement d'extraction vise à évaluer l'efficacité des différents systèmes extracteurs (aqueux, eau/éthanol, eau/acétone) dans la récupération des composés extractibles des graines de *Cucurbita pepo*. Cette étude permet de comparer les performances des solvants employés et de sélectionner l'extrait présentant le meilleur potentiel pour les analyses phytochimiques et les essais biologiques ultérieurs **(Tableau 6)**.

Tableau 6: Rendement et caractéristique des différents extraits de *Curcubita pepo*

Extraits	Rendement (%)	Couleur	Aspect	Solubilité
Aqueux	5,50	Laiteux	Cristallisé	Eau distillée
Eau/éthanol	7,00	Vert	Pâte	Eau/éthanol
Eau/acétone	10,30	Vert clair	Pâte	Eau/acétone

D'après le tableau 6, le rendement d'extraction varie entre les trois extraits selon la nature du solvant utilisé, ce qui met en évidence l'influence de la polarité du solvant sur la solubilisation des métabolites.

- L'extrait hydroacétonique présente le rendement le plus élevé de 10,30 %. L'acétone étant un solvant moyennement polaire, cela suggère que les graines de *Cucurbita pepo* sont particulièrement riches en composés de polarité intermédiaire (comme certains flavonoïdes, stérols ou acides gras).
- L'extrait hydroéthanolique affiche un rendement intermédiaire de 7 %. L'éthanol, plus polaire que l'acétone, extrait une gamme différente de molécules (polyphénols plus polaires, glycosides).
- L'extrait aqueux donne le rendement le plus faible de 5,50 %. L'eau étant un solvant très polaire, ce résultat indique que les composés hautement hydrophiles (sucres libres, protéines, certains acides organiques) sont quantitativement moins présents ou moins facilement extractibles dans ces conditions par rapport aux composés moins polaires.

D'après ces résultats l'extrait hydroacétonique se révèle être le solvant le plus performant.

Cette étape permet :

- De quantifier la quantité d'extrait sec obtenu à partir d'une masse donnée de matériel végétal.
- De comparer l'efficacité des trois méthodes d'extraction utilisées.
- D'identifier le solvant le plus performant pour extraire les métabolites bioactifs des graines de *Cucurbita pepo*.
- D'optimiser les conditions d'extraction en vue des analyses phytochimiques et biologiques ultérieures.
- D'établir une relation entre le rendement obtenu et les activités biologiques étudiées (activité antioxydante et activité antidiabétique).

Concernant la couleur, l'extrait aqueux est laiteux, ce qui est caractéristique de la présence possible de suspensions colloïdales, de protéines ou d'émulsions de lipides dans l'eau. Tandis que les extraits organiques (hydroéthanolique et hydroacétonique) présentent des nuances de vert, cela indique la co-extraction de pigments lipophiles, probablement des traces de chlorophylle ou de caroténoïdes présents dans les graines.

L'aspect cristallisé de l'extrait aqueux après évaporation suggère une forte concentration en molécules structurées (comme des sucres ou des sels minéraux). Alors que l'aspect de pâte pour les extraits hydroéthanolique et hydoacétonique est typique des fractions riches en lipides, résines ou huiles essentielles.

2. Résultats de l'analyse phytochimique

Les résultats des testes phytochimiques effectués sur les trois extraits sont compilés dans le tableau 7.

Tableau 7:Résultats des analyses phytochimiques des extraits de *Curcubita pepo*

Extraits / Composant	Aqueux	Eau/éthanol	Eau/acétone
Tanins	-	-	++
Flavonoïdes	-	-	-
Quinones libres	-	-	+++
Anthraquinones	-	-	-
Terpénoïdes	-	-	++
Saponosides	+	+	-
Alcaloïdes	++	++	++
Composés réducteurs	-	-	-

Présence ; (+) Absence ; (-)

Le profil phytochimique des différents extraits de *Cucurbita pepo* met en évidence une variabilité marquée de la composition en métabolites secondaires selon la polarité du solvant d'extraction utilisé. Les extraits aqueux et hydréthanoliques présentent un profil identique, caractérisé par une présence modérée d'alcaloïdes et une faible trace de saponosides, tandis que les autres familles de composés testées y sont totalement absentes. À l'inverse, l'extrait hydroacétonique se distingue par sa richesse et sa diversité moléculaire ; il affiche une forte concentration en quinones libres, une présence modérée de tanins, de terpénoïdes et d'alcaloïdes, mais s'avère dépourvu de flavonoïdes, d'anthraquinones, de saponosides et de composés réducteurs. Cette disparité s'explique par l'affinité différentielle des composés chimiques envers les solvants : l'acétone, de polarité intermédiaire, semble plus efficace pour solubiliser et concentrer une large gamme de principes actifs chez cette plante, notamment les substances moins polaires comme les terpénoïdes et les quinones, ce qui suggère que cet extrait pourrait posséder un potentiel biologique ou pharmacologique plus prononcé que les extraits aqueux et éthanoliques.

3. Teneurs en composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent l'un des groupes les plus importants de métabolites secondaires présents dans les graines de *Cucurbita pepo*. Ils comprennent notamment les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins, reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et leur capacité à neutraliser les radicaux libres.

La concentration en composés phénoliques a été calculée à partir des courbes d'étalonnages établies avec l'acide gallique pour les polyphénols totaux et la catéchine pour les flavonoïdes et les tanins condensés (figures : 14, 15, 16). Les teneurs en composés phénoliques des extraits étudiés sont regroupés dans le tableau 7.

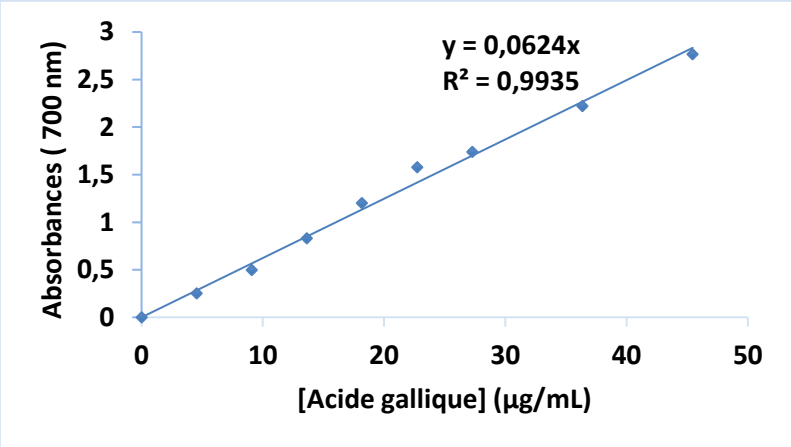


Figure 14: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

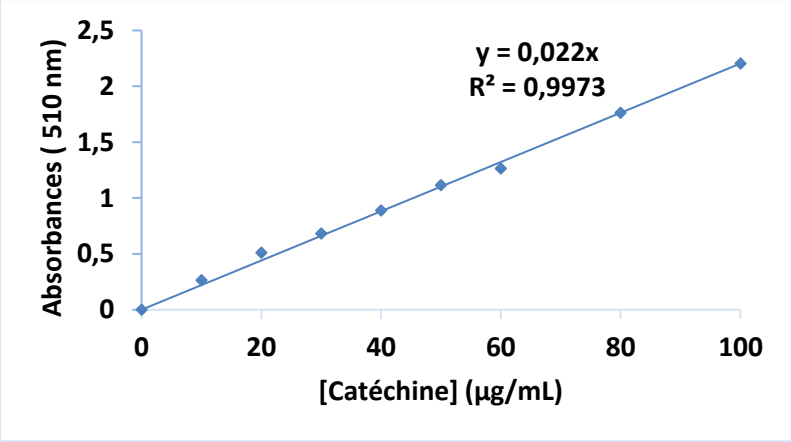


Figure 15: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

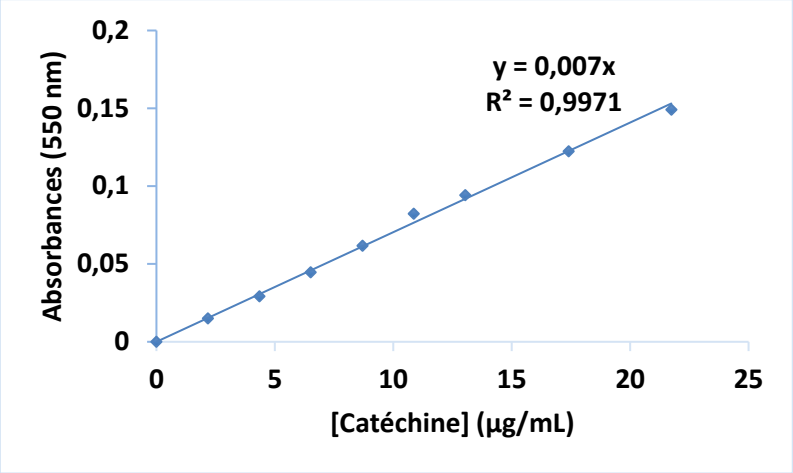


Figure 16: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

Tableau 8:Teneurs en composés phénoliques des différents extraits de *Curcubita pepo*

	Aqueux	Eau/Ethanol	Eau/Acétone
Polyphénols totaux (mg EAG/g E)	**13,28 ± 0,84**	**2,12 ± 0,33**	**18,57 ± 1,39**
Flavonoïdes (mgEQC/g E)	**2,66 ± 1,20**	**0,091 ± 0,03**	**20, 91 ± 1,17**
Tanins (mg EQC/g E)	**172,44 ± 2,24**	**14,30 ± 0,5**	**28,36 ± 0,41**

Selon le tableau 8, le taux le plus élevé en polyphénols totaux est enregistré dans l'extrait Eau/Acétone (18,57± 1,39 mg EAG/g E), suivi de près par l'extrait aqueux (13,28 ±0,84 mg EAG/g E). En revanche, le mélange Eau/Éthanol présente le rendement le plus faible (2,12 ± 0,33 mg EAG/g E).

