



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABD EL HAMID IBN BADIS MOSTAGANEM

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE & DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE DE DOCTORAT 3^{ème} Cycle (Doctorat LMD)

Domaine : Sciences de la Nature & de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Nutrition et Santé

**Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques,
des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS)**

THEME

**ACTIVITES BIOLOGIQUES DES CAROTENOIDES ET DES
POLYPHENOLS DE LA COURGE (*CUCURBITA MOSCHATA* D.)**

Présentée par :

M^{me} BOUAMAR Sarah

Soutenue le 9 juin 2019 devant le jury :

Président :	Pr. HALBOUCHE Miloud	Université de Mostaganem
Rapporteur :	Pr. RIAZI Ali	Université de Mostaganem
Examineur :	Pr. LOTMANI Brahim	Université de Mostaganem
Examineur :	Pr. BENALI Mohamed	Université de Sidi-Bel-Abbes
Examineur :	Pr. KROUF Jamil	Université d'Oran 1

Année Universitaire : 2018-2019

Dédicace

À l'âme de mon cher père.

À ma mère qui a béni mon désir d'apprendre et m'a toujours encouragée,
avec tout mon amour et ma reconnaissance pour être devenue ce que je suis.

À mon cher mari Aboubakr

À mes chères filles Rihem et Nihel.

À mes chers frères Kader, Hocine et Mustapha.

À mes amis.

À tous ceux que j'aurais oublié de citer

Sarah, Juin 2019

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Ce sujet de thèse m'a été proposé par le Pr Riazi Ali, mon directeur de recherches, à qui j'exprime mes vifs remerciements pour m'avoir accepté dans son laboratoire, pour les enseignements et la rigueur scientifique qu'il m'a appris, pour ses nombreux conseils et orientations qui m'ont permis de mener à bien ce travail de recherche. Je vous exprime toute ma gratitude.

C'est un grand honneur pour moi de voir siéger dans mon jury de thèse le Professeur Halbouche Miloud de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. Je lui adresse mes respectueux remerciements pour avoir accepté de présider ce jury.

A Monsieur le professeur Lotmani Brahim, j'adresse mes remerciements pour son acceptation d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont aussi au membre du jury le Professeur Benali Mohamed de l'université de Sidi-Bel-Abbes qui donnera à mon travail une valeur ajoutée à travers ses recommandations si importantes et dont je serai très reconnaissante.

J'aimerais également remercier le Professeur Krouf Jamil de l'université Oran 1 pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à Melle MOKHTAR Meriem, Maître de conférences de classe A à l'université de Mostaganem pour toute l'aide qu'elle m'a apportée, les discussions fructueuses qu'on a eues.

Je remercie chaleureusement Mme BELABBAS Meriem, enseignante à l'université de Sidi Bel Abbés. Aucun remerciement ne serait suffisant pour lui exprimer ma gratitude, mon amitié et mon profond respect.

J'adresse mes remerciements aux nombreuses personnes côtoyées dans les différentes équipes du laboratoire où j'ai réalisé les travaux de recherche de ma thèse. J'ai apprécié l'accueil, le soutien, l'amitié et/ou l'aide multiformes de chacun d'eux.

Je voudrais ici exprimer ma gratitude à toutes et à tous. A défaut de pouvoir adresser un mot à chacun, je remercie les membres de l'équipe du LMBAFS « Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé ». J'adresse mes sincères remerciements à Melle BOUFADI Yasmina Mokhtaria et Mr BENBOUZIANE Bouasria pour leur aide, leur gentillesse et leur encouragement.

Sarah, Juin 2019

Résumé

Ce travail a pour objectif, d'une part, l'analyse quantitative et qualitative par HPLC couplée à la spectrométrie de masse des polyphénols et des caroténoïdes du fruit de la courge *Cucurbita moschata* (Duchesne) récolté à trois stades végétatifs différents (vert jeune, vert immature et mûr) et, d'autre part, l'exploration *in Vitro* de ses propriétés antioxydante et antimicrobienne et *in Vivo* de son pouvoir anti-inflammatoire.

Les résultats obtenus indiquent que c'est la courge récoltée au stade vert immature qui est la plus riche en polyphénols totaux (97.43 ± 3.60 mg Eq AG/100g) et en flavonoïdes totaux (28.66 ± 0.33 Eq Q/100g) ; ces teneurs diminuent respectivement à 55.60 ± 3.60 mg Eq AG/100g et à 19.60 ± 1.25 mg Eq Q/100g au passage du fruit au stade mûr.

Par contre, les teneurs les plus élevées en caroténoïdes totaux (0.415 ± 0.19 mg ECa/100g) ont été trouvées chez la courge récoltée au stade mûr. Les extraits de caroténoïdes montrent une activité antioxydante plus élevée par rapport aux extraits phénoliques selon les deux méthodes (DPPH et ABTS) utilisées. Cependant, selon la méthode d'ABTS, la comparaison du pouvoir antioxydant des extraits de caroténoïdes de courge de différents stades de maturation, indique que le plus élevé est celui correspondant au stade mûr (6.491 ± 0.005 μ M trolox équivalent/g). Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré des diamètres des zones d'inhibition ne dépassant pas 11 mm avec l'extrait phénolique de courge du stade vert immature. Dans les tests de l'inflammation *in vitro*, la capacité des caroténoïdes de fruit mûr à protéger contre la dénaturation protéique est la plus élevée de (66.17 ± 0.26 %) et de (54.11 ± 0.55 %) contre la lyse membranaire des globules rouges du sang.

Les extraits de caroténoïdes et de polyphénols du fruit mûr testés ont montré *in vivo* une bonne activité contre l'inflammation induite par la carragénine 1%.

Mots clés : *Cucurbita moschata*, Caroténoïdes, Polyphénols, Propriétés biologiques.

Abstract

The aim of the present work is to assess the quantitative and qualitative aspect of polyphenols and carotenoids of pumpkin, *Cucurbita moschata* (Duchesne), using high performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC–DAD–ESI-MS), at different ripening stages (young, pre-mature and mature) on one hand. On the other hand, antioxidant and antimicrobial activities were investigated in Vitro; while the anti-inflammatory activity was carried out in Vivo.

The results obtained have shown that the pre-mature pumpkin fruit contained the highest amount of total phenols (97.43 ± 3.60 mg Eq AG/100g) and carotenoids (28.66 ± 0.33 Eq Q/100g). These values decreased to 55.60 ± 3.60 mg Eq AG/100g and 19.60 ± 1.25 mg Eq Q/100g, respectively when reaching the mature stage.

The highest levels of total phenols (97.43 ± 2.20 mg Eq AG / g) and flavonoids (28.66 ± 0.33 mg Eq Q / g) were found in the phenolic extract of the pre-mature pumpkin fruit. In contrast, the highest levels of total carotenoids (0.415 ± 0.19 mg ECa / g) were found in the mature fruit. Antioxidant activity of carotenoid extracts of pumpkin fruit was higher than that of polyphenol extracts when using both DPPH and ATBS methods. However, antioxidant activity of carotenoid extracts measured with the ATBS method was higher in the mature pumpkin fruit (6.491 ± 0.005 μ M trolox équivalent/g) in comparison to that of the young and pre-mature fruit. Maximal antibacterial activity (inhibition zone diameter = 11 mm) was obtained with the phenolic extracts of pre-mature pumpkin fruit.

