

ESTIMATION DU POUVOIR ANTIOXYDANT DES DIFFERENTS EXTRAITS ORGANIQUES D'ECBALLIUM ELATERIUM (L.)

Imad Abdelhamid EL-HACI *, Fawzia ATIK BEKKARA

Laboratoire de Produits naturels, Département de Biologie moléculaire et cellulaire, BP 119, Université Abou Bekr Belkaïd (Tlemcen - Algérie).

*E-mail : imadelhaci@yahoo.fr, Tel : 07.90.20.12.42

Résumé :

Les dernières décennies sont marquées par l'intérêt particulier porté à la mise en valeur des plantes à intérêt médicinale comme source de substances bioactives naturelles. De ce fait, de nombreuses études s'intéressent, de plus en plus, aux effets thérapeutiques des antioxydants d'origine naturelle. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antioxydant des composés phénoliques, y compris les flavonoïdes, extraits d'une plante médicinale (*Ecballium elaterium* L.). La plante a présenté des teneurs moyennes en polyphénols et en flavonoïdes. Nous avons identifié deux composés dans la fraction butanolique à savoir ; la rutine et l'acide para-coumarique par chromatographie sur couche mince. L'estimation du pouvoir antioxydant des fractions organique a été évaluée par trois méthodes : la réduction du fer, le piégeage du radical libre DPPH et le piégeage du peroxyde d'hydrogène. Les résultats obtenus ont montré que les polyphénols (y compris les flavonoïdes) présentent une activité antioxydante moyenne par rapport aux témoins utilisés.

Mots clés : *Ecballium elaterium* ; activité antioxydante ; fractions organiques ; polyphénols ; flavonoïdes.

Abstract:

The last decades are marked by the special interest in the development of medicinal plants at interest as a source of bioactive natural. As a result, many studies focus, increasingly, the therapeutic effects of natural antioxidants. In this context, we are interested in the study of antioxidant phenolic compounds, including flavonoids, capacity of a medicinal plant extracts (*Ecballium elaterium* L.). The plant has presented mean levels of polyphenols and flavonoids. We have identified two compounds in butanolic fraction ; rutin and para-coumaric acid by thin layer chromatography (TLC) method. Estimation of antioxidant activity of organic fractions was assessed by three methods: the reduction of iron, the DPPH free radical scavenging and hydrogen peroxide scavenging. The results showed that the polyphenols (including flavonoids) exhibit average antioxidant activity compared with reference antioxidants.

Key words: *Ecballium elaterium* ; antioxidant activity; organic fractions ; polyphenols ; flavonoids.

I. Introduction :

Du fait de leurs abondances dans la nature et de leurs utilisations par les populations indigènes pour se soigner, certaines plantes se sont imposées dans le monde médicinal. Cependant, la médecine traditionnelle réunit l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales (OMS, 2009). Ces dernières années, le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité, non seulement les populations des pays en développement y ont accès, mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans les systèmes de santé. Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans plusieurs industries (en alimentation, cosmétologie, dermatopharmacie). Parmi ces composés, les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés dans le domaine thérapeutique. Occupant une place prépondérante dans le groupe des polyphénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Ces composés sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, telles que les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Anderson et Markham, 2006). Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres. Ces nombreuses propriétés relatives à la santé, largement décrites dans des études épidémiologiques, sont principalement basées sur leurs activités antioxydantes (Dugas et al., 2000). Les Travaux récents visent à isoler de nouvelles substances à partir des plantes et à trouver d'autres voies d'applications dans différents *Ecballium elaterium* (L.), connue sous le nom vernaculaire «Concombre d'âne».

Le peu de travaux effectués sur cette plante, que ça soit pour l'activité antioxydante ou l'étude des composés phénoliques y compris les flavonoïdes, nous a encouragé à étudier le pouvoir antioxydant de ces composés afin d'enrichir les connaissances sur les activités biologiques de cette plante. *Ecballium elaterium* (L.) (Cucurbitacées) est une

plante médicinale sauvage trouvée abondamment dans le Sud-Ouest de l'Europe et en Afrique du Nord en terrains caillouteux, dans les décombres et sur des talus (Greige-Gerges et al., 2007). La plante est connue comme herbe officinale d'une longue tradition et d'une grande variété d'utilisations en bassin méditerranéen. Elle est employée souvent dans l'hydropisie (œdème), particulièrement l'œdème pulmonaire et aussi en tant que révulsif dans les affections cérébrales (Felter et Lloyd, 2008). La racine est fortement purgative. Le contenu de son fruit se révèle violemment diurétique. Il renferme un glucoside spécifique qui se dédouble en glucose et en élatérine. Les effets bénéfiques du jus frais ont été rapportés comprenant l'analgésique, l'antipyrétique et l'anti-inflammatoire (Agil et al., 1995 ; Khatib et al., 1993). Le jus brut frais est employé fréquemment dans le traitement de la sinusite (Kloutsos et al., 2001) et de l'ictère par des aspirations nasales (Eray et al., 1999). Un grand nombre d'activités biologiques de cette espèce ont été attribués aux cucurbitacines et à leurs dérivés glycosylés tels que l'activité antiproliférative sur diverses variétés de cellules cancéreuses (Blaskovich et al., 2003; Sun et al., 2005). Mais ses plus intéressantes potentialités relèvent peut être de son comportement antiviral (Boullard, 2001). Parmi les travaux effectués sur cette espèce, les travaux de Rao et Lavie (1974), sur l'identification des composés phénoliques ont permis de dévoiler la présence de cinq composés phénoliques qui sont: l'hydroquinone, 4-hydroxy acetophenone, 4hydroxy-3-methoxy acetophenone, 2-nitroquinol et la 4-hydroxyphenyl- Iignane.