Cela suggère que la majorité des composés phénoliques présents dans cette plante ont une affinité optimale pour les systèmes de solvants moyennement polaires à polaires comme le mélange eau/acétone.

Les flavonoïdes sont massivement concentrés dans l'extrait Eau/Acétone avec une valeur de 20,91 ± 1,17 mg EQC/g E) Alors que les extraits aqueux et surtout l'extrait Eau/éthanol affichent des teneurs particulièrement basses (2,66 ±1,20 mg EQC/g E), et 0,091± 0,03 mg EQC/g E, respectivement).

L'acétone combinée à l'eau s'avère être, de loin, le meilleur solvant pour solubiliser et extraire les flavonoïdes de *Curcubita pepo*, ce qui est un comportement classique pour cette famille de molécules souvent plus solubles dans les solvants organiques cétoniques.

Contrairement aux deux autres catégories, ce sont les tanins qui affichent une valeur plus élevée dans l'extrait aqueux (172,44 ± 2,24 mg EQC/g E). L'extrait Eau/Acétone arrive en deuxième position (28,36 ± 0,41 mg EQC/g E) et l'extrait Eau/Éthanol reste le moins riche (14,30 ± 0,5 mg EQC/g E).

Cette forte concentration dans l'eau indique que les tanins présents dans cet échantillon sont hautement hydrophiles (probablement des tanins hydrolysables ou des tanins condensés hautement polymérisés qui ont une excellente affinité pour l'eau pure.

4. Résultats de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Cucurbita pepo* par les tests DPPH et FRAP est une approche classique et complémentaire. Ces deux méthodes permettent de mesurer la capacité des extraits à piéger les radicaux libres et à réduire les ions métalliques (figures : 17, 18, 19).

4.1. Piégeage du radicale DPPH par les extraits de *Curcubita pepo*

4.1.1. Piégeage du radicale DPPH par l'extrait aqueux

La figure 17 évalue l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Cucurbita pepo* par le test de piégeage du radical libre DPPH.

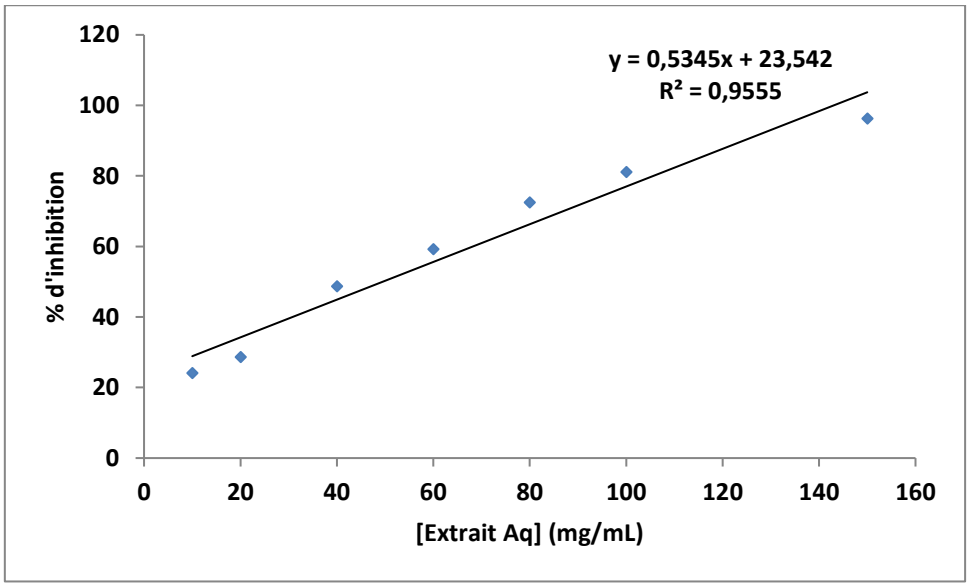


Figure 17: Pourcentage d'inhibition du radicale DPPH par l'extrait aqueux de *C. pepo*.

La figure 17 illustre l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux de *Cucurbita pepo*. Les résultats révèlent une relation dose-dépendante bien marquée : l'activité antioxydante augmente de manière progressive et linéaire avec l'élévation de la concentration en extrait. En effet, le pouvoir de piégeage débute à un taux d'inhibition minimal d'environ 23 % pour la concentration la plus faible de 10 mg/mL, avant de progresser de façon constante pour atteindre une efficacité maximale proche de 83 % à la concentration la plus élevée testée, soit 155 mg/mL. Cette proportionnalité stricte est confirmée par l'analyse de la droite de régression linéaire, dont le coefficient de corrélation (R^2 = 0,95) témoigne d'une excellente corrélation. La forte augmentation du pourcentage d'inhibition à mesure que la concentration s'élève démontre clairement la capacité de l'extrait aqueux à céder des électrons ou des atomes d'hydrogène pour neutraliser les radicaux libres DPPH, une efficacité qui s'explique par la richesse de cette fraction en composés bioactifs hydrosolubles dotés d'un potentiel antioxydant notable.

4.1.2. Piégeage du radicale DPPH par l'extrait eau/éthanol

La figure 18 évalue l'activité antioxydante de l'extrait eau/éthanol de *Cucurbita pepo* par le test de piégeage du radical libre DPPH.

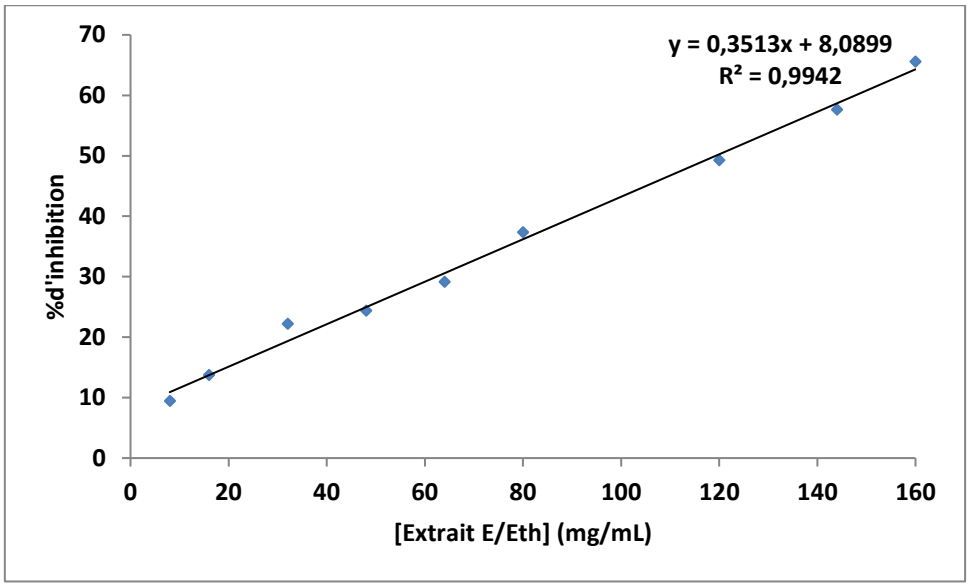


Figure 18: Pourcentage d'inhibition du radicale DPPH par l'extrait eau/Ethanol de *C. pepo.*

Les résultats présentés dans la figure 18 révèlent une relation proportionnelle et fortement linéaire entre la concentration de l'extrait eau/éthanol de *Cucurbita pepo* et son activité antioxydante, comme l'atteste le coefficient de détermination très élevé ($R^2 = 0,99$). En effet, on observe que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente de manière progressive et continue avec l'élévation de la concentration en extrait. À la plus faible concentration testée, l'extrait induit déjà un début de piégeage d'environ 10%. Cette capacité de piégeage s'intensifie de façon régulière pour atteindre son maximum aux alentours de 60% d'inhibition pour la concentration la plus forte testée. Cette progression chiffrée démontre de manière directe que le pouvoir antioxydant de cet extrait dépend strictement de la dose utilisée, suggérant une concentration efficace en composés bioactifs (tels que les polyphénols) capables de céder des électrons ou des protons pour stabiliser le radical DPPH.

4.1.3. Piégeage du radicale DPPH par l'extrait eau/acétone

La figure 19 évalue l'activité antioxydante de l'extrait eau/acétone de *Cucurbita pepo* par le test de piégeage du radical libre DPPH.

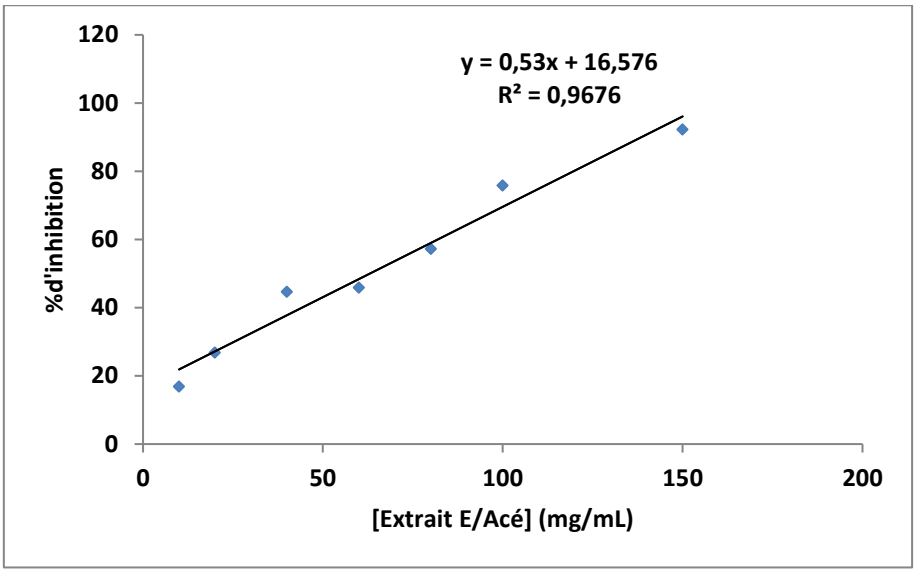


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition du radicale DPPH par l'extrait eau/acétone de *C. pepo*

Selon la figure 19, les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'inhibition augmente proportionnellement avec la concentration de l'extrait hydroacétonique des graines de *Cucurbita pepo*, passant de 17 % à 92 % pour des concentrations comprises entre 10 et 150 mg/mL. Cette augmentation traduit une activité antioxydante dose-dépendante. La régression linéaire obtenue ($R^2 = 0,97$) révèle une forte corrélation entre la concentration de l'extrait et le pourcentage d'inhibition, témoignant de la fiabilité des résultats expérimentaux. Ces observations indiquent que l'extrait hydroacétonique présente un potentiel antioxydant élevé, susceptible d'être attribué à la présence de composés phénoliques extraits par le système eau/acétone.