The carotenoid extracts of mature pumpkin fruit exhibit a level of protection of 66.17% against protein denaturation and 54.11% against membrane lysis in the *in vitro* tests of inflammation.

The polyphenol and carotenoid extracts of the different pumpkin fruits showed *in vivo* an activity against carrageenan-induced inflammation.

Key words: *Cucurbita moschata*, Carotenoids, Polyphenols, Biological properties.

ملخص

الهدف من هذا العمل يتجلى في ابراز القيمة الغذائية لفاكهة اليقطين المعروفة بالكابويا.من جهة في تحديد نتائج تحاليل الأيض الثانوية الكيفية و الكمية عن طريق الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي الى جانب كتلة الطيف للمركبات الفينولية و مركبات الكاروتينات لثمار اليقطين المختلفة و المحصودة حسب ثلاث مراحل للنمو (الفاكهة الفتية الخضراء ، الفاكهة نصف الناضجة الخضراء و الفاكهة الناضجة). ومن جهة أخرى ، استكشاف النشاط المضاد للأكسدة، و المضاد للميكروبات و المضاد للالتهابات ، هاته الأخيرة شكلت محور بحث حي.

النتائج المخبرية للأبيض الثانوي تكشف أن ثمار اليقطين نصف الناضجة الخضراء تحتوي على معدل مهم للمركبات الفينولية قدر ب (3.60 ± 97.43 مغ/100غ) ومركبات الفلافونويد المقدرة ب (0.33 ± 28.66 مغ/100غ) ، هاته المركبات تنقص محتوياتها في الثمار الأخرى حيث تمر القيمة الى (3.60 ± 55.60 مغ/100غ) و (19.60 ± 1.25 مغ/100غ) للثمار الفتية الخضراء و الثمار الناضجة على التوالي، النسب تنقص بالتدرج مع مرحلة النضج.

بالمقارنة مع مركبات الكاروتينات التي وجدت بنسب عالية في الفاكهة الناضجة وقدرت ب (0.19 ± 415.0 مغ/100 غ) . مستخلصات الكاروتينات أثبتت نشاط مضاد للأكسدة جد عالي مقارنة بمستخلصات الفينولات والتي حُددت بتجارب الإرجاع ضد الأكسدة مع الجذور الحرة والكاتيونات الحرة المعبر عنها بالكثافة الضوئية. بمقارنة تجربتي الأكسدة سُجل قدر مهم من الإرجاع مع الكاتيونات الحرة لمستخلصات الكاروتينات للفاكهة الناضجة قدر ب (0.005 ± 6.491 ميكرومول/غ). أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات قطر مناطق الكبت لا تتعدى (11 مم) مع مستخلص الفينولات للفاكهة نصف الناضجة الخضراء. في تجارب النشاط المضاد للالتهابات قدرة مستخلص الكاروتينات للفاكهة الناضجة في حماية تمسخ البروتينات كانت جد عالية بنسبة (0.26 ± 66.17 %) وبنسبة (0.55 ± 54.11 %) في حماية تحلل غشاء كريات الدم الحمراء. الدراسات الحية للتحريض وذمة عن طريق حقن الكاراجينين عند جرذان من فصيلة ويستار يدل على تأثير مضاد للذمة ، كلتا مستخلصات الفينولات والكاروتينات لها دور مهم بسبب إمكانيتها الملموسة المضادة للالتهابات .

الكلمات المفتاحية : ثمار اليقطين ، الكاروتينات ، مستخلصات الفينولات ، الكروماتوغرافيا السائلة ذات الجودة العالية ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات ، النشاط المضاد للالتهابات .

Liste des abréviations

- **AA** : Acide acétique
 - **ABTS**: Acide 2,2'azino bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
 - **AC caf** : Acide caféique
 - **ACN** : Acetonitrile
 - **ADN**: Acide désoxyribonucléique
 - **AF**: Acide formique
 - **APCI**: atmospheric pressure chemical ionization
 - **ARN**: Acide ribonucléique
 - **B. subtilis**: *Bacillus subtilis*
 - **Bb12** : *Bifidobacterium animalis* sbsp *lactis*
 - **BHT**: Butylated hydroxytoluene
 - **C** : Coumarine
 - **Car** : Caroténoïdes
 - **Chl** : Chlorophylle
 - **CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute
 - **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
 - **CRPr**: C-réactive protéine des rats
 - **DAD**: Diode array detector
 - **DMLA** : Dégénérescence musculaire liée à l'âge
 - **DMSO**: Diméthylsulfoxyde
 - **DPPH**: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
 - **E. coli** : *Escherichia coli*
 - **E. hirae** : *Enterococcus hirae*
 - **EC**: Extrait caroténoïdes
 - **ECa** : Equivalent de β -carotène
 - **EGa** : Equivalent Gallic acid
 - **EP** : Extrait phénolique
 - **EQ**: Equivalent Quercetin
 - **ESI**: Electrospray ionization
 - **EtOH**: Ethanol
 - **FIC**: Fractional Inhibitory Concentration
 - **FNSr**: Formule de Numération Sanguine des rats
 - **H2SO4**: Acide sulfurique.
 - **HCl**: Chlorure d'hydrogène.
 - **HOCl** : Hypochlorous acid
 - **HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance
 - **HRBC** : Hemolysis Red Blood Cells
 - **INST** : Institut National des Standards et de la technologie
 - **IR** : Infrarouge
 - **K** : Kaempférol
-

- **L. monocytogenes** : *Listeria monocytogenes*

 - **Lb. rhamnosus** : *Lactobacillus rhamnosus*
 - **LC-MS**: Liquid chromatography–mass spectrometry.
 - **LC-MS/MS**: Liquid Chromatography Coupled to tandem Mass Spectrometry
 - **LOD**: Limit Of Detection
 - **MH** : Mueller Hinton
 - **MTBE** : Méthyl tert-butyl éther
 - **MeOH** : Méthanol
 - **mM** : Millimole
 - **nm**: Nanomètre
 - **NO** : Monoxyde d’azote
 - **NOS**: oxyde nitrique synthase ou monoxyde d’azote synthase
 - **O₂^{•-}**: Anion superoxyde
 - **OH** : hydroxyle
 - **P. aeruginosa** : *Pseudomonas aeruginosa*
 - **P. mirabilis** : *Proteus mirabilis*
 - **P/V** : Poids / Volume.
 - **PDA** : Photodiode Array
 - **pH**: Potentiel d’hydrogène.
 - **PLE** : Pressurized Liquid Extraction
 - **Poly** : Polyphenols
 - **ppm** : Parties Par Million.
 - **Q** : Quercétine
 - **Ru** : Rutine
 - **R•**: Radical peroxy.
 - **RO•** : Radical alkoxyle
 - **ROO•** : Radicaux peroxydes
 - **ROS**: Reactive Oxygen Species.
 - **Rt** : Temps de Rétention
 - **S. aureus** : *Staphylococcus aureus*
 - **S. typhimurium** : *Salmonella typhimurium*
 - **Te** : Trolox équivalent
 - **TEAC** : Trolox équivalent antioxidant capacity
 - **UFC** : Unité Formant Colonie
 - **V/V**: Volume/Volume
-