En 2007, Tannin-Spitz et al. ont étudié le pouvoir antioxydant des cucurbitacines isolés d'*Ecballium elaterium* par l'étude du piégeage du 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS^{•+}), pour en conclure que les cucurbitacines ne présentent pas une activité antioxydante considérable.

II. Matériel et Méthodes

1. Récolte de la plante

La plante (*Ecballium elaterium*), a été récoltée de la région de Bouhanek, wilaya de Tlemcen, le mois de décembre 2007.

Le matériel végétal ainsi récolté, est ensuite séché à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil. Une fois séchée, la matière végétale a été réduite en poudre à l'aide d'un mortier, puis soumise à l'extraction.

2. Extraction et fractionnement des composés phénoliques

Nous avons utilisé pour l'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes la méthode décrite par Bekkara et al., 1998.

2.1. Préparation de l'extrait brut méthanolique

La matière végétale, sèche et broyée, est mise en contact avec le mélange méthanol/eau (70:30) (v/v). La préparation est portée sous reflux pendant 3h. Après refroidissement à température ambiante, l'extrait méthanolique est filtré puis évaporé sous pression réduite à sec ($T^{\circ}= 60^{\circ}\text{C}$) par un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R-200). Le résidu sec est repris par quelques millilitres de méthanol et conservé à $+4^{\circ}\text{C}$. Ce dernier étant l'extrait brut méthanolique.

2.2. Fractionnement:

Les solvants que nous avons employés pour le partage liquide-liquide sont : l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Les conditions opératoires sont les suivantes:

□ Les résidus secs obtenus après évaporation du filtrat méthanolique de chaque partie étudié (feuille et tige), sont partagés entre 20 mL d'acétate d'éthyle et le même volume d'eau distillée dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée et la phase aqueuse est à nouveau partagée avec 20 mL d'acétate d'éthyle. La phase d'acétate d'éthyle est récupérée, additionnée à la précédente et séchée par un évaporateur rotatif sous pression réduite à 60°C . Le résidu sec est repris par quelques millilitres de méthanol et conservé à $+4^{\circ}\text{C}$. Cette fraction est la phase d'acétate d'éthyle.

□ La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est, quant à elle, partagée avec 20 mL du n-butanol. L'opération est répétée deux fois et la phase n-butanol est séchée au rotavapor à 60°C . Le résidu sec est repris par quelques millilitres de méthanol et conservé à $+4^{\circ}\text{C}$. Cette fraction est la phase butanolique.

La figure n°01, représente le protocole général d'extraction des polyphénols et des flavonoïdes, ainsi que les différents dosages et méthodes utilisées pour l'étude du pouvoir antioxydant des différentes fractions obtenues.

3. Dosage des polyphénols: Le dosage des polyphénols

est réalisé par la méthode décrite par Vermerius et Nicholson, (2006). 0.1 mL de l'extrait brut méthanolique de chaque partie (feuille et tige) est mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100 μL du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (Perkin Elmer, Lambda 800 Spectrophotometer) à 700 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g).

4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par la méthode décrite par Ardestani et Yazdanparast, 2007. 500 μL de l'extrait brut méthanolique de chaque partie (feuille et tige) sont mélangés avec 2 mL d'eau distillée, suivis de 150 μL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15%. Après 6 min, 150 μL de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 10% sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 6 min. Ensuite, 2 mL d'hydroxyde de sodium à 4% sont ajoutés aux tubes et le volume final est complété immédiatement à 5 mL. Après 15 min, la lecture est faite à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg CEQ/g).

5. Identification des composés phénolique par chromatographie sur couche mince

Nous avons utilisé des plaques de chromatographie sur couche mince de taille 20x20 cm pour la séparation des fractions acétate d'éthyle et n-butanol. Nous avons utilisé un système (1) d'élution sur une plaque de CCM/ cellulose: (Onyilagha et al., 2003).

Système 1: Butanol/Acide acétique/ H_2O (4:1:5)

Nous avons utilisé un système (2) d'élution sur une plaque de CCM/ gel de polyamide DC6:

Système 2 : Butanol/ Acide acétique/ H_2O (4:1:5) (Markham, 1982).

Après développement du chromatogramme, les plaques sont séchées à température ambiante, puis examinées par les rayons ultraviolets à 365 nm.

6. Etude de l'activité antioxydante

6.1. Réduction du Fer: FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Le protocole expérimental suivi est celui de Karagözler et al., 2008. 1 mL des différentes fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) à différentes concentrations (concentrations initiales: 0.1mg/mL, 0.25mg/mL et 0.75mg/mL), est mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate 0.2M (pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante.