4.1.4. Piégeage du radicale DPPH par l'acide ascorbique

La figure 20 évalue l'activité antioxydante de l'acide ascorbique utilisé comme molécule de référence par le test de piégeage du radical libre DPPH.

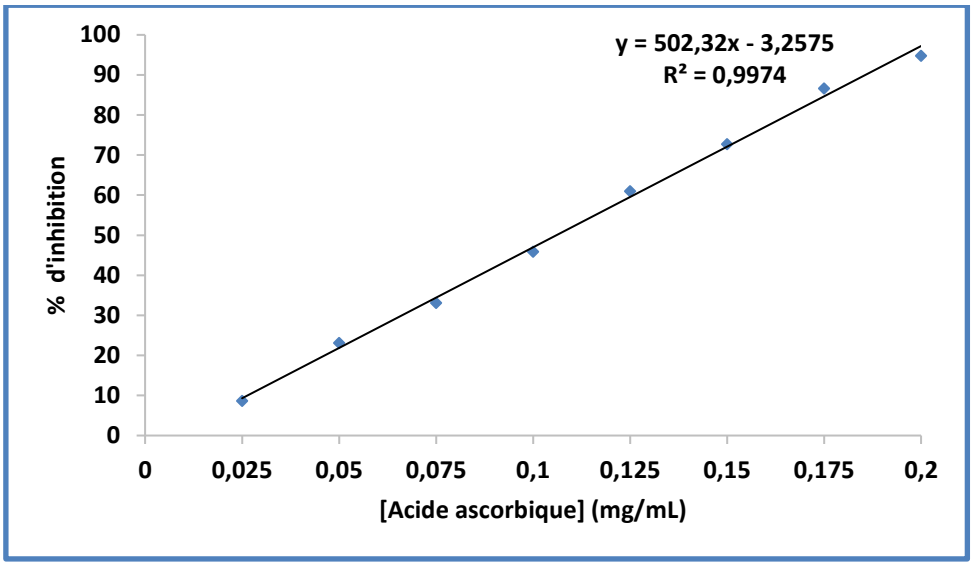


Figure 19: Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.

La figure 20 illustre l'activité antioxydante de l'acide ascorbique, utilisé comme molécule de référence, à travers le test de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats révèlent une relation linéaire positive et hautement corrélée entre la concentration en acide ascorbique et le pouvoir inhibiteur, comme en témoigne le coefficient de détermination élevé (R^2 = 0,99). En effet, le pourcentage d'inhibition du radical augmente de manière progressive et dose-dépendante, passant d'environ 10 % pour la plus faible concentration testée de 0,025 mg/mL, à une valeur maximale proche de 90 % pour la concentration de 0,2 mg/mL. Cette augmentation régulière met clairement en évidence la forte capacité donneuse d'hydrogène ou d'électrons de l'acide ascorbique, confirmant son efficacité remarquable pour neutraliser les radicaux libres dès les plus faibles doses et validant ainsi rigoureusement le protocole expérimental utilisé pour l'évaluation des extraits.

4.1.5. Calcul des IC_{50}

Les valeurs d'IC_{50} obtenues pour les trois extraits de *Cucurbita pepo* (aqueux hydro éthanolique et hydroacétonique) ainsi que pour l'acide ascorbique utilisé comme témoin positif sont indiquées dans le tableau 9.

Tableau 9:Valeurs des IC_{50} des trois extraits de *Cucurbita pepo* et l'acide ascorbique

Extraits	Aqueux	Eau/éthanol	Eau/acétone	Acide ascorbique
IC_{50} (mg/mL)	**49,5**	**119,3**	**63,06**	**0,106**

Les résultats du tableau précédents révèlent que les trois extraits de possèdent une activité antioxydante variable selon le solvant d'extraction utilisé.

L'extrait aqueux présente la meilleure activité antioxydante parmi les trois extraits, avec une IC_{50} de 49,5 mg/mL, ce qui indique qu'il est le plus riche en composés polaires hydrosolubles à pouvoir réducteur, tels que les polyphénols et les flavonoïdes.

L'extrait hydroacétonique affiche une IC_{50} de 63,06 mg/mL, traduisant une activité modérée, intermédiaire entre les deux autres extraits. Cela suggère la présence de composés semi-polaires contribuant partiellement au pouvoir antioxydant.

L'extrait hydroéthanolique présente la valeur d'IC_{50} la plus élevée (119,3 mg/mL), et donc la plus faible activité antioxydante, ce qui pourrait s'expliquer par une extraction moins sélective des composés actifs dans ce solvant.

L'acide ascorbique, utilisé comme référence, présente une activité antioxydante très puissante avec un IC_{50} de 0,106 mg/mL. Comparativement, les trois extraits montrent des IC_{50} nettement plus élevées, ce qui indique que leur pouvoir antioxydant, bien que réel, reste inférieur à celui de ce standard.

4.2. Pouvoir réducteur des extraits de *Cucurbita pepo* par la méthode FRAP

L'objectif principal d'effectuer le test FRAP sur les trois extraits (aqueux, hydroéthanolique et hydroacétonique) de *Cucurbita pepo* est d'évaluer et de comparer le pouvoir antioxydant réducteur de cette plante en fonction de la polarité des solvants utilisés (fig. 21, 22 , 23).

En biochimie, l'évaluation du pouvoir réducteur se traduit par une augmentation de l'absorbance, plus l'extrait est capable de donner des électrons (réduire), plus la couleur se développe et plus l'absorbance à 700 nm augmente.

4. 2.1. Réduction du fer par l'extrait aqueux de *Cucurbita pepo*

La figure 21 évalue l'activité antioxydante de l'attrait aqueux de *C. pepo* par le pouvoir réducteur FRAP .

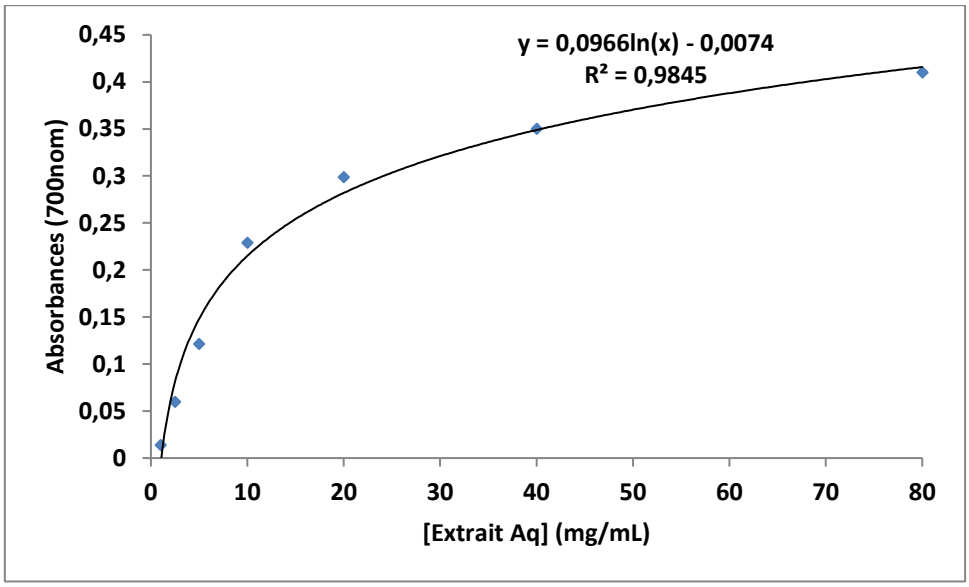


Figure 20: Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux de *C. pepo.*

Selon la figure 21 les résultats du test FRAP montrent une augmentation progressive de l'absorbance à 700 nm avec l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux de *Cucurbita pepo*, indiquant une amélioration de son pouvoir réducteur. La relation logarithmique obtenue (R^2 = 0,9845) met en évidence une forte corrélation entre la concentration de l'extrait et son activité réductrice. L'augmentation de l'absorbance traduit la capacité des composés bioactifs présents dans l'extrait à réduire les ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2}). Ces résultats confirment que l'extrait aqueux des graines de *Cucurbita pepo* possède une activité antioxydante significative, probablement liée à sa richesse en composés phénoliques et autres substances réductrices.

4. 2.2. Réduction du fer par l'extrait eaux/éthanol de *Cucurbita pepo*

La figure 22 évalue l'activité antioxydante de l'extrait Eaux/éthanol de *Cucurbita pepo* par le teste du pouvoir réducteur FRAP.