Liste des tableaux

Tableau 1	: Production de courge dans le monde	7
Tableau 2	: Sources principales de quelques Caroténoïdes ayant une importance nutritionnelle	9
Tableau 3	: Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG) et flavonoides totaux (mg EQ) par 100g de courge fraîche	49
Tableau 4	: Identification des polyphénols de la courge (<i>Cucurbita moschata</i> D.) au stade vert immature par HPLC-PDA-ESI-MS	54
Tableau 5	: Quantification des polyphénols de la courge (<i>C. moschata</i> D.) aux stades vert jeune, vert immature et mûr (µg / g)	56
Tableau 6	: Teneurs en caroténoïdes totaux de la courge (mg ECa/100g de courge fraîche) à différents stades de maturité	59
Tableau 7	: Différents caroténoïdes séparés et identifiés par HPLC-PDA-ESI-MS de <i>Cucurbita moschata</i> récoltée à trois différents stades de maturation	62
Tableau 8	: Teneurs en différents caroténoïdes (µg/g) de la courge <i>Cucurbita moschata</i> récoltée à trois différents stades de maturation.	63
Tableau 9	: Pouvoir antioxydant des polyphénols de courge	67
Tableau 10	: Pouvoir antioxydant des Caroténoïdes de courge	67
Tableau 11	: Diamètres des zones d'inhibition (mm) et concentration minimale inhibitrice (CMI en µg/mL) obtenus avec les différentes souches.....	75
Tableau 12	: Effet des polyphénols et des caroténoïdes de la courge <i>Cucurbita moschata</i> récoltée au stade mûr sur l'inhibition de la dénaturation protéique	81
Tableau 13	: Effet des polyphénols et des caroténoïdes de <i>Cucurbita moschata</i> sur la stabilisation membranaire HRBC	84
Tableau 14	: Effet anti-inflammatoire <i>in Vivo</i> de différentes concentrations d'extraits de polyphénols et de caroténoïdes de <i>Cucurbita moschata</i> comparé à celui du standard, le Diclofénac, sur l'épaisseur de l'œdème (mm) de la patte de rat Wistar.....	87
Tableau 15	: C-réactive protéine chez les rats Wistar traités par : Diclofénac, caroténoïdes ou polyphénols (mg/L) et injectés de carragénine inflammatoire 1%	90
Tableau 16	: Formule de Numération Sanguine (FNS) des rats traités et non traités avec l'anti-inflammatoire standard, le Diclofénac (lot D), et différentes concentrations (5 et 10 mg/mL) d'extraits de polyphénols (lots 5P et 10P) et de caroténoïdes (lot 5C et 10C) de courge <i>C. moschata</i> récoltée au stade mûr. x 10 ³ /µL	93

Liste des Figures

Figure 1	: le fruit mûr de <i>Cucurbita moschata</i>	4
Figure 2	: le fruit à deux stades végétatifs différents de <i>Cucurbita moschata</i>	5
Figure 3	: Structure chimique des principaux Caroténoïdes	8
Figure 4	: Structure de base des caroténoïdes	10
Figure 5	: La voie de biosynthèse des caroténoïdes	12
Figure 6	: Schéma de conversion du phytogène en lycopène	13
Figure 7	: Les principales classes de composés phénoliques	20
Figure 8	: Quelques stilbènes retrouvés chez les plantes	21
Figure 9	: Structure de base des lignanes	21
Figure 10	: Structure du benzo-2-pyrone	22
Figure 11	: Structure des flavonoïdes (aglycones) et position des principaux substituant	24
Figure 12	: Polyphénols à effets santé	26
Figure 13	: Polyphénols à effet antimicrobien	28
Figure 14	: les trois différents stades végétatifs récoltés de <i>Cucurbita moschata</i>	30
Figure 15	: Forme libre et réduite du Diphényl picryl-hydrazyle (DPPH).....	37
Figure 16	: Rats adultes males de souche Wistar	42
Figure 17	: Injection intra péritonéale (IP) des extraits de caroténoïdes et de polyphénols de <i>Cucurbita moschata</i> et le Diclofénac chez les rats Wistar.....	43
Figure 18	: Injection sub plantaire de la carragénine 1% dans la patte droite des rats..	43
Figure 19	: Mesure de la taille des œdèmes dans la patte droite des rats à l'aide d'un pied à coulisse	44
Figure 20	: Anesthésie de Rat Wistar avant sacrifice	45
Figure 21	: Droite étalon Acide gallique ($\lambda = 725\text{nm}$)	49
Figure 22	: Droite étalon Quercétine $\lambda = 415\text{nm}$)	49
Figure 23	: Identification des polyphénols de courge (<i>C. moschata</i> D.) au stade vert jeune par HPLC-PDA-ESI-MS	52
Figure 24	: Identification des polyphénols de courge (<i>C. moschata</i> D.) au stade vert immature par HPLC-PDA-ESI-MS	53
Figure 25	: Identification des polyphénols de courge (<i>Cucurbita moschata</i> D.) au stade mûr par HPLC-PDA-ESI-MS	53
Figure 26	: Droite étalon β -carotène ($\lambda = 470\text{nm}$)	58
Figure 27	: Chromatogramme type du fractionnement par HPLC- PDA-ESI-MS des différents caroténoïdes de la courge (<i>Cucurbita moschata</i> , D)	61
Figure 28	: Droite étalon de trolox dans le test de DPPH	68
Figure 29	: Droite étalon de trolox dans le test ABTS	68
Figure 30	: Effet des concentrations de 5 et 10 mg/Kg de poids vif d'extraits de polyphénols et de caroténoïdes de courge <i>Cucurbita moschata</i> sur l'épaisseur de l'œdème (mm) de la patte de rat Wistar induit par injection de 1% de carragénine.....	88
Figure 31	: Examen histologique des pattes de rats normaux (lot N) carr – et trait- (fig.31- 1), de pattes de rats enflammées par la carragénine et non traitées (rats carr+ et trait- = contrôle ou témoin + = lot C, fig.31-2) ; de pattes de rats enflammées par la carragénine (carr+) et traitées (trait+) par un anti-inflammatoire standard, le Diclofénac (20mgKg/poids vif = lot D, fig.31-3) ; ou par 5mg d'extrait de polyphénols de courge/ Kg poids vif (lot 5P, fig.31-4) ; par 10mg d'extrait de polyphénols de courge/ Kg poids vif (lot 10P, fig.31-5) ; par 5mg de caroténoïdes de courge/ Kg de poids vif (lot 5C, fig.31-6) et par 10mg de 98 caroténoïdes de courge/ Kg de poids vif (lot 10C, fig.31-7)	