2.5 mL d'acide trichlor-acétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. 2.5 mL du surnageant sont ajoutés à 2.5 mL d'eau distillée et 500 μ L d'une solution de chlorure du fer ($FeCl_3$, $6H_2O$) à 0.1% sont ajoutés au mélange. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

6.2. Piégeage du radical libre DPPH' (2,2diphényle-1-picrylhydrazyl)

Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH', est celui de El-Haci et al. (2009). 50 μ L de chaque solution méthanolique des différentes fractions (acétate d'éthyle et n-butanol) à différentes concentrations, sont ajoutés à 1950 μ L d'une solution méthanolique de DPPH' à 6.34×10^{-5} M. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé, en mélangeant 50 μ L du méthanol avec 1950 μ L d'une solution méthanolique de DPPH' à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm et les pourcentages d'inhibitions sont calculés par la formule suivante :

$$I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

A_C : Absorbance du contrôle ;

A_T : Absorbance du test effectué.

Les IC_{50} (concentration inhibitrice de 50%) sont déterminées à partir des équations des régressions linéaires pour chaque fraction.

6.3. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 scavenging activity)

Pour étudier l'activité du piégeage du H_2O_2 , nous avons utilisé la méthode décrite par Ruch et al. (1989) et Bozin et al. (2008). 3.4 mL de l'extrait brut méthanolique de chaque partie

(tige et feuille) à une seule concentration (0.1 μ g/mL) préparés dans une solution tampon phosphate à 0.1 M (pH 7.4) sont mélangés avec 600 μ L d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 43 mM (préparée dans le même tampon phosphate). La réaction des échantillons avec le peroxyde d'hydrogène est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre à 230 nm pendant 40 à 10 min d'intervalle. Dans les mêmes conditions opératoires, le BHA (butylhydroxyanisole), à la même concentration choisie, est utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ du piégeage du } H_2O_2 = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

A_C : Absorbance du contrôle

A_T : Absorbance du test.

III. Résultats et discussion

1. Rendements en extraits secs

Les résultats obtenus, montrent que la plante étudiée présente des rendements en extrait sec plus ou moins élevés avec une prédominance du rendement obtenu dans la partie feuille par rapport à la partie tige (19.5% et 17,8%, respectivement).

Nous pouvons dire que le protocole expérimental utilisé pour l'extraction des composés phénoliques est satisfaisant et fiable, puisqu'il a donné des rendements assez élevés pour les différentes parties de la plante. Ceci peut être expliqué par le fait que le protocole respecte les paramètres qui régissent les extractions solide-liquide concernant l'extraction des polyphénols qui sont: l'augmentation de la température et le temps de contact du matériel végétal avec le solvant d'extraction, ainsi que la diminution de la taille des particules afin d'augmenter le coefficient de diffusion du solvant (Bruneton, 2005).

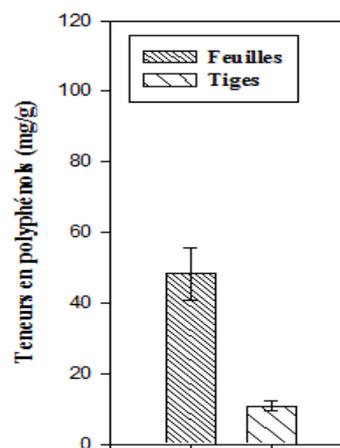


Fig.02. Teneurs en polyphénols d'Ecballium elaterium

2. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes

1. Polyphénols

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique. Nous avons remarqué des teneurs variées en polyphénols, à savoir $48,22 \pm 7.5$ mg GAE/g et $10,71 \pm 1.35$ mg GAE/g, pour les feuilles et les tiges, respectivement (fig. 02).

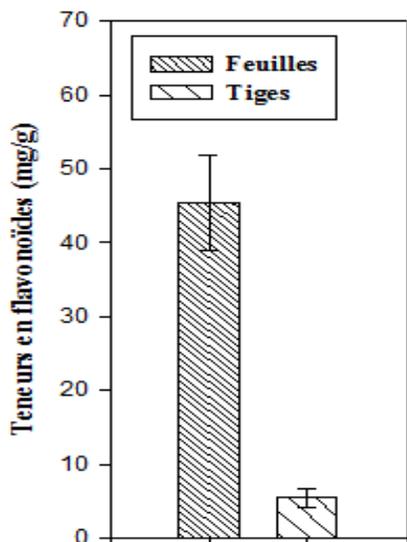


Fig.03. Teneurs en flavonoïdes d'Ecballium elaterium

2. Les flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (AlCl₃). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg CEQ/g) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la catéchine. Nous avons remarqué des teneurs variées en flavonoïdes, à savoir $45,43 \pm 6.38$ mg CEQ/g et $5,45 \pm 1.29$ mg CEQ/g, pour les feuilles et les tiges, respectivement (fig. 03).

Nous avons utilisé dans notre travail deux systèmes d'élution sur deux différents adsorbants pour séparer les fractions acétate d'éthyle et n-butanol de chaque partie étudiée (fig. 04).

Le premier système :

Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence dans la phase acétate d'éthyle la présence d'un seul composé pour la partie tige, alors que la partie feuille n'a révélé aucun composé. La phase n-butanol a révélé sept composés pour la partie feuille et cinq composés pour la partie tige (Tableau I).