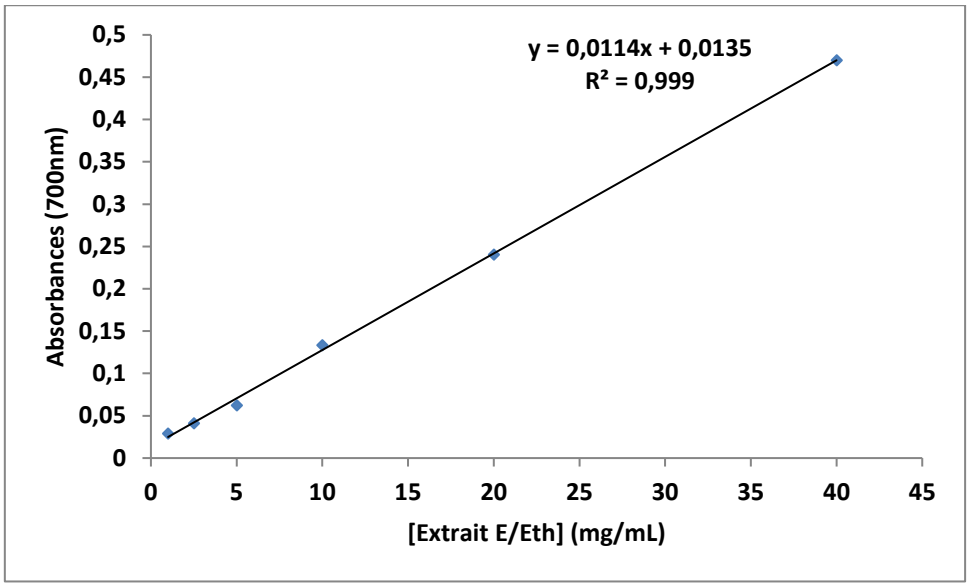


Figure 21: Pouvoir réducteur de l'extrait Eau/éthanol de *C. pepo.*

La figure 22 illustre l'évolution du pouvoir réducteur de l'extrait hydroéthanolique de *Cucurbita pepo* vis-à-vis du fer. Les résultats révèlent une augmentation linéaire et dose-dépendante de l'absorbance à 700 nm, traduisant une capacité croissante de l'extrait à réduire les ions ferriques en ions ferreux. Sur le plan quantitatif, l'absorbance minimale est enregistrée à la plus faible concentration testée, soit une valeur proche de 0,025 pour 1 mg/mL, avant de progresser régulièrement à 0,05 pour 5 mg/mL, puis à environ 0,12 pour 10 mg/mL et 0,22 pour 20 mg/mL. Elle atteint son maximum avec une valeur d'absorbance de 0,42 pour la concentration la plus élevée de 41,2 mg/mL. Cette relation hautement linéaire et validée par un coefficient de détermination exceptionnellement proche de 1 (R^2 = 0,99). Ces données démontrent de manière rigoureuse la présence de composés bioactifs dotés d'un fort potentiel donneur d'électrons au sein de cet extrait hydroéthanolique des graines de courge possède une richesse significative en composés donneurs d'électrons, tels que les polyphénols et les flavonoïdes, capables de stabiliser les radicaux libres en interrompant les réactions en chaîne d'oxydation.

4. 2.3. Réduction du fer par l'extrait eaux/acétone de *Cucurbita pepo*

La figure 23 évalue l'activité antioxydante de l'extrait Eaux/acétone de *cucurbita pepo* par le teste du pouvoir réducteur FRAP.

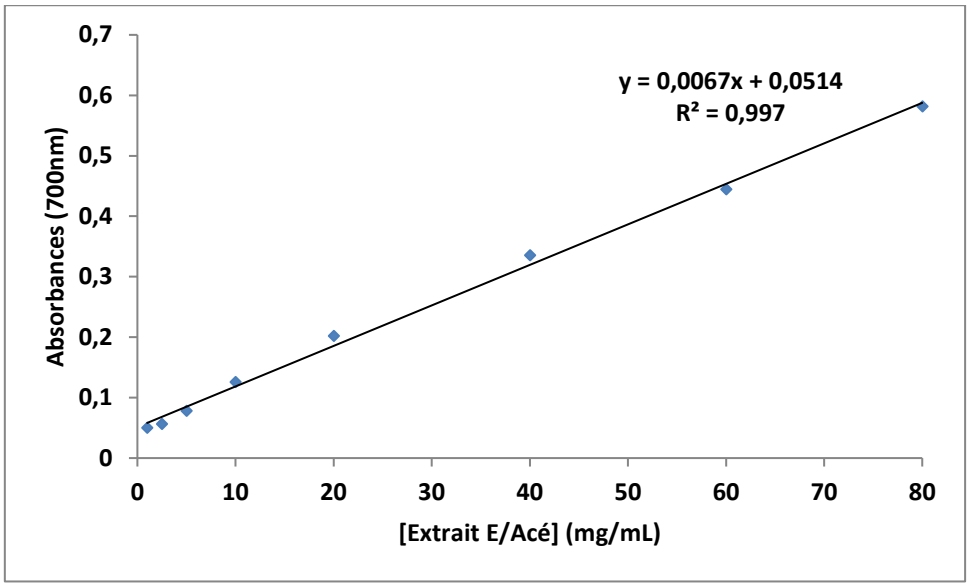


Figure 22: Pouvoir réducteur de l'extrait Eau/acétone de *C. pepo.*

La figure 23 illustre l'évaluation du pouvoir réducteur de l'extrait eau/acétone par le test FRAP. Les résultats révèlent une augmentation progressive et dose-dépendante de l'absorbance à 700 nm en fonction de la concentration de l'extrait. En effet, la valeur de l'absorbance passe d'environ 0,05 pour la concentration la plus faible (1 mg/mL) à une valeur maximale proche de 0,53 pour la concentration la plus élevée (80 mg/mL). Cette relation parfaitement linéaire, un coefficient de corrélation très élevé (R^2 = 0,99). L'élévation de l'absorbance traduit directement une augmentation de la capacité de l'extrait à réduire les ions ferriques en ions ferreux, ce qui démontre le potentiel antioxydant remarquable et la richesse en composés réducteurs de cet extrait de *Cucurbita pepo*.. Ce resulta indique l'extrait possède une activité antioxydante notable, potentiellement liée à sa richesse en composés phénoliques capables de piéger les radicaux libres.

4.2.4. Réduction du fer par le BHA

Afin de mesure le pouvoir réducteur de BHA, l'évolution de l'absorbance à 700 nm en fonction de sa concentration a été tracée sur la figure 24.

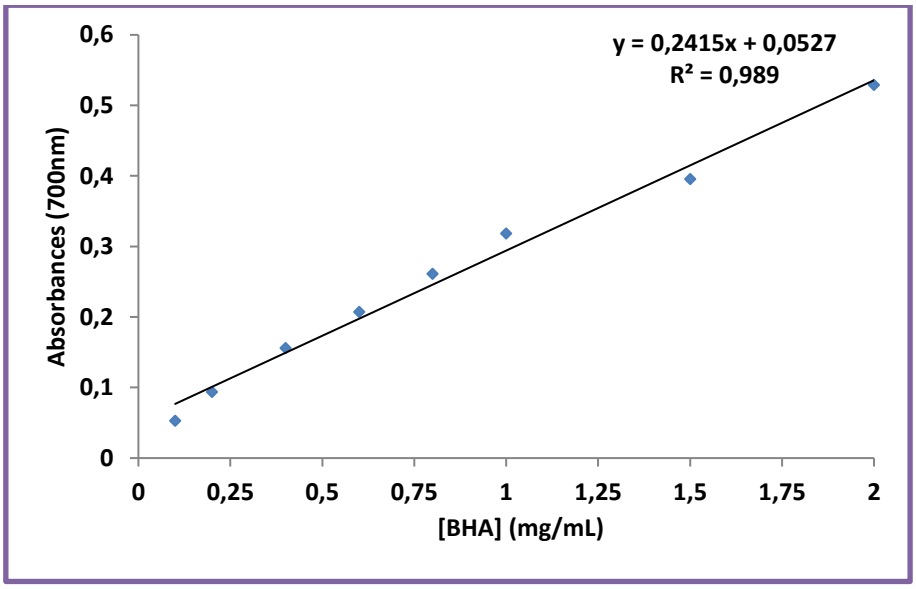


Figure 23: Pouvoir réducteur de BHA

Le graphique de la figure 24 illustre la droite du butylhydroxyanisole (BHA), utilisé comme antioxydant de référence pour l'évaluation du pouvoir réducteur. Les résultats mettent en évidence une augmentation linéaire et rigoureusement proportionnelle de l'absorbance à 700 nm en fonction de la concentration en BHA, ce qui valide la haute fiabilité et la reproductibilité des mesures expérimentales. Cette progression de l'absorbance traduit l'excellente capacité de ce composé à céder des électrons afin de réduire les ions ferriques en ions ferreux. L'efficacité antioxydante du BHA se traduit par une concentration efficace à 50 % très basse (1,85 mg/mL). Cette faible valeur confirme que le BHA possède un pouvoir réducteur hautement supérieur, ce qui est caractéristique des antioxydants synthétiques purs utilisés comme témoins positifs.

4.2.5. Calcul des EC_{50}

L'efficacité (EC_{50}) des différents extraits ainsi que le BHA, calculée graphiquement est rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10:Valeurs des EC_{50} des trois extraits de *Cucurbita pepo* et le BHA.

Extraits	Aqueux	Eau/éthanol	Eau/acétone	BHA
EC_{50} (mg/mL)	**191,06**	**42,67**	**66,95**	**1,85**

L'analyse des résultats montre que le pouvoir antioxydant varie de manière significative selon la nature du solvant d'extraction, sachant qu'une valeur d'EC_{50} plus faible indique une

efficacité plus élevée. Parmi les trois échantillons testés, l'extrait hydroéthanolique manifeste la plus forte activité antioxydante avec la plus petite IC_{50} (42,67mg/mL), suivi de l'extrait hydroacétonique (66,95 mg/mL), tandis que l'extrait aqueux s'avère nettement le moins actif (191,06 mg/mL). Cette différence s'explique par la polarité des solvants qui influence directement la nature et la quantité des composés phénoliques extraits lors du reflux d'une heure. Néanmoins, bien que l'extrait hydroéthanolique présente le meilleur potentiel réducteur, son pouvoir antioxydant reste largement inférieur à celui de la molécule de référence, le BHA, qui affiche une EC_{50} très faible de 1,85mg/ml.

5. Résultats de l'inhibition de l'α-amylase

5.1. Inhibition de l'α-amylase par les extraits de *C. pepo*

Les résultats d'inhibition de l'α-amylase par les extraits eau/éthanol et eau/acétone sont représentés graphiquement sur les figures 25 et 26, respectivement.