Table des matières

Dédicace	
Avant propos	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Table des matières	1
Introduction	
.....	
Chapitre I : La Courge : Composition et intérêts santé	
I.1. Données botaniques sur la courge (<i>Cucurbita moschata</i> , Duchesne)	4
I.2. Constituants d'intérêt de la courge	6
I. 2.1. Les caroténoïdes	6
I.2.1.1.Structures chimiques des différents caroténoïdes	10
I.2.1.2 Propriétés physico-chimiques des caroténoïdes	10
I.2.1.3. Biosynthèse des caroténoïdes	11
I.2.1.4. Intérêts santé des caroténoïdes	14
I. 2.2. Les polyphénols	17
I.2.2.1. Place des polyphénols dans la courge	18
I.2.2.2. Différents types de polyphénols	18
I.2.2.3. Propriétés physico-chimiques des polyphénols	24
I.2.2.4. Intérêts santé des polyphénols	25
Chapitre II : Matériels et Méthodes	
II.1. Matériel végétal et stades végétatifs de récolte des fruits	30
II.2. Les microorganismes et les rats d'expérience	30
II.2.1. Les souches pathogènes	30
II.2.3. Les souches bénéfiques	31
II.2.2. Les rats d'expérience	31
II.3. Méthodes de biochimie préparative et de dosage des polyphénols de courge	31
II.3.1. Extraction des polyphénols de courge	31
II.3.1.1. Les solvants utilisés et procédure d'extraction	31
II.3.1.2. Rendement de l'extraction des polyphénols	32
II.3.2. Dosage des polyphénols et flavonoides totaux	32
II.3.3. Dosage des flavonoides totaux	33
II.3.4. Chromatographie des extraits des polyphénols de courge par chromatographie liquide (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse	33
II.3.4.1. Appareillage	33
II.3.4.2. Conditions chromatographiques	33
II.3.4.2.1. La phase mobile et stationnaire, le gradient de concentration	34
II.3.4.2.2. Analyse quantitative des fractions phénoliques obtenues par HPLC	34
II.4. Méthodes d'extraction, d'identification et de dosage des caroténoïdes de la courge	34
II.4.1. Extraction des caroténoïdes	34
II.4.1.1. Les solvants utilisés et procédure d'extraction des caroténoïdes	34

II.4.2. Rendement de l'extraction des caroténoïdes	34
II.4.3. Dosage colorimétrique des caroténoïdes totaux de courge	35
II.4.3. Analyse des caroténoïdes de courge par chromatographie liquide (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse.....	35
II.4.3.1. Analyse qualitative des différents caroténoïdes séparés par HPLC	35
II.4.3.1.1. La phase mobile et le gradient de concentration	35
II.4.3.1.2. La phase stationnaire	35
II.4.3.2. Analyse quantitative des fractions caroténoïdes obtenues par HPLC	35
II.5. Méthodes d'étude in Vitro des propriétés biologiques des extraits phénoliques et de caroténoïdes de courge des différents stades	36
II.5.1. Détermination du potentiel antioxydant des extraits de courge	36
II.5.1.1. Test de réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH°)	36
II.5.1.2. Capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC)	37
II.5.2. Mise en évidence et détermination de l'activité antimicrobienne des extraits de courge	38
II.5.2.1. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu gélose	38
II.5.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	39
II.5.3. Mise en évidence in Vitro de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait phénolique de caroténoïdes de courge récoltée au stade mûr.....	39
II.5.3.1. Test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine par les extraits de courge	39
II.5.3.2. Test de stabilisation des globules rouges vis-à-vis de l'hémolyse (HRBC) par les extraits de courge	40
II.6. Mise en évidence in Vivo des propriétés anti-inflammatoires de l'extrait phénoliques et de caroténoïdes de courge de stade mûr chez le rat Wistar	40
II.6.1. Conditions d'élevage et mise en lots des rats	41
II.6.2. Procédure d'induction de l'inflammation	41
II.6.3. Procédure de mesure de la taille des œdèmes	44
II.6.4. Opération de sacrifice des rats et prélèvement sanguin	45
II.6.5. Dosage de la protéine C réactive (CRP)	45
II.6.6. Dénombrement des globules blancs (FNS)	46
II.6.7. Examen histologique des pattes enflammées	47
II.7. Traitement statistique des résultats	47

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Résultats d'analyse des polyphénols de la courge	48
III.1.1. Teneurs en composés phénoliques de la courge	48
III.1.2. Influence du stade de la maturation sur le profil phénolique de la courge	51
III.2. Résultats d'analyse des caroténoïdes de la courge	58
III.2. 1. Teneur en caroténoïdes totaux de la courge	58
III.2.2. Variation qualitative et quantitative du profil en caroténoïdes de la courge en fonction du stade de maturation	59
III.3. Propriétés biologiques des polyphénols et des caroténoïdes de courge	65
III.3.1. Activité antioxydante	65
III.3.2. Activité antimicrobienne des extraits phénoliques du fruit de <i>Cucurbita moschata</i>	73
III.3.2.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	73

III.3.3. Activité anti-inflammatoire des extraits de polyphénols et de caroténoïdes de courge <i>Cucurbita moschata</i>	79
III.3.3.1 Effet anti-inflammatoire in vitro des extraits de polyphénols et de caroténoïdes.....	79
III.3.3.1.1 Effet sur l'inhibition de la dénaturation protéique	79
III.3.3.1.2 Effet sur la stabilisation membranaire des hématies (HRBC)	83
III.3.3.2 Effet de l'extrait des polyphénols et des caroténoïdes sur la réaction inflammatoire	85
III.3.3.2.1 Effet des extraits de polyphénols et des caroténoïdes sur la réaction inflammatoire de la patte de rat	85
III.3.3.2.2 Effet in vitro des extraits de polyphénols et des de caroténoïdes sur la protéine C-réactive (CRP)	89
III.3.3.2.3 Effet des extraits de polyphénols et de caroténoïdes sur la Formulation et la Numération Sanguine du rat (FNSr)	92
III.3.3.2.4 Examen Histologique de la patte de rat	96
Conclusion	101
Références Bibliographiques	104

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies (Lee, 2004). L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.

Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2002) estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Famsworth et *al.*, 1985; Fleurentin et Pelt, 1990). À l'origine, ces ressources étaient employées sous leur forme brute, puis au fil du temps, les différentes préparations d'extraits et de concentrés ont permis d'en intensifier l'effet médicinal des plantes (Tyler, 1999).