1. Phase acétate d'éthyle, Feuille
2. Phase n-butanol, Feuille
3. Phase acétate d'éthyle, Tige
4. Phase n-butanol, Tige

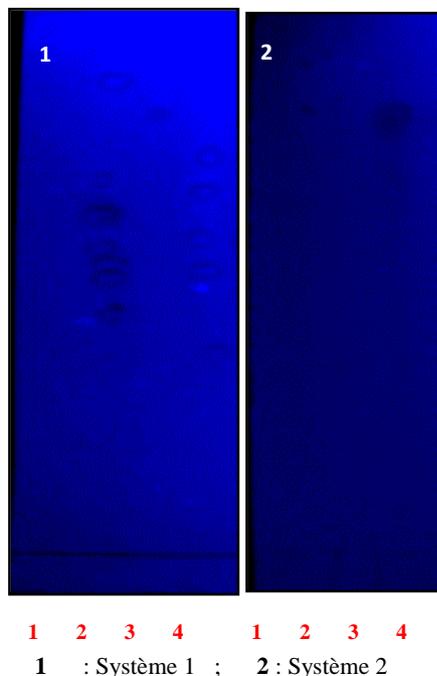


Fig. 04. Photos des plaques CCM prises après révélation à la lumière UV (365 nm) pour les phases acétate d'éthyle et n-butanol d'Ecballium elaterium,

Le deuxième système :

Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence dans la phase acétate d'éthyle un seul composé dans les deux parties étudiées. La phase n-butanol a révélé la présence de trois (3) composés dans les deux parties feuille et tige (Tableau II). Pour mieux séparer les composés contenus dans les fractions chromatographie sur couche mince, un choix préalable des adsorbants et des systèmes d'élution, est fait à partir d'une étude bibliographique appropriée. D'après Wall (2005). Le support de gel de polyamide est un adsorbant spécifique pour la séparation des flavonoïdes, avec le système d'élution BAW (Butanol/Acide Acétique/ Eau) (4:1:5), qui donne dans la plus part des séparations un rendement et des résultats satisfaisants.

Tableau I : Résultats de la chromatographie sur couche mince sur cellulose

Partie étudiée	Phase acétate d'éthyle	Couleurs des spots (UV à 365 nm)	Suggestion des classes de flavonoïdes (Markham, 1982)	Phase butanol	Couleurs des spots (UV à 365 nm)	Suggestion des classes de flavonoïdes (Markham, 1982)
	R _f			R _f		
Feuille	-	-	-	0.42	Jaune	Flavonol
				0.49	Jaune	Flavonol
				0.51	Violet	Flavone
				0.55	Jaune	Flavonol
				0.60	Jaune	Flavonol
				0.67	Violet	Flavone
				0.84	Violet	Flavone
Tige	0.79	Violet	Flavone	0.36	Violet	Flavone
				0.51	Violet	Flavone
				0.56	Violet	Flavone
				0.65	Violet	Flavone
				0.72	Violet	Flavone

Tableau II: Résultats de la chromatographie sur couche mince sur gel de polyamide DC 6

Partie étudiée	Phase acétate d'éthyle	Couleurs des spots (UV à 365 nm)	Suggestion des classes de flavonoïdes (Markham, 1982)	Phase butanol	Couleur des spots (UV à 365 nm)	Suggestion des classes de flavonoïdes (Markham, 1982)
	R _f			R _f		
Feuille	0.69	Mauve	Anthocyanidine 3-glycoside	0.56	Mauve	Anthocyanidine 3-glycoside Flavone Flavonol
				0.67	Violet	
				0.71	Jaune	
Tige	0.67	Mauve	Anthocyanidine 3-glycoside	0.67	Mauve	Anthocyanidine 3-glycoside Flavone Anthocyanidine 3-glycoside
				0.75	Violet	
				0.80	Mauve	

Choix des systèmes d'élution et des adsorbants:

L'adsorbant à base de cellulose est un support spécifique pour les acides aminés et leurs dérivés et aussi pour les hydrates de carbone (Wall, 2005), et non spécifique aux flavonoïdes. L'introduction de ce type d'adsorbant dans la séparation des flavonoïdes est récente. L'étude faite par Onyilagha et al. (2003), a révélé une bonne séparation de certains types de flavonoïdes sur ce type de support avec le système d'élution BAW (Butanol / Acide Acétique / Eau) (4:1:5).

Essai d'identification des composés par CCM :

Pour l'essai d'identification des composés par CCM, nous avons utilisé six témoins, sur les deux systèmes d'élution. Les résultats obtenus sont rapportés dans les tableaux III.

Grace à cette approche, nous avons pu mettre en évidence dans la fraction n-butanol deux composés, la rutine par le biais du premier système, et l'acide para- coumarique par le biais du deuxième système.

Ces résultats peuvent être confirmés par l'utilisation d'autres méthodes chromatographiques plus performantes et d'avantages de témoins.