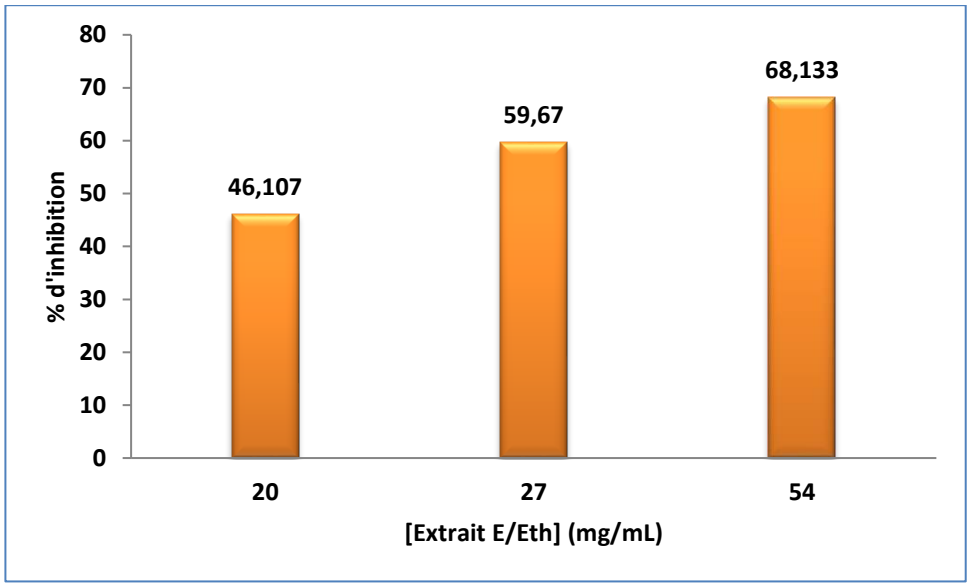


Figure 24: Pourcentage d'inhibition de l'α-amylase par l'extrait eau/éthanol de *C. pepo*.

D'après la figure 25, les résultats révèlent une activité inhibitrice dose-dépendante bien marquée. En effet, le taux d'inhibition augmente de manière progressive avec la concentration de l'extrait, passant d'environ 46% pour la plus faible concentration testée (20 mg/mL) à un maximum d'environ 70 % pour la concentration la plus élevée (54 mg/mL). Cette capacité à inhiber l'α-amylase, une enzyme clé responsable de l'hydrolyse des glucides complexes en glucose, suggère que cet extrait possède un potentiel antidiabétique prometteur. En limitant la

dégradation des sucres au niveau intestinal, l'extrait de *Cucurbita pepo* pourrait ainsi contribuer efficacement à la réduction de la glycémie postprandiale, ce qui justifie son interet dans la gestion et le traitement de diabète de type 2.

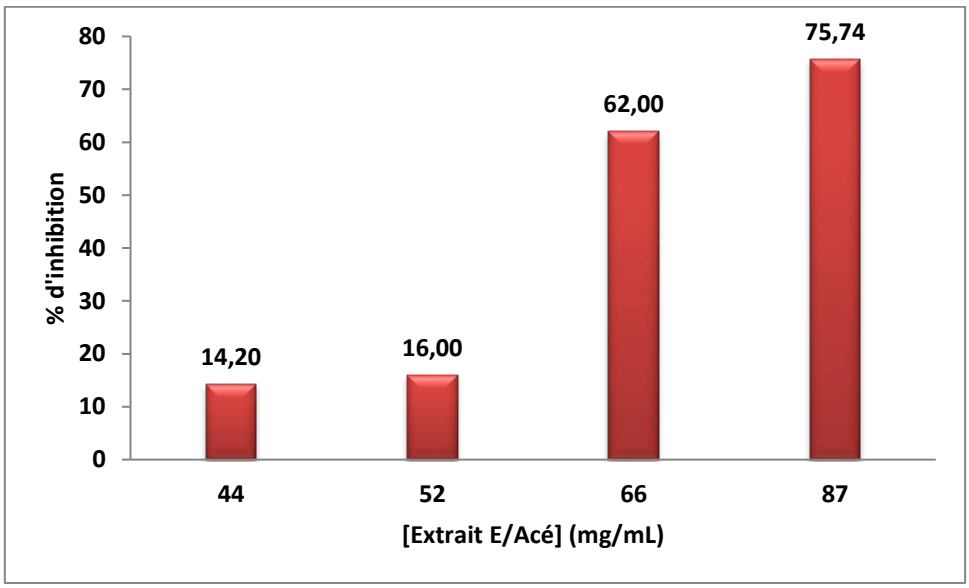


Figure 25: Pourcentage d'inhibition de l'α-amylase par l'extrait Eau/acétone de *C. pepo*

La Figure 26 met en évidence une relation dose-dépendante entre la concentration de l'extrait Eau/acétone de *Cucurbita pepo* et le pourcentage d'inhibition de l'enzyme α-amylase. En effet, à de faibles concentrations (44 et 52 mg/mL), l'extrait manifeste une activité inhibitrice relativement faible et stable, oscillant autour de 14% à 16%. En revanche, une augmentation de la concentration à 66 mg/mL provoque une hausse remarquable du taux d'inhibition, qui bondit à près de 60%, pour atteindre son maximum à environ 76% pour la concentration la plus élevée testée (87 mg/mL). Cette efficacité inhibitrice croissante suggère une forte affinité des métabolites secondaires présents dans cet extrait « potentiellement des composés phénoliques ou des flavonoïdes » vis-à-vis du site actif de l'α-amylase. En bloquant cette enzyme clé responsable de l'hydrolyse des glucides complexes en glucose, l'extrait de *Cucurbita pepo* démontre un potentiel anti-hyperglycémiant prometteur, ce qui appuie scientifiquement son utilisation traditionnelle dans la gestion du diabète de type 2.

5.2. Inhibition de l'α-amylase par l'acarbose

Les résultats d'inhibition de l'α-amylase par l'acarbose sont représentés graphiquement sur la figure 27.

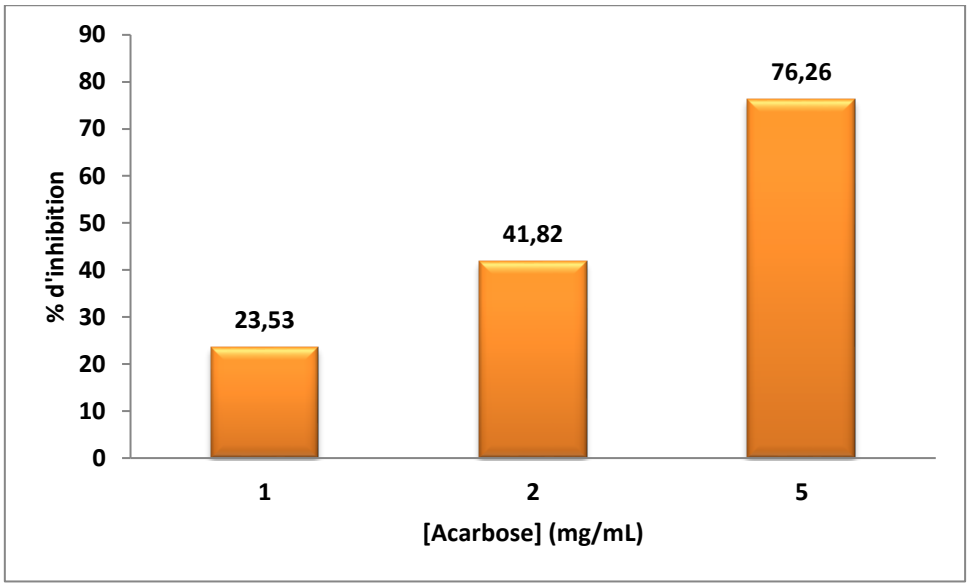


Figure 27 : Pourcentage d'inhibition de l'α-amylase par l'acarbose

La figure 27 montre que l'acarbose exerce une inhibition dose-dépendante de l'enzyme α-amylase, ce qui confirme son statut de molécule de référence pour l'activité antidiabétique. En effet, le pourcentage d'inhibition augmente de manière progressive et proportionnelle à la concentration d'acarbose, passant de 23,53% à une faible concentration de 1 mg/mL, à 41,82% pour 2 mg/mL, avant d'atteindre un pic d'efficacité majeur de 76,26% à une concentration de 5 mg/mL. Cette forte capacité inhibitrice démontre l'efficacité de l'acarbose à ralentir l'hydrolyse des glucides complexes en glucose simple, permettant ainsi de limiter efficacement l'hyperglycémie postprandiale caractéristique du diabète de type 2.

5.3. Comparaison entre l'acarbose et les extraits de *Cucurbita pepo.*

L'évaluation de l'activité enzymatique montre que les deux extraits de *Cucurbita pepo* exercent un effet inhibiteur dose-dépendant marqué sur lα-amylase, bien que leurs efficacités varient selon le solvant d'extraction. En effet, l'extrait eau/éthanol se révèle être le meilleur extrait en termes de puissance, puisqu'il induit un fort taux d'inhibition de 68,133 % à une concentration de 54 mg/mL, comparativement à l'extrait eau/acétone qui à une concentration très proche (52 mg/mL) provoque une inhibition de 16%. Néanmoins, bien que ces extraits végétaux démontrent un potentiel thérapeutique prometteur dans la gestion de l'hyperglycémie postprandiale, l'acarbose pur conserve une activité inhibitrice nettement plus puissante à des concentrations largement inférieures, ce qui s'explique par sa nature de molécule commerciale hautement purifiée face à la complexité brute des matrices végétales étudiées.