À partir du XIX^{ème} siècle, les molécules responsables des effets thérapeutiques ont été isolées et ont servi de prototypes à l'élaboration de médicaments conventionnels (Butler, 2004; Patwardhan, 2005). Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel (Famsworth et coll, 1985; Cordell et Colvard, 2005). De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, caroténoïdes, alcaloïdes, terpènes, etc... Les caroténoïdes et les composés phénoliques ont montré une forte capacité antioxydante (Giovanelli et Buratti, 2009). En raison de leur origine naturelle, les antioxydants obtenus à partir de plantes ont plus d'avantages par rapport aux antioxydants synthétiques (Ndhlala et *al.*, 2010). Le plus souvent, les antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire à des doses élevées présentent des effets génotoxique et cancérigène.

L'une des caractéristiques communes dans la pathogenèse de la plupart des maladies chroniques est l'implication du stress oxydatif lié à la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). En raison de leur grande réactivité et leur faible stabilité, les ROS entrent en réaction avec les lipides, les protéines et l'acide désoxyribonucléique (DNA) en générant des métabolites oxydés (Kimura et *al.*, 2005). Ils provoquent une détérioration

progressive de la fonction des cellules, tissus et systèmes de l'organisme (Valko et *al.*, 2007). Le traitement des infections bactériennes est en général basé sur l'utilisation des antibiotiques. La très grande utilisation souvent inadaptée de ces molécules antibactériennes a entraîné la sélection de souches bactériennes multirésistantes (Archibald et *al.*, 1997).

Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables pouvant gêner leur utilisation à long terme tels que les maladies gastro-intestinales, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la toxicité hépatique et urinaire (Gaziano et Gibson, 2006 ; Batlouni, 2010).

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation. Ils interviennent dans la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif tels que les cancers, la cataracte, l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension artérielle, les maladies neuro-dégénératives et l'arthrite (Chun et *al.*, 2005).

Il est donc important d'orienter les recherches vers le criblage de nouvelles molécules bioactives à partir des végétaux qui ont toujours servi de base à l'élaboration de nouveaux médicaments (Oussou et *al.*, 2010). Les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, environ de 35000 espèces sont employées de par le monde à des fins médicinales (Elqaj et *al.*, 2007).

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plus riches dans le monde, avec un nombre très élevé des plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques (Farombi, 2003).

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale: Méditerranéenne, Saharienne et une flore paléo-tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (Ozenda, 1997). Ces espèces sont pour la plupart spontanées

avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques (Ozenda, 1997) ; ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable.

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve l'espèce *Cucurbita moschata* qui est une plante herbacée annuelle de la famille des Cucurbitaceae et du genre *Cucurbita*; issue des zones tropicales et subtropicales telles que le Mexique et l'Amérique du Sud avec une forte consommation sur le marché local. Les trois principales espèces domestiquées sont *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima* et *Cucurbita moschata*. Elles sont désormais cultivées dans tous les continents. C'est une culture végétale traditionnelle ayant une grande importance nutritionnelle et économique, cultivée pour leurs graines, fruits immatures et matures (Quasim et *al.*, 2005, Azizah et *al.*, 2009).

C'est une bonne source en éléments nutritifs tels que le potassium et les vitamines B2, C et E; 100 g de poudre de courge contient 4.09 g de lipides, 21.06 g de glucides et 301.57 mg de calcium (Gliemmo et *al.*, 2009). Les molécules bioactives les plus abondantes dans la courge sont les caroténoïdes et les polyphénols (Gliemmo et *al.*, 2009).

Le fruit de la courge possède plusieurs propriétés physiologiques bénéfiques ; une activité immunologique et d'autres activités pharmacologiques telles que les propriétés protectrices du foie, anti-cancérigènes, antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires (Escalada et *al.*, 2009).

Dans le présent travail, nous chercherons à mettre en évidence et à démontrer ce que le fruit de la courge *Cucurbita moschata* recèle comme propriétés biologiques à effet santé. Dans un premier temps, une méthode d'extraction des caroténoïdes et des polyphénols a été optimisée à partir de trois échantillons différents choisis sur la base du cycle végétatif du fruit ; avant qu'ils ne soient identifiés et quantifiés par des méthodes chromatographiques et colorimétriques.

Dans un deuxième temps, une méthode a été développée pour la séparation et l'identification de la famille des caroténoïdes et des composés phénoliques avec la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Cette méthode nous a permis l'identification et la quantification des principaux caroténoïdes que contiennent les fruits de courge issus des trois stades de maturation différents

Dans un troisième temps, les propriétés biologiques de ces deux grandes familles ont été étudiées. La première partie de cette thèse présente une revue de la littérature sur la structure, les propriétés chimiques et biologiques des caroténoïdes et des polyphénols. La seconde partie décrit les techniques expérimentales utilisées au cours de ce travail. Enfin, les résultats obtenus au cours de cette thèse sont présentés et discutés dans la troisième partie.

CHAPITRE I :

LA COURGE :

COMPOSITION ET INTERETS SANTE

Chapitre I : La courge : composition et intérêts santé.

I.1.Données botaniques sur la courge (*Cucurbita moschata*, Duchesne)

La courge musquée (*Cucurbita moschata*) appartient à la famille des Cucurbitacées, sous-famille des Cucurbitoideae, tribu des Cucurbiteae (Priyanka et Goutam, 2016). Elle comporte 12 à 14 espèces, toutes originaires d'Amérique du Nord (Sud des Etats Unis), du Sud d'Amérique centrale et de l'Amérique du Sud (Nord Pérou et du Mexique) (Genevois et *al.*, 2014). Elle est largement cultivée dans tous les pays chauds et tempérés. C'est un genre d'une assez grande importance économique, il comprend en effet la plupart des espèces cultivées sous le nom de courge (Qian, 2014).

Classification botanique :

Règne Plantae

Division Magnoliophyta

Classe Magnoliopsida

Ordre Violales

Famille Cucurbitaceae

Sous-famille Cucurbitoideae

Tribu Cucurbiteae

Genre *Cucurbita*

Nom binominal *Cucurbita moschata* (Cronquist , 1981)



Figure 1 : le fruit mûr de *Cucurbita moschata* (Benalia, 2016)

Toutes les espèces du genre *Cucurbita* sont originaires des régions tropicales d'Amérique (Prakash et *al.*, 2013). Plusieurs d'entre elles ont été domestiquées très tôt par les peuples du continent américain. Les trois principales espèces domestiquées *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima* et *Cucurbita moschata* sont désormais cultivées dans tous les continents (Barboza et *al.*, 2012).

L'espèce *cucurbita* est une plante herbacée annuelle à longues tiges, rampantes, qui s'accrochent par des vrilles à tout support. Toute la plante est couverte de poils souples, non épineux (Carvalho et *al.*, 2012). Les tiges produisent des racines adventices à chaque entrenœud. Si la plante grimpe sur un support, ces racines sont aériennes et peuvent atteindre plus d'un mètre de long en climat chaud et humide (Junxin et *al.*, 2011).