4. Etude de l'activité antioxydante

4.1. Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power) :

La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (Karagozler et al., 2008). La présence des réductants dans un milieu donné cause la réduction du complexe Fe³⁺ ferricyanide à la forme Fe²⁺. En effet, la formation de Fe²⁺ peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la densité de la couleur bleu du complexe ferreux du milieu réactionnel à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Ozturk et al., 2007). La figure 05 montre la puissance de réduction du fer des fractions acétate d'éthyle et n-butanol d'*Ecballium elaterium*. Nous remarquons, sur les graphes de la figure 05, que la phase acétate d'éthyle de la partie feuille d'*Ecballium elaterium* a présenté le plus d'activité pour réduire le fer par rapport aux autres fractions, mais nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique, reflétée par les densités optiques obtenues à différentes concentrations de celui-ci.

Nous remarquons aussi, que la partie tige a présenté une très faible activité pour les deux fractions étudiées pour réduire le fer, observée par des valeurs de densités optiques (DO) qui ne dépassent pas 0.5, alors que le témoin positif fourni une DO égale à 3 à la même concentration (3mg/mL).

Tableau III: Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins utilisés sur gel de cellulose BAW (4:1:5)

Témoins	CCM des témoins utilisés sur gel de cellulose BAW (4:1:5)		CCM des témoins utilisés sur gel de polyamide DC 6 BAW (4:1:5)	
	R _f	Révélation sous UV 365 nm	R _f	Révélation sous UV 365 nm
A. gallique – A. phénol	0.64	Violet	0.29	Violet
A. p-coumarique – A. phénolique	0.94	Bleu pale	0.65	Violet
Pyrocatechol – Phénol	0.91	Violet	0.64	Violet
Catéchine – Flavonol	0.70	Violet	0.23	Bleu
Quercétine – Flavonol	0.72	Vert fluorescent	0.16	Vert-jaunâtre
Rutine – Flavonol	0.55	Marron	0.67	Jaune

Nous avons remarqué une augmentation de la réduction du fer avec l'augmentation des concentrations utilisées. En revanche, nous avons constaté une proportionnalité linéaire directe, ce qui signifie une faible activité réductrice des deux fractions comparée à celle de l'acide ascorbique, qui présente une allure de graphe différente, son activité augmente pour un faible changement de concentration.

2D Graph 9

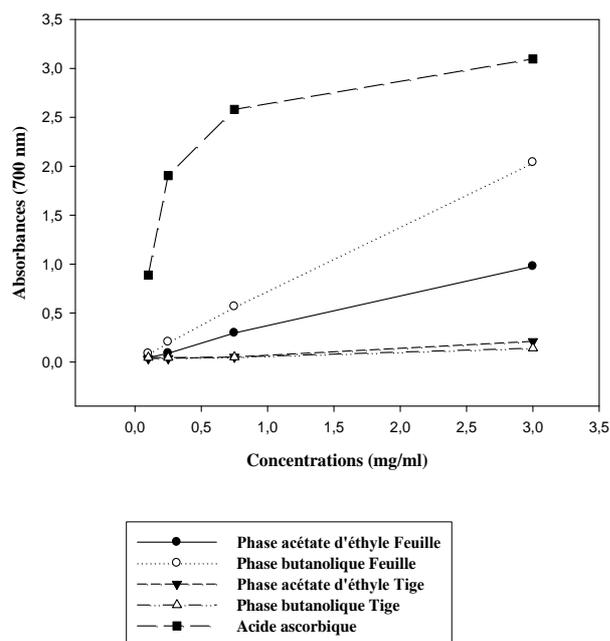


Fig. 05. Pouvoir réducteur des fractions acétate d'éthyle et n-butanol d'*Ecballium elaterium* testées par la méthode FRAP

Discussion

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yang et al., 2008). Beaucoup de publications ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Yildirim et al., 2001). Les résultats obtenus, pour un extrait végétal qui possède une grande activité, suggèrent que ce dernier a un pouvoir remarquable pour donner des électrons aux radicaux libres réactifs, les convertissant en espèces non-réactives plus stable et terminant, ainsi, la réaction en chaîne des radicaux libres.

4.2. Piégeage du radical libre DPPH' (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le radical DPPH' est l'un des substrats les plus utilisés

généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin et al., 2008).

La figure 06 montre les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations utilisées pour la fraction acétate d'éthyle des deux parties étudiées d'*Ecballium elaterium*.

La phase acétate d'éthyle de la partie feuille a montré une activité élevée de piégeage du radical DPPH', ceci est démontré par l'allure du graphe qui trace une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire, qui définit la réduction presque complète du DPPH' en sa forme non radicalaire. En ce qui concerne la partie tige, nous constatons que cette fraction n'a pas présenté une activité vis-à-vis du radical DPPH', puisque à une concentration de 16,66 mg/mL, nous avons trouvé un pourcentage d'inhibition égale à 37,93 % ± 0,67. La figure 07 montre les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations utilisées pour la fraction n-butanol des deux parties étudiées d'*Ecballium elaterium*.

La phase butanolique de la partie feuille a montré une activité élevée de piégeage du radical libre DPPH', du fait qu'elle a tracé une courbe exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du DPPH'. Par ailleurs, la partie tige n'a présenté guère d'activité vis-à-vis du radical DPPH', cette dernière a fourni un pourcentage d'inhibition égale à 24,64 % ± 4,72, à une concentration de 34,44 mg/mL.