Discussion

Les résultats obtenus dans la présente étude révèlent que le rendement d'extraction des graines de *Cucurbita pepo* varie de manière selon la nature du solvant utilisé, avec l'extrait hydroacétonique affichant le rendement le plus élevé (10,30 %), suivi de l'extrait hydroéthanolique (7 %) et de l'extrait aqueux (5,50 %), une hiérarchie qui s'explique par la capacité des mélanges hydroorganiques à optimiser la solubilisation et la désorption des métabolites secondaires grâce à leur polarité intermédiaire, phénomène largement corroboré par **Azwanida (2015),** qui a démontré que les solvants mixtes surpassent systématiquement les solvants purs dans l'extraction des composés bioactifs végétaux ; ces valeurs sont comparables à celles rapportées par **Djeridane *et al.* (2006)**, sur des plantes de la famille des Cucurbitacées, où des rendements oscillant entre 4,8 % et 11,2 % ont été obtenus avec des mélanges acétone-eau, et se rapprochent également des travaux de **Bahorun *et al.* (2004**), qui ont obtenu des rendements de 6 à 9 % avec des extraits hydroéthanoliques sur des espèces végétales similaires, confirmant ainsi que le choix du système d'extraction constitue une étape décisive dans la récupération des principes actifs.

Sur le plan de la composition phytochimique, le dosage quantitatif met en évidence que le mélange hydroacétonique demeure le plus efficace pour l'extraction des polyphénols totaux (18,57 ± 1,39 mgEAG/gE) et des flavonoïdes (20,91 ± 1,17 mgEQC/gE), ce qui s'explique par la capacité de l'acétone à rompre efficacement les liaisons hydrogènes reliant les polyphénols aux protéines et aux structures cellulaires de la plante **(Nawwar *et al.*, 2013)**, tandis que l'extrait aqueux se distingue de manière spectaculaire par sa charge massive en tanins condensés (172,44 ± 2,24 mgEQC/gE), confirmant le caractère hautement hydrophile de ces macromolécules polymériques chez *Cucurbita pepo* **(Zhou *et al.*, 2016),** des résultats qui concordent avec ceux de **Oueslati *et al.* (2012),** ayant rapporté des teneurs en polyphénols de 15 à 22 mg/g dans les extraits acétoniques de *Cucurbita pepo* et avec **Tlili *et al.* (2011),** qui ont mis en évidence des concentrations élevées en tanins dans les fractions aqueuses de *Cucurbita pepo,* soulignant l'importance de la polarité du solvant dans la sélectivité d'extraction. Cette différences de composition influence directement le comportement des extraits lors des tests antioxydants : dans le cas du test de piégeage du radical libre DPPH, l'extrait aqueux manifeste la meilleure activité avec l'IC_{50} la plus faible (49,5 mg/mL), suivi par l'extrait hydroacétonique (63,06 mg/mL) et enfin l'extrait hydroéthanolique (119,3 mg/mL), bien que tous restent inférieurs à l'acide ascorbique (0,106 mg/mL), cette performance de l'extrait aqueux s'expliquant par sa richesse en tanins dont les multiples groupements hydroxyles aromatiques agissent comme d'excellents donneurs d'hydrogène pour neutraliser le radical DPPH **(Hagerman *et al.*, 1998**),

ce qui rejoint les observations de **Chahmi *et al.* (2015)** qui ont rapporté que les extraits aqueux riches en tanins présentaient des IC_{50} inférieures à 55 mg/mL dans des espèces du genre Cucurbita ; en revanche, le test FRAP révèle une inversion complète des tendances, l'extrait hydroéthanolique devenant le plus puissant réducteur de fer avec l'EC_{50} la plus basse (42,67 mg/mL), surpassant l'extrait hydroacétonique (66,95 mg/mL) et l'extrait aqueux (191,06 mg/mL), face au standard BHA (1,85 mg/mL), ce comportement indiquant que les molécules de l'extrait hydroéthanolique opèrent principalement via un mécanisme de transfert d'électron pur, démontrant ainsi que l'efficacité antioxydante dépend davantage de la structure qualitative des molécules que de leur seule quantité globale **(Prior *et al.*, 2005),** une conclusion partagée par **Miliauskas *et al.* (2004),** qui ont observé des inversions similaires entre les tests DPPH et FRAP sur des extraits végétaux à dominante flavonoïdique.

Sur le plan antidiabétique, l'évaluation *in vitro* de l'inhibition de l'α-amylase révèle une action inhibitrice dose-dépendante remarquable pour les deux extraits organiques testés, l'extrait hydroéthanolique se montrant plus performant en induisant 68 % à 54 mg/mL, tandis que l'extrait hydroacétonique, provoque une inhibition moins importante de 16% à 52 mg/mL.

La capacité des extraits des graines de courges à inhiber l'α-amylase étant directement liée à la présence des flavonoïdes et des composés phénoliques qui s'associent aux sites actifs de l'enzyme par des liaisons non covalentes altérant sa conformation et bloquant son pouvoir catalytique **(Lo Piparo *et al.*, 2008**), corroborant ainsi les travaux de **Kwon *et al.* (2007) et d'Adisa *et al.* (2010**), qui ont validé le potentiel biomédical des cucurbitacées, et particulièrement de *Cucurbita pepo*, comme source majeure de molécules bioactives capables de lutter simultanément contre le stress oxydatif et de réguler les troubles métaboliques liés au diabète de type 2, positionnant ainsi cette espèce comme une ressource phytothérapeutique de premier plan méritant une investigation phytochimique plus approfondie et des essais précliniques rigoureux.

En lien avec les activités biologiques, cette richesse différentielle en biomolécules extractibles dicte le potentiel thérapeutique de la graine de *Cucurbita pepo*. L'activité antioxydante observée est liée à la présence de composés phénoliques et de flavonoïdes, capables de piéger les radicaux libres et de limiter le stress oxydatif **(Aruoma, 2003)**. Concernant le potentiel antidiabétique, les extraits de graines de *Cucurbita pepo* sont reconnus pour leur capacité à inhiber les enzymes clés du métabolisme glucidique, telles que l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase, ou à stimuler la sécrétion d'insuline (**Adams *et al.*, 2011 ; Kwon *et al.*, 2007**). Ainsi, les performances

supérieures de l'extrait hydroéthanolique suggèrent une concentration idéale en principes actifs, confirmant que le choix du système d'extraction est une étape critique pour maximiser la double efficacité antioxydante et antidiabétique de *Cucurbita pepo* face aux complications métaboliques **(Teugwa *et al.*, 2013).**

Conclusion

En conclusion, ce travail de recherche a permis de valoriser le potentiel phytochimique, antioxydant et antidiabétique *in vitro* des graines de courge (*Cucurbita pepo),* tout en démontrant l'influence déterminante de la polarité du solvant sur l'extraction des principes actifs et leurs efficacités biologiques. Le criblage quantitatif a révélé que le mélange Eau/Acétone est le système le plus performant pour la solubilisation des polyphénols totaux et des flavonoïdes, tandis que l'extrait aqueux pur se distingue par une richesse sélective et exceptionnelle en tanins condensés. Sur le plan fonctionnel, l'évaluation du pouvoir antioxydant a mis en évidence une forte capacité de piégeage des radicaux libres par le test DPPH en faveur de l'extrait aqueux, complétée par une excellente capacité de réduction du fer par le test FRAP pour l'extrait Eau/Éthanol ; des variations qui suggèrent une action synergique différenciée des classes de composés selon le mécanisme mis en jeu. De plus, l'étude de l'activité antidiabétique *in vitro* a confirmé le potentiel thérapeutique des graines à travers une inhibition dose-dépendante remarquable de l'enzyme α-amylase.

L'ensemble de ces résultats scientifiques valide ainsi l'usage traditionnel et le statut de « super-aliment » de *Cucurbita pepo* comme source prometteuse d'agents antioxydants et régulateurs de l'hyperglycémie postprandiale. Pour valoriser et prolonger ces travaux encourageants, les perspectives de recherche s'orienteront vers l'utilisation de méthodes chromatographiques avancées (comme l'HPLC-MS) afin d'isoler et d'identifier précisément les molécules bioactives responsables. Enfin, l'évaluation de l'activité inhibitrice sur une seconde enzyme clé, l'α-glucosidase, combinée à la réalisation d'études *in vivo* sur des modèles animaux, s'avère indispensable pour décrypter les mécanismes physiologiques globaux et confirmer définitivement les effets protecteurs de ces extraits.

Références bibliographiques

A

- Adams, G. G., Imran, S., Wang, S., Mohammad, A., Kok, S., Mutlib, A. E., & Harding, S. E. (2011). *The hypoglycaemic, electron microscopy and structural characterisation of trigonelline and polysaccharides from Trigonella foenum-graecum L. seed*. Carbohydrate Polymers, 84(3), 1114–1120.
- Adams, G. G., Imran, S., Wang, S., Mohammad, A., Kok, S., Gray, D. A., et al. (2022). *The hypoglycemic, cholesterol-lowering and therapeutic potential of Cucurbita pepo L. (pumpkin) seed and ingredients*. Human Nutrition & Metabolism, 28, 200150.
- Adisa, R. A., Choudhary, M. I., & Olorunsogo, O. O. (2010). *Hypoglycemic activity of some Nigerian medicinal plants in alloxan-induced diabetic rats*. Acta Poloniae Pharmaceutica, 67(4), 375–381.
- Akiene, S. H., (2022). *Evaluation of Cucurbita pepo seed extract on lower urinary tract symptoms and quality of life in men with benign prostatic hyperplasia*. Journal of Ethnopharmacology, 283, 114680.
- Akmal, M., & Khan, R. (2023). *Mechanism of action and therapeutic efficacy of acarbose in the management of type 2 diabetes mellitus: A comprehensive review*. Journal of Diabetes Research, 2023, Article ID 8492015.
- American Diabetes Association. (2026). *Standards of Care in Diabetes—2026*. Diabetes Care, 49(Suppl. 1), S1–S320.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapcı, A. (2016). *Characteristics of antioxidant potential evaluation methods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(5), 990–1010.
- Apel, K., & Hirt, H. (2019). *Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annual Review of Plant Biology, 55, 373–399.
- Aruah, B. C., Unah, O. C., & Enechi, O. C. (2023). *Evaluation of bioactive components, nutritional composition and antioxidant properties of pumpkin (Cucurbita pepo L.) seeds*. Journal of Food Biochemistry and Functional Foods, 45(2), 112–125.
- Ardestani, A., & Yazdanparast, R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts. Food Chemistry, 104(1), 21-29. (Référence pour le dosage des flavonoïdes).

- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry, 89(1), 27-36. (Référence pour le mécanisme du test DPPH).
- Aruoma, O. I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutation Research, 523–524, 9–20.
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. The Lancet, 383(9911), 69–82.
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Medicinal & Aromatic Plants, 4(3), 1–6.

B

- Baba Aissa, F. (1999). *Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb*. Librairie Moderne.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., & Aruoma, O. I. (2004). *Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations*. Arzneimittelforschung, 46(11), 1086–1089
- Bardaa, S., Ben Halima, N., Aloui, F., Ben Mansour, R., Jarraya, H., Hammami, M. M., & Sahnoun, Z. (2016). *Oil from pumpkin (Cucurbita pepo L.) seeds: Evaluation of its functional properties on wound healing in rats*. Lipids in Health and Disease, 15(1), 73.
- Bayen, J. (2016). *Auto-oxidation of sugars and advanced glycation end-products (AGEs) formation*. Carbohydrate Research, 420, 45–52.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (2022). *Endogenous sources of reactive oxygen species and cellular function*. Annals of Clinical Biochemistry, 59(2), 112–125.
- Bernfeld, P. (1955). Amylases, \alpha and \beta. Methods in Enzymology, 1, 149-158.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). *Oxidative stress and antioxidant defense*. World Allergy Organization Journal, 5(1), 9–19.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (2024). *Evaluation of antioxidant activity in Cucurbita pepo extracts using DPPH and FRAP assays*. Food Chemistry, 435, 137–145.
- Brownlee, M. (2005). *The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism*. Diabetes, 54(6), 1615–1625.
- Bruneton, J. (2016). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (5ème éd.). Éditions Tec & Doc – Lavoisier.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales* (3ème ed., pp. 227, 310–314, 494). Techniques et Documentation.
- Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., & Gruzdiene, D. (2002). Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. Food Research International, 35(2-3), 185-191. (Référence pour l'absorption du radical DPPH).

C

- Chahmi, N., Anissi, J., Jennan, S., Farah, A., Sendide, K., & El Hassouni, M. (2015). *Antioxidant activities and phenol content of Inula viscosa extracts selected from three regions of Morocco*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(3), 228–233.

D

- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., et al. (2015). *Type 2 diabetes mellitus*. Nature Reviews Disease Primers, 1(1), 1–22.
- Derosa, G., & Maffioli, P. (2012). *α-Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice*. Archives of Medical Science, 8(5), 899–906.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). *Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds*. Food Chemistry, 97(4), 654–660.
- Dotto, J. M., & Chacha, J. S. (2020). *The potential of pumpkin (Cucurbita pepo L.) seeds as a functional food ingredient: A review*. Scientific African, 10, e00575.
- Droge, W. (2000). *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiological Reviews, 82(1), 47–95.

- Droge, W. (2015). *Redox homeostasis and its prolonged imbalance in pathological states*. Biochemical Society Transactions, 43(3), 321–329.

E

- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (2017). *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radical Biology and Medicine, 105, 24–40.

F

- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 408(6809), 239–247.
- Fruhwirth, G. O., & Hermetter, A. (2017). *Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities*. European Journal of Lipid Science and Technology, 109(5), 528–540.
- Fabri, R. L., Nogueira, M. S., Dutra, L. B., Bouzada, M. L. M., & Scio, E. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of Mitracarpus frigidus. Central European Journal of Biology, 4, 396-402. (Référence pour le calcul graphique de l'IC50 du DPPH).
- Ferreira, I. C., Baptista, P., Vilas-Boas, M., & Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe evaluation. Food Chemistry, 100(4), 1511-1516. (Référence pour l'évaluation de l'EC50 de la méthode FRAP).

G

- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). *Oxidative stress and diabetic complications*. Circulation Research, 107(9), 1058–1070.
- Gossell-Williams, M., Hyde, C., Hunter, T., Simms-Stewart, D., Fletcher, H., McGrowder, D., & Walters, C. A. (2019). *Improvement in HDL cholesterol in postmenopausal women supplemented with pumpkin seed oil: Pilot study*. Climacteric, 14(5), 558–564.
- Gazi, M. R., McAnuff, M. A., Omoruyi, F. O., Morrison, E. Y., & Asemota, H. N. (2004). Antioxidant activity in sapogenins and major polyphenols isolated from

Jamaican bitter yam (Dioscorea polygonoides). Journal of Medicinal Food, 7(2), 244-248. (Référence pour les caractéristiques du DPPH).

H

- Hagerman, A. E., et al. (1998). *High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(5), 1887–1892.
- Hajhashemi, V., Rajabi, P., & Rozbahani, M. (2019). *The effects of Cucurbita pepo L. seed oil on lipid profile and glycemia in type 2 diabetic rats*. Journal of Research in Medical Sciences, 24(1), 84.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2014). *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture*. British Journal of Pharmacology, 171(15), 3563–3585.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Cross, C. E. (2006). *Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?* Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 147(4), 164–175.
- Halliwell, B., Ji, L. L., & Yu, B. P. (2015). *Oxidative stress, molecular targets, and cellular responses*. Free Radical Research, 49(5), 493–502.
- Halliwell, B., Lee, C. Y., & Cheah, I. K. (2016). *Biomarkers of oxidative damage to lipids, proteins, and nucleic acids*. Molecular Aspects of Medicine, 49, 1–21.
- Harborne, B (1998). *Phytochmical methods: a guide to moderne technique of plant analysis* . Champman and Hall, London.
- Harborne, J. B. (1998). Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis (3rd ed.). Chapman & Hall, London. (Référence pour les tests de coloration et de précipitation en tubes).
- Hubert, J. (2006). Identification de nouveaux composés d'intérêt cosmétique par le concept de puces à extraits. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne. (Référence pour l'analyse du pouvoir réducteur FRAP).

K

- Kazeem, M. I., Adamson, J. O., & Ogunwande, I. A. (2013). *Modes of inhibition of α-amylase and α-glucosidase by leaves of Morinda lucida Benth*. BioMed Research International, 2013, 527570.
- Kwon, Y. I., Apostolidis, E., & Shetty, K. (2007). *In vitro studies of eggplant phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes*. Bioresource Technology, 99(8), 2981–2988.
- Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of Chrozophora tinctoria accessions from Turkey. Food Chemistry, 111(4), 905-911. (Référence pour le mode opératoire de la méthode FRAP).

L

- Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., & Chou, C. J. (2008). *Flavonoids for controlling starch digestion*. Journal of Medicinal Chemistry, 51(12), 3555–3561.

M

- Medjakovic, S., Hobiger, S., Ardjomand-Woelkart, K., Bucar, F., & Jungbauer, A. (2016). *Pumpkin seed extract: Cell growth inhibition of hyperplastic and cancer cells, independent of steroid receptors*. Fitoterapia, 110, 150–156.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). *Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts*. Food Chemistry, 85(2), 231–237.
- Mitchell, A. E., Hong, Y. J., & Koh, E. (2014). *Phytochemicals in agricultural by-products and their health-promoting properties*. Annual Review of Food Science and Technology, 5(1), 315–339.
- Monica, S., Charlotte, G., & Paul, A. (2020). *Bioactive peptides and polyphenols from plant seeds as natural inhibitors of α-amylase and α-glucosidase: A review*. Food Chemistry, 310, 125820.
- Montesano, D., Blasi, F., Simonetti, M. S., Santini, A., & Cossignani, L. (2018). *Chemical and nutritional characterization of seed oil from Cucurbita pepo L. var. styriaca grown in Italy*. Foods, 7(3), 30.

- Møller, B. L. (2015). *Functional diversity of plant secondary metabolites*. Current Opinion in Biotechnology, 32, 21–27.
- Murphy, A. (2015). *The Biochemistry of Nitrogen-Containing Secondary Metabolites*. Oxford University Press. Majhenič, L., Škerget, M., & Knez, Ž. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed (Paullinia cupana) extracts. Food Chemistry, 104(3), 1258-1268. (Référence pour le test d'inhibition du radical DPPH).
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., & Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chemistry, 100(4), 1409-1418. (Référence pour l'évaluation statistique et graphique de l'IC50).
- Majhenič, L., Škerget, M., & Knez, Ž. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed (Paullinia cupana) extracts. Food Chemistry, 104(3), 1258-1268. (Référence pour le test d'inhibition du radical DPPH).

N

- National Kidney Foundation. (2023). *KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2023 Update*. American Journal of Kidney Diseases, 82(3), S1–S120.
- Nawwar, M., Barakat, H., Buddrus, J., & Linscheid, M. (2013). *Alkaloidal, lignan and phenolic constituents of Ephedra alata*. Phytochemistry, 32(4), 1073–1075.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). *Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 1981 to 2019*. Journal of Natural Products, 83(3), 770–803.
- Niki, E. (2014). *Antioxidant capacity: Which capacity and how to assess it?* Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 54(1), 1–10.

O

- Oueslati, S., (2012). *Proteomic approach to understand molecular physiology of symbiotic interaction between Piriformospora indica and barley*. Journal of Proteome Research, 10(5), 2272–2282.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. The Japanese Journal of

Nutrition and Dietetics, 44(6), 307-315. (Référence princeps pour le principe de la réduction du fer).

- Ozturk, M., Duru, M. E., Kivrak, S., Mercan, N., Turkoglu, A., & Ozler, M. A. (2007). In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities of Haloxylon salicornicum. Food Chemistry, 103, 225-231. (Référence pour l'augmentation d'absorbance liée au pouvoir réducteur).

P

- Pour, A. M., Hosseini, S. M., & Mohammadi, M. (2023). *Antidiabetic and hypolipidemic effects of seed extracts in diabetic rats*. Journal of Ethnopharmacology, 302, 115910.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290–4302.