Les feuilles sont grandes, entières, à nervation palmée, formant cinq lobes peu marqués mais présentant des angles nets. Elles peuvent atteindre cinquante centimètres de diamètre et sont veloutées, de couleur verte plus ou moins marbrée de blanc (selon les variétés et les conditions de culture) (Noelia et *al.*, 2011). Les fleurs à sexes séparés (plante monoïque) ont des couleurs variant du jaune à l'orange (Escalada et *al.*, 2009).

Les fruits sont en général de forme allongée, avec une extrémité renflée en massue ou en forme de bouteille, parfois sphérique, plus aplatie ou côtelée (Fissore et *al.*, 2009). Leur couleur est aussi très variable : vert sombre, orangé, crème... À maturité, ils sont revêtus d'une poussière glauque caractéristique (Fig. 2) (Gliemmo et *al.*, 2009).



(A)



(B)

Figure 2 : le fruit de courge (*cucurbita moschata*) à deux stades végétatifs différents
stade jeune, (B) : stade en moyenne maturité (Benalia, 2016)

Un caractère spécifique est la forme du pédoncule, qui présente cinq côtes bien marquées et s'élargit en s'épatant au point d'insertion sur le fruit. La chair est épaisse et de couleur plutôt foncée, variant du rouge à l'orangé (Azizah et *al.*, 2009). Les graines aplaties ovales, sont gris brun, rugueuses avec des marges fortement marquées et ondulées (Tao et *al.*, 2008).

Dans le monde entier, la consommation des fruits de *Cucurbita* qui sont probablement classés parmi les premiers fruits, ne cesse d'augmenter (tableau 1) (FAO, 2016). En Algérie, Selon les services agricoles, les superficies consacrées à cette culture ont atteint durant la saison écoulée environ 400 hectares dans chaque Wilaya, soit une production globale d'environ plus de 44.000tonnes (Benalia, 2016).

I.2. Constituants d'intérêt de la courge

I. 2.1. Les caroténoïdes

Le terme de caroténoïdes dérive de « *Daucus Carota* » qui est le nom latin de la carotte, de laquelle le β -carotène fut extrait et isolé, pour la première fois, en 1831 par Wackenroder. Plus de 700 membres de cette famille sont aujourd'hui connus et la structure chimique de 500 d'entre eux est pleinement élucidée (Britton, 2004 ; Reynaud, 2009).

Les caroténoïdes représentent une grande famille de micronutriments qui peuvent se trouver dans plusieurs fruits et légumes ou ils sont à l'origine de leur coloration qui varie du jaune au rouge violacé (Maiani et *al.*, 2009). Lorsqu'un caroténoïde est associé à une protéine, la coloration peut être bleue ou verte (Reynaud, 2009). Dans les tissus verts, la couleur des caroténoïdes est masquée par celle de la chlorophylle. Elle devient visible lors de la disparition de celle-ci durant l'automne (Sy et *al.*, 2011). Ces pigments naturels très répandus dans la nature, plus de 700 ont été isolés et caractérisés (Fig. 3) (Oliver et Mou, 2000).

Les caroténoïdes sont des métabolites secondaires principalement synthétisés par les végétaux, les algues, les microorganismes — bactéries, levures et champignons filamenteux, ils sont employés en tant qu'additifs dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Sandmann et *al.*, 1999). Ils suscitent un intérêt grandissant grâce à leurs propriétés pro-vitaminique (vitamine A), antioxydante et anti-radicalaire (Gu et *al.*, 2007). La production des caroténoïdes est dominée par la synthèse chimique et l'extraction à partir des plantes ; la

Tableau 1 : Production de courge dans le monde (FAO, 2016).

Production en tonnes de courges. Chiffres 2004-2005-2016						
	2004		2005		2016	
 Chine	5 667 398	29 %	5 767 700	30 %	7 789 437	29 %
 Inde	3 500 000	18 %	3 500 000	18 %	5 073 678	19 %
 Russie	863 669	4%	844 799	4%	1 224 711	5 %
 Ukraine	1 023 200	5 %	1 072 000	5 %	1 209 810	5 %
 États Unis	815 320	4 %	861 870	4 %	1 005 150	4 %
 Mexique	535 000	3 %	560 000	3 %	677 048	3 %
 Indonésie	179 845	1%	180 029	1%	603 325	2 %
 Italie	495 372	3 %	488 083	2 %	580 188	2 %
 Cuba	517 151	3 %	520 000	3 %	518 862	2 %
 Turquie	374 000	2 %	376 000	2 %	489 999	2 %
 Espagne	300 000	2 %	300 000	2 %	476 396	2 %
 Égypte	678 254	4 %	690 000	4 %	463 451	2 %
 Afrique du Sud	367 755	2 %	378 776	2 %	419 791	2 %
 Corée du Sud	304 337	2 %	310 000	2 %	371 391	1 %
 Philippines	397 015	2%	392 961	2%	294 125	1 %
Autres pays	329 2288	17%	328 5731	17 %	5 289 256	20%
Total	19 310 604	100 %	19 527 949	100 %	26 486 618	100%

production à partir de la biosynthèse microbienne n'est pas très importante par rapport aux autres types d'obtention (Suzuki et *al.*, 2010).

Cependant, la recherche pour la réduction des coûts de production des colorants naturels issus de microorganismes est en expansion (Ansari et *al.*, 2004). Ces recherches visent à découvrir des souches microbiennes sauvages nouvelles qui favoriseraient le développement de procédés d'obtention des colorants au label « naturel » par rapport à ceux obtenus par synthèse chimique ou même par extraction à partir des plantes (Dufossé, 2006).