Les résultats obtenus montrent que l'activité antioxydante des différentes fractions étudiées dépend d'une manière directe des concentrations utilisées qui mettent en relation la présence des composés phénoliques contenus dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol et l'activité antioxydante. Pour les deux fractions de la partie feuille, nous avons obtenu des pourcentages d'inhibition élevés à différentes concentrations, ce qui reflète la présence des composés qui peuvent réduire le radical DPPH'. En revanche, nous avons observé des pourcentages d'inhibition bas dans les deux fractions étudiées de la partie tige.

Calcul des IC₅₀ : Pour chaque fraction étudiée (acétate d'éthyle et n-butanol), nous avons analysé une gamme de dilution pour établir la concentration de chaque fraction nécessaire pour réduire 50 % du radical libre, autrement appelée IC₅₀. à partir des équations des régressions linéaires des graphes tracés, nous avons calculé les IC₅₀ de chaque fraction pour chaque partie de la plante étudiée. Les valeurs des IC₅₀ sont données dans le tableau 7.

La valeur d'IC₅₀ de l'acide ascorbique que nous avons trouvée (2.97 µg/mL), est proche des valeurs d'IC₅₀ trouvées par Conforti et al. (2008) (de l'ordre de 2 µg/mL) et Chew et al. (2008) (de l'ordre de 3.82µg/mL). Nous remarquons que l'acide ascorbique présente l'activité anti-radicalaire la plus élevée, et nous constatons que les deux fractions organiques ont présenté une activité antiradicalaire moyenne avec une activité remarquable de la fraction butanolique.

Tableau 7 : Valeurs des IC₅₀ trouvées pour les fractions acétate d'éthyle et n-butanol des deux parties, feuille et tige, d'*Ecballium elaterium*

		Phase acétate d'éthyle	Phase butanolique
		IC ₅₀ exprimées en µg/mL [Concentrations finales]	
<i>Ecballium elaterium</i>	Feuille	39.60	14.54
	Tige	N.D*	N.D*
Acide ascorbique		2.97	

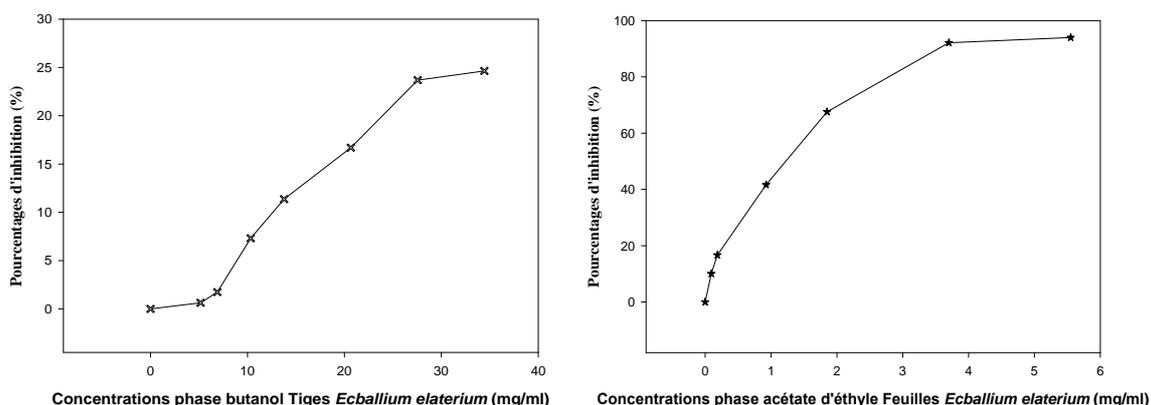


Fig. 06. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour la fraction acétate d'éthyle pour les deux parties étudiées d'*Ecballium elaterium*

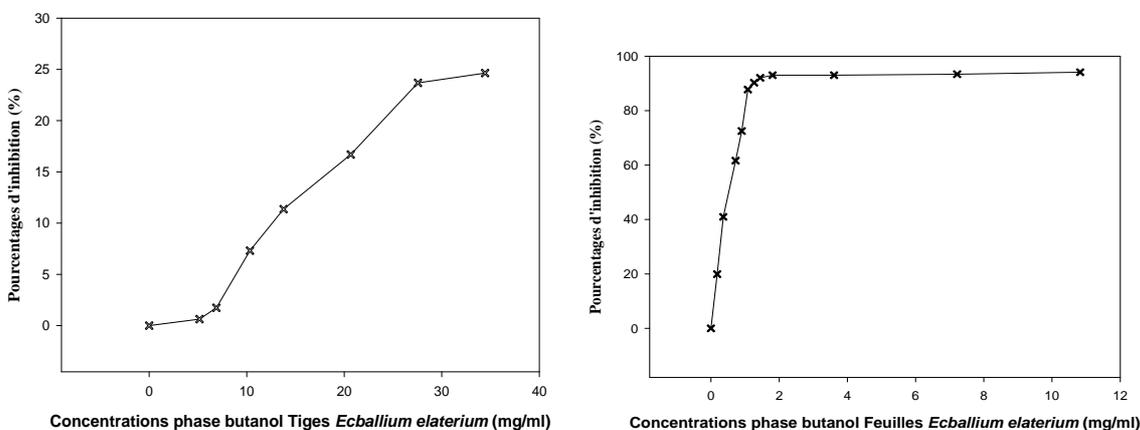


Fig. 07. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour la fraction n-butanol pour les deux parties étudiées d'*Ecballium elaterium*