R

- Rezig, L., Chouaibi, M., Msaada, K., & Hamdi, S. (2012). *Chemical composition and profile of pumpkin (Cucurbita pepo L.) seed oil from Tunisia*. Industrial Crops and Products, 37(1), 353–359.

S

- Sies, H. (2017). *Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress (Eustress)*. Journal of Biological Chemistry, 292(29), 12152–12160.
- Sies, H. (2021). *Oxidative distress: Monitored damage to biomolecules*. Antioxidants & Redox Signaling, 34(12), 941–955.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). *Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents: Oxidative eustress*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 21(7), 363–383.
- Stadtman, E. R., & Berlett, B. S. (2015). *Reactive oxygen species and protein oxidation*. Free Radical Research, 49(6), 670–682.

- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2013). *Protein carbonylation and oxidative modification of critical amino acid residues*. Amino Acids, 45(2), 221–230.
- Syed, Q. A., Akram, M., & Shukat, R. (2019). *Nutritional and therapeutic potential of pumpkin seeds (Cucurbita pepo): A review*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8(6), 1162–1167.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chemistry, 112(3), 654-658. (Référence pour l'exploitation des régressions linéaires/logarithmiques de l'IC50).
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10), 4267-4274. (Référence pour le dosage des tanins condensés par la méthode à la vanilline).

T

- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development* (6th ed.). Sinauer Associates.
- Tedera, M., Shrestha, S., & Harrison, L. J. (2006). *In vitro α-glucosidase inhibitory activity of Syzygium cumini seeds and bark extracts*. Phytomedicine, 13(8), 581–585.
- Tlili, N., Khaldi, A., Triki, S., & Munné-Bosch, S. (2011). *Phenolic compounds and vitamin antioxidants of caper (Capparis spinosa)*. Plant Foods for Human Nutrition, 65(3), 260–265.
- Tamuly, C., Hazarika, M., Bordoloi, M., & Borah, S. C. (2014). Antioxidant activity and EC50 of Gymnema sylvestre R. Br. leaf extract. International Journal of Food Properties, 17, 120-130. (Référence pour l'efficience de concentration dans l'essai FRAP).
- Thalapaneni, S., Shwetha, G., & Shanthi, K. (2008). In vitro inhibition of \alpha-amylase activity by selected medicinal plants. Journal of Enzyme Inhibition, 23, 310-315. (Référence pour le protocole opératoire de l'activité anti-\alpha-amylase).

V

- Vermerris**,** W., & Nicholson, R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry. Springer Science & Business Media, Dordrecht. (Référence pour le dosage des polyphénols totaux au réactif de Folin-Ciocalteu).

W

- Wink, M. (2010). *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites* (Annual Plant Reviews, Vol. 39). Wiley-Blackwell.
- Wink, M. (2014). *Evolution of secondary metabolites and their genetic establishment*. Journal of Biotechnology, 185, S12–S13.
- Wink, M. (2015). *Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites*. Medicines, 2(3), 251–286.
- World Health Organization. (2019). *Classification of diabetes mellitus*. Geneva: World Health Organization.

Z

- Zhou, X., He, X., Wang, G., Gao, H., Zhou, G., Ye, W., & Yao, X. (2016). *Steroidal saponins from Solanum nigrum*. Journal of Natural Products, 69(8), 1158–1163.

الملخص

تتمحور هذه الدّراسة حول تقييم التركيب الكميائي الكمّي و النوعي لبذور اليقطين و كذا دراسة الفعالية المضادة للأكسدة بطريقتين: إختبار تثبيط الجذر الحر (DPPH) وإختبار القدرة المرجعة للحديد (FRAP) إضافة إلى تقييم فعالية تثبيط إنزيم الألفا-أميلاز لعدة مستخلصات (مائي, ماء/إيثانول , ماء/أسيتون).
أظهر التحليل الكّمي أن المستخلص الهيدروأسيتوني هو الأغنى بالبوليفينولات الكلية (20,91 ± 1,17 ملغ مكافئ حمض الغاليك في الغرام من المستخلص) والفلافونويدات (18,57 ± 1,39 ملغ مكافئ كاتيشين في الغرام من المستخلص) ، في حين تميز المستخلص المائي بمحتوى عالٍ جداً من العفص المكثف (172,44 ± 2,24 ملغ مكافئ كاتيشين في الغرام من المستخلص). ومن جهة أخرى، أظهر النشاط المضاد للأكسدة، الذي تم تقييمه بواسطة إختبار تثبيط الجذر الحرDPPH ، أن المستخلص المائي يمتلك أفضل قدرة تثبيط بتركيز نصفي قدره 49,5 ملغ/مل، متفوقاً بذلك على المستخلصين الهيدروأسيتوني (63,06 ملغ/مل) والهيدروإيثانولي (119,3 ملغ/مل)، رغم بقائه أقل من الشاهد الإيجابي حمض الأسكوربيك (0.106 ملغ/مل). وفي السّياق ذاته، أكّد إختبار إرجاع الحديد القدرة العالية للمستخلص الهيدروإيثانولي حيث سجل الفعالية الأعلى بـتركيز نصفي قدره 42,67 ملغ/مل. وأخيراً، كشف تقييم تثبيط إنزيم الألفا أميلاز عن فعالية بذور اليقطين، حيث حقق المستخلص الهيدروإيثانولي نسبة تثبيط بلغت 68% عند تركيز 54 ملغ/مل، بينما أظهر المستخلص الهيدروأسيتوني كفاءة أقل بوصوله إلى نسبة تثبيط قدرها 16% عند تركيز 52 ملغ/مل.

تثبت هذه النتائج أهمية بذور اليقطين كمصدر طبيعي لاستخلاص الجزيئات الحيوية الفعالة ذات الخصائص المضادة للأكسدة والنشاط المثبط للألفا أميلاز.

الكلمات المفتاحية: *Cucurbita pepo* ، بذور القرع، متعددات الفينول، النشاط المضاد للأكسدة، إختبارDPPH ، إختبارFRAP ، تثبيط إنزيم ألفا-أميلاز.

Résumé

Ce travail a porté sur l'évaluation phytochimiques qualitative et quantitative des graines de courge (*Cucurbita pepo*) ainsi que sur l'étude des potentiels antioxydant par deux méthodes (DPPH et FRAP) et inhibiteur de l'α-amylase *in vitro* de différents extraits (aqueux, hydroéthanolique et hydroacétonique). L'analyse quantitative révèle que l'extrait hydroacétonique est le plus riche en polyphénols totaux (18,57 ±1,39 mgEAG/gE) et en flavonoïdes (20,91 ± 1,17 mgEQC/gE), tandis que l'extrait aqueux se distingue par une teneur exceptionnellement élevée en tanins condensés (172,44 ±2,24 mgEQC/gE). L'activité antioxydante, évaluée par le test de piégeage du radical libre DPPH, a démontré que l'extrait aqueux possède le meilleur pouvoir inhibiteur avec une IC_{50} de 49,5 mg/mL, surpassant les extraits hydroacétonique (63,06 mg/mL) et hydroéthanolique (119,3 mg/mL), bien que restant inférieure à celle du témoin positif, l'acide ascorbique (IC_{50} = 0,106 mg/mL). Parallèlement, le test FRAP de réduction du fer confirme la forte capacité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique qui affiche l'efficacité la plus prometteuse avec une EC_{50} de 42,67 mg/mL. Enfin, l'évaluation du potentiel antidiabétique via l'inhibition de l'α-amylase a mis en évidence un effet dose-dépendant remarquable pour les extraits testés ; l'extrait hydroéthanolique atteint un pourcentage de 68% d'inhibition à 54 mg/mL, tandis que l'extrait hydroacétonique se montre moins performant en atteignant un taux d'inhibition de 16% à une concentration de 52 mg/mL.

L'ensemble de ces résultats valorise les extraits de *Cucurbita pepo* comme des sources naturelles majeures de molécules bioactives dotées de propriétés antioxydantes et d'une activité inhibitrice enzymatique d'intérêt pour la gestion du diabète.

Mots clés : *Cucurbita pepo*, graines de courge, composés phénoliques, activité antioxydante, DPPH, FRAP, inhibition de l'α-amylase.

Abstract

This work focused on the qualitative and quantitative phytochemical evaluation of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo*), as well as the assessment of their antioxidant potential using two methods (DPPH and FRAP) and their *in vitro* α-amylase inhibitory activity in different extracts (aqueous, hydroethanolic, and hydroacetonic).

Quantitative analysis revealed that the hydroacetonic extract was the richest in total polyphenols (18.57 ± 1.39 mg GAE/gE) and flavonoids (20.91 ± 1.17 mg QE/gE), whereas the aqueous extract was characterized by an exceptionally high content of condensed tannins (172.44 ± 2.24 mg QE/gE). Antioxidant activity, evaluated by the DPPH free radical scavenging assay, demonstrated that the aqueous extract exhibited the highest inhibitory capacity with an IC_{50} value of 49.5 mg/mL, outperforming the hydroacetonic (63.06 mg/mL) and hydroethanolic (119.3 mg/mL) extracts, although remaining lower than that of the positive control, ascorbic acid (IC_{50} = 0.106 mg/mL). In parallel, the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay confirmed the strong antioxidant potential of the hydroethanolic extract, which displayed the most promising activity with an EC50 value of 42.67 mg/mL.

Finally, the evaluation of the antidiabetic potential through α-amylase inhibition revealed a remarkable dose-dependent effect for the tested extracts. The hydroethanolic extract achieved 68% inhibition at a concentration of 54 mg/mL, whereas the hydroacetonic extract was less effective, reaching only 16% inhibition at a concentration of 52 mg/mL.

Overall, these findings highlight *Cucurbita pepo* extracts as important natural sources of bioactive compounds with antioxidant properties and enzyme inhibitory activity of potential interest for diabetes management.

Keywords : *Cucurbita pepo*, pumpkin seeds, polyphenol compounds, antioxidant activity, DPPH, FRAP, α-amylase inhibition.