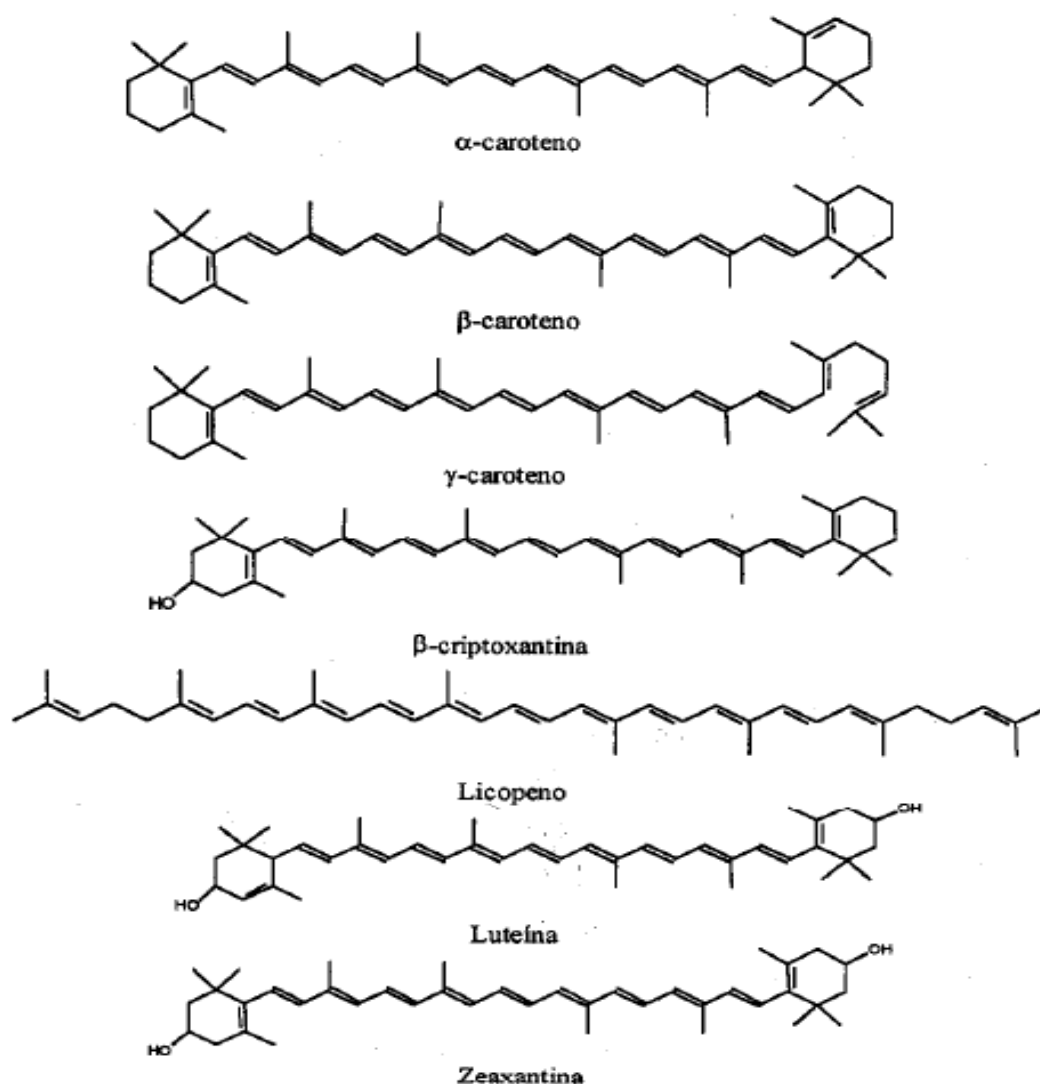


Figure 3 : Structure chimique des principaux caroténoïdes (Sy, 2011)

Kaulmann et *al.* (2014) citent une étude réalisée par BCC (Business Communications Company Inc) qui rapporte que le marché mondial des caroténoïdes représentait 887 millions de dollars en 2004 et a été estimé à plus de 1 milliard de dollars en 2009, avec une croissance moyenne annuelle de 2.9 %. L'alimentation est le plus important secteur d'utilisation des caroténoïdes où le β -carotène est le caroténoïde le plus utilisé, représentant 242 millions de dollars en 2004 (tableau 2) (Aktas et *al.*, 2011).

Tableau 2: Sources principales de quelques caroténoïdes ayant une importance nutritionnelle (Britton et *al.*, 2009).

Caroténoïde	Sources alimentaires	Teneur*
β -Carotène	Abricot, brocoli, carotte, chou, mangue, huile de palme, épinard, patate douce	++++
	Chou de Bruxelles, mangue, pêche, poivron	+++
	Goyave, laitue, orange, papaye, petits pois, courge,	++
	Beurre, pamplemousse, mandarine	+
β -Cryptoxanthine	Kaki, cerise de cayenne	+++
	Papaye, poivron, courge, mandarine	++
Lutéine	Brocoli, légumes-feuilles, poivron	+++
	Jaune d'oeuf, courge	++
Lycopène	Tomate, pastèque	++++
	Carotte, goyave	+++
	Pamplemousse rose, papaye,	++
	Abricot, kaki	+
Zéaxanthine	Poivron	++++
	Kaki, courge, maïs	++

* +++++ : teneur très élevée (>2 mg/100g de matière fraîche) ; ++ : teneur élevée (0,5 à 2 mg/100g) ++ : teneur modérée (0,1 à 0,5 mg/100g) ; + : faible teneur (0 à 0,1 mg/100g).

I.2.1.1. Structure chimique des différents caroténoïdes

Les caroténoïdes représentent une famille de pigments naturels largement répandus dans le monde vivant (végétaux, animaux, bactéries et champignons) (Rodriguez-Amaya, 2010). Ce sont des molécules lipidiques appartenant à la famille des terpènes, comportant généralement 40 atomes de carbone, structurés en 8 unités isopréniques jointes de façon à ce que la séquence soit inversée au centre. L'organisme humain est incapable de les synthétiser, ils sont fournis par l'alimentation (Fig. 4) (Reynaud, 2009 ; Mata-Gómez et *al.*, 2014).

La structure de base des caroténoïdes est linéaire et symétrique, mais une cyclisation d'une des extrémités ou des deux est possible. D'autres transformations de la structure comme l'hydrogénation, la déshydrogénation ou l'oxydation sont responsables de leur altération pour la grande variété des caroténoïdes connus. Les doubles liaisons confèrent à la molécule un caractère chromophore et sont responsables de la coloration des caroténoïdes (Reynaud, 2009).

UNITE ISOPRENIQUE



Figure 4 : Structure de base des caroténoïdes (Reynaud, 2009)

I.2.1.2. Propriétés physico-chimiques des caroténoïdes.

Les caroténoïdes sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants apolaires et également dans les graisses alimentaires (Kapinga et *al.*, 2009). Le spectre d'un caroténoïde possède trois maxima, dont les longueurs d'onde dépendent du nombre de doubles liaisons

conjuguées. Les longueurs d'onde d'absorption des caroténoïdes colorés sont comprises entre 400 et 700 nm dans le spectre de lumière visible (Frigaard, 2008).

A l'opposé des colorants artificiels, les colorants naturels sont très sensibles à l'oxygène, la lumière et la chaleur ; cette instabilité est liée à la longue chaîne carbonée insaturée. Les caroténoïdes sont aussi sensibles au pH et aux ions métalliques, qui augmentent la dégradation des pigments conduisant à la perte de la couleur (Kurz *et al.*, 2008).

Les caroténoïdes sont employés dans les industries alimentaires, cosmétique et pharmaceutique en tant qu'additifs, pour leurs caractéristiques biologiques et colorantes (Sandmann *et al.*, 1999).

Les caroténoïdes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes (Palozza *et al.*, 1996), leur activité anti-radicalaire (Faure *et al.*, 1999) et pro-vitaminique A (Fontana *et al.*, 1997). Les avantages des caroténoïdes en tant que colorants sont leur stabilité aux différents pH (4-7) des nombreux aliments, et le fait que l'addition des différents additifs, comme l'acide ascorbique, n'affecte pas leur structure (Kusdiyantini, 1998).