Alors que nous n'avons pas pu révéler la moindre activité dans les fractions organique de la partie tige. L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. La cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène, rapporté par Fabri et al. (2009). Par ailleurs, la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leur structure (Sharififar et al., 2009). Il existe quelques flavonoïdes qui réagissent rapidement avec le radical DPPH[•], cela peut être expliqué par la présence des groupes hydroxyles dans la structure de ces molécules, en particulier les substitutions 3-OH (Sharififar et al., 2009).

Dans notre étude, la phase butanolique de la partie feuille de *Ecballium elaterium* a présenté une activité antioxydante remarquable mais qui est moyenne par rapport à celle de l'acide ascorbique, ceci suggère que cette plante possède des composés (rutine et acide para-coumarique identifiés par CCM) doués d'activité antioxydante.

4.3. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ scavenging activity)

Nous avons étudié l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits bruts méthanoliques des deux parties (feuille et tige) de la plante, suivant la méthode décrite par Ruch et al.

A la concentration utilisée (0.1 µg/mL), nous remarquons que le BHA exerce un effet puissant de l'ordre de 90.65 %.

En ce qui concerne les extraits testés, l'extrait brut des feuilles exerce un effet de l'ordre de 39.50%, suivi par l'extrait brut des tiges avec un pourcentage de 15.43%.

Le peroxyde d'hydrogène en lui-même n'est pas très réactif, mais il est parfois toxiques pour la cellule parce qu'il est à l'origine des radicaux hydroxyles présents dans les cellules. Par conséquent, le retrait de H₂O₂ est très important pour la défense antioxydante dans la cellule (Halliwell, 1991). Les polyphénols ont été démontrés pour avoir une action protectrice chez les mammifères et les cellules bactériennes contre la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène, avec notamment des composés phénoliques de type flavonoïdes, tels que la quercétine, la catéchine, et d'autres polyphénols comme les esters d'acide gallique et d'acide caféique (Kumaran et Karunakaran, 2007).

D'après nos résultats, nous remarquons qu'*Ecballium elaterium* a présenté une activité moyenne par rapport à l'antioxydant de référence (BHA). Ceci peut être expliqué par les teneurs de cette plante en flavonoïdes (45,43 mg CEQ/g pour la partie feuille et 5.45 mg CEQ/g pour la partie tige), et en polyphénols (48,22 mg GAE/g pour la partie feuille et 10.71 mg GAE/g pour la partie tige), ce qui implique que l'extrait brut de cette plante renferme des polyphénols (hydroquinone, 4hydroxy acetophenone, 4-hydroxy-3-methoxy acetophenone, D'après nos résultats, nous remarquons qu'*Ecballium elaterium* a présenté une activité moyenne par rapport à l'antioxydant de référence (BHA). Ceci peut être expliqué par les teneurs de cette plante en flavonoïdes (45,43 mg CEQ/g pour la partie feuille et 5.45 mg CEQ/g pour la partie tige), et en polyphénols (48,22 mg GAE/g pour la

Tableau 8 : Pourcentages de piégeage du H₂O₂ des extraits bruts méthanoliques d'*Ecballium elaterium*

Echantillons	Temps (min)				
	0	10	20	30	40
Butylhydroxyanisole (BHA)	90,65	75,86	61,98	53,27	45,63
<i>Ecballium elaterium</i> Feuille	39,50	33,36	26,99	05,08	04,25
<i>Ecballium elaterium</i> Tige	15,43	15,13	09,24	07,59	04,04

partie feuille et 10.71 mg GAE/g pour la partie tige), ce qui implique que l'extrait brut de cette plante renferme des polyphénols (hydroquinone, 4-hydroxy acetophenone, 4-hydroxy-3-methoxy acetophenone, para-coumarique), et des flavonoïdes (rutine) qui ont la capacité de donner des électrons pour favoriser la conversion du H₂O₂ en H₂O (Ruch et al., 1989 ; Shon et al., 2007).

IV. Conclusion

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les extraits organiques des différentes parties de la plante étudiée, ont présenté une activité antioxydante moyenne vis-à-vis des antioxydants de référence utilisés, et ce par trois méthodes d'étude du pouvoir antioxydant. Ces résultats sont à estimer d'un œil critique, l'activité d'un extrait ou d'une fraction étant due à l'activité intrinsèque des composantes actives et de leur quantité relative, un résultat négatif peut être la conséquence de la présence d'une faible quantité de produits actifs dans l'extrait que d'une grande quantité de produits non actifs. Par conséquent, un screening phytochimique approfondi, une extraction des différents métabolites secondaires, une étude de leur pouvoir antioxydant et d'autre activité biologique, sont recommandés afin de pouvoir explorer la plante et, peut être, comprendre les mécanismes pour lesquelles elle est utilisée en médecine traditionnelle.

V. Références

- [1] Agil, M.A., Risco, S., Miro, M., Navarro, M.C., Ocete, M.A., Jimenez, J. (1995). Analgesic and antipyretic effects of *Ecballium elaterium* (L.) Extract in rodents, *Phytother. Res*, 9, 135-138.
- [2] Anderson, O.M., Markham, K.R. (2006) *FLAVONOIDS : Chemistry, Biochemistry and Applications*, Edited by Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press, 397-425.
- [3] Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxidation, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2402-2411.
- [4] Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R. (1998). Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, *Journal Plant and Soil*, 203, 27-36.
- [5] Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., Sebt, S.M. (2003). Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice, *Cancer Res*, 63, 1270-1279.
- [6] Boullard, B. (2001). *Plantes médicinales du monde: Réalités & Croyances*, Publié par Estem, ISBN 2843711177, 9782843711176, Disponible en ligne sur le site <http://Books.Google.fr/>, p 660.
- [7] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Igc, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111, 925-929.
- [8] Bruneton, J. (2005). *Composés phénoliques, pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3^{ème} édition, Tec et doc, Paris, 233-447.
- [9] Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M., Khoo, K.S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia, *LWT*, 41, 1067-1072.
- [10] Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F., Loggia, R.D. (2008). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 144-151.
- [11] Dugas, A.J., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G.C., Price, K.L., Fischer, N.H., Winston, G.W. (2000). Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships, *Journal Nat Prod*, 63, 31-327.
- [12] El-Haci, I.A., Didi, A., Atik Bekkara, F., Gherib, M. (2009). In vitro antioxidant activity and total phenolic contents in methanol crude extracts from the Algerian medicinal plant *Limoniastrum feei*, *Scientific Study & Research*, 10, 329-336.
- [13] Eray, O., Tuncok, Y., Eray, E., Gunerli, A., Guven, H. (1999). Severe uvular angioedema caused by Intranasal administration of *Ecballium elaterium*, *Vet Hum Toxicol*, 41, 376-378.
- [14] Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Braga, F.G., Coimbra, E.S., Scio, E. (2009). *Mitracarpus frigidusa* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial and antioxidant effects, *Bioresource Technology*, 100, 428-433.

- [15] Felter, H.W., Lloyd, J.U. (2008). In King's American Dispensatory, disponible sur le site :Erreur ! Référence de lien hypertexte non valide.
- [16] Greige-Gerges, H., Abou Khalil, R., Abou Mansour, E., Magdalou, J., Chahine, R., Ouaini, N. (2007). Cucurbitacins from *Ecballium elaterium* juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma, *Chemico-Biological Interactions*, 169, 53–62.
- [17] Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease, *American Journal of Medicine*, 91, 14-22.
- [18] Karagözler, A.A., Erdag, B., Emek, Y.G., Uygum, D.A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111, 400-407.
- [19] Khatib, S.Y., Mahmoud, I., Hasan, Z.A. (1993). Effects of crude *Ecballium elaterium* juice on isolated rabbit heart, *Int Journal Pharmacogn*, 31, 259–268.
- [20] Kloutsos, G., Balatsouras, D.G., Kaberos, A.C., Kandiloros, D., Ferekidis, E., Economou, C. (2001). Upper airway edema resulting from use of *Ecballium elaterium*, *Laryngoscope*, 111, 1652–1655.
- [21] Kumaran, A., Karuna Karan, R.J. (2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of 5 *Phyllanthus* species from India, *LWT*, 40, 344-52.
- [22] Markham, K.R. (1982). Paper chromatography and the recognition of flavonoids, flavonoid structure information from p.c. data, *Technique of flavonoid identification*, *Biological techniques series*, 135-189.
- [23] Onyilagha, J., Bala, A., Hallett, R., Gruber, M., Sorok, J. (2003). Neil Westcott Leaf flavonoids of the cruciferous species, *Camelina sativa*, *Crambe* spp., *Thlaspi arvense* and several other genera of the family, *Brassicaceae Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 1309-1322.
- [24] Organisation Mondiale de la Santé (2009). La médecine traditionnelle, principaux points, centre des medias, onglet : programme et projets. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/fr/>.
- [25] Ozturk, M., Aydogmus-Ozturk, F., Duru, M.E., Topçu, G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant, *Food Chemistry*, 103, 623-630. Rao, M.M., Lavie, D. (1974). The constituents of *Ecballium elaterium*, phenolics as minor components, *Tetrahedron*, 30, 3309-3313.
- [26] Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis*, 10 (6), 1003-1008.
- [30] Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Grossman, S. (2007). Cucurbitacin glucosides: Antioxidant and free-radical scavenging activities, *Biochemical and Biophysical Research Communi.*, 364, 181-86.
- [31] Vermerris, W., Nicholson, R. (2006). Isolation and Identification of Phenolic Compounds, *Phenolic Compound Biochemistry*, Published by Springer, Dordrecht, 62-191.
- [32] Wall, P.E. (2005). Sorbents and TLC Layers, *Thin-layer Chromatography : A Modern Practical Approach*, The Royal Society of Chemistry, Athenaeum Press Ltd, Gateshead, Tyne and Wear, 06-55.
- [33] Yang, J., Guo, J., Yuan, J. (2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin, *LWT*, 41, 1060-1066. Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083-4089.