I.2.1.3. Biosynthèse des caroténoïdes

Le schéma de biosynthèse des caroténoïdes proposé par Britton (1989) est divisé en cinq étapes, constituées en une première phase, la formation du phytogène, la dénaturation, la cyclisation et la formation des xanthophylles. Les premières étapes (Davies et Taylor, 1976 ; Calo *et al.*, 1995) sont communes à toutes les réactions de biosynthèse des terpénoïdes et résultent de la formation d'un composé à vingt carbones, le géranyl géranyl di phosphate (GGDP) (Fig. 5) (yang, 2013).

Les caroténoïdes sont issus de la voie des mévalonates. La formation des caroténoïdes par la voie du mévalonate est initiée par la formation de l'acide mévalonique, intermédiaire clé de la biosynthèse, à partir de l'Acétyl-CoA. À partir de l'acide mévalonique, il y a la formation du pyrophosphate d'isopentényle (IPP) qui, par une isomérisation, est transformé en pyrophosphate de diméthyle-allyle qui est la molécule de base pour l'allongement de la chaîne. Par additions successives de molécules de pyrophosphate d'isopentényle, il y a formation du pyrophosphate de géranyl (10 carbone), pyrophosphate de

Chapitre I : La courge : composition et intérêts santé.



La réaction clé pour la formation du squelette des caroténoïdes est la condensation de deux molécules de géranyl géranyl di phosphate (20 carbones) qui conduit à la formation du phytogène (incolore) qui est le premier caroténoïde à 40 atomes de carbone. La formation de caroténoïdes colorés nécessite un système d'extension de doubles liaisons par une série de réactions de déshydrogénation. La désaturation du phytogène donne successivement du phytofluène, du β - carotène, du neurosporène et du lycopène. Ce sont tous des précurseurs de caroténoïdes cyclisés. La formation des xanthophylles par l'hydroxylation de l' α -carotène et

du β -carotène fait partie des dernières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes colorés (Carvalho et al., 2012).

La voie de biosynthèse de la butine n'est pas encore bien connue, mais il est probable que le caroténoïde C40, précurseur de la lux' Me, soit a priori le lycopène (Fig. 6) (Bouvier et al., 2003). Deux hypothèses sur la voie de synthèse de la bixine sont rencontrées dans la littérature. Selon Jako et al (2002), la norbixine et la bixine sont formées à partir du lycopène ; alors que Toccluni et Meracadante (2001), ont proposé une autre voie de biosynthèse dans laquelle, la bixine serait d'abord formée et la norbixine obtenue par saponification.

La production des caroténoïdes par voie biotechnologique suscite un grand intérêt ; de nombreuses études sont réalisées avec l'objectif d'optimiser le procédé d'obtention des produits d'origine naturelle à l'échelle industrielle (Dufossé, 2006). De nos jours, la production industrielle des caroténoïdes microbiens est limitée par la faible production des caroténoïdes par les souches sauvages connues et par le manque d'informations du mécanisme pigmentaire des microorganismes (Buzzini, 2000).

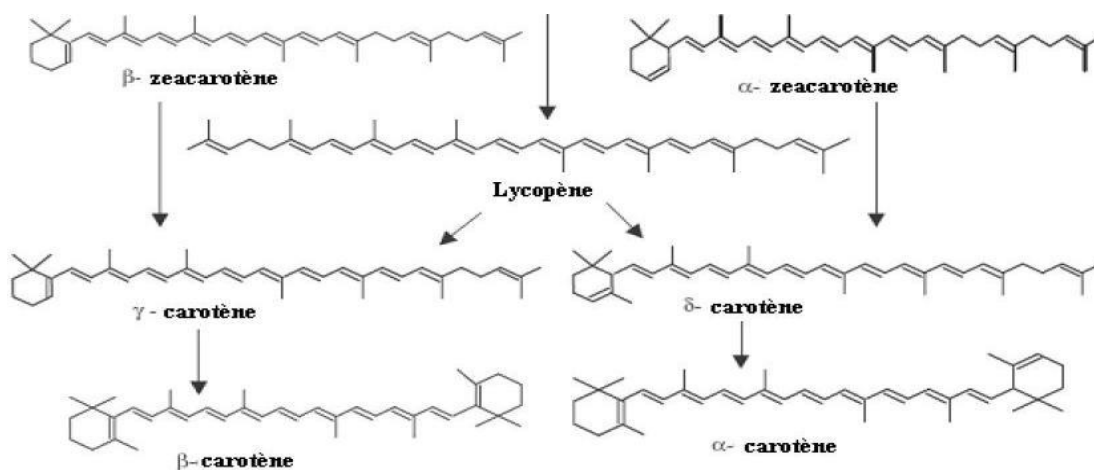


Figure 6: Schéma de conversion du phytylène en lycopène (Porter et Lincoln, 1950).

I.2.1.4. Intérêts santé des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments possédants des activités biologiques très intéressantes.

-Caroténoïdes et photo-protection.

Le rôle de protection des caroténoïdes contre les dommages causés aux organismes vivants par la lumière est essentiel. En effet, l'énergie lumineuse, associée à l'oxygène est le principal initiateur de l'oxydation via la formation de radicaux libres. Les caroténoïdes agissent essentiellement comme des filtres (Britton 2008). En présence de composés photosensibilisants endogènes (ex : chez certaines bactéries ; ou protoporphyrines produites dans le sang chez les personnes atteintes d'une maladie génétique, la protoporphyrine érythropoïétique) ou exogènes (présents dans l'environnement), de l'oxygène singulet est très facilement formé par transfert d'énergie et devient toxique pour les organismes. Or, les caroténoïdes peuvent récupérer l'énergie lumineuse et la dissiper, évitant ainsi la formation d'oxygène. Ils peuvent aussi neutraliser l'oxygène en récupérant son énergie excédentaire pour la dissiper sous forme de chaleur. Chez l'homme, cette protection se manifeste, par exemple, en retardant l'inflammation de la peau (érythème) en présence de soleil (Sy, 2011).

- Caroténoïdes, activité anti-radicalaire et système antioxydant.

Les caroténoïdes, grâce à leur longue chaîne polyinsaturée, sont de bons piègeurs de radicaux libres ; leur pouvoir réducteur (antioxydant) est, par contre, beaucoup moins évident puisqu'ils ne portent pas de groupement réducteur et ne sont pas des donneurs d'électrons. À propos des caroténoïdes, le terme d'antioxydant ne paraît donc pas approprié, on devrait plutôt parler de pouvoir anti-radicalaire, ou mieux encore, de pouvoir anti-espèces activées (Faure et *al.*, 1999 ; Cutting, 2008 ; Mata-Gómez et *al.*, 2014) .

Les caroténoïdes sont particulièrement efficaces contre $^1\text{O}_2$. Di Mascio *et al.* (1992) ont calculé des constantes de réaction entre les caroténoïdes biologiques et $^1\text{O}_2$. Le lycopène est le plus actif, suivi par la canthaxanthine et le β -carotène. L'activité anti $^1\text{O}_2$ dépend du nombre de doubles liaisons, de l'extrémité cyclique ou non et des substituants sur les cycles (Stahl et Sies, 1996 ; Gerster, 1997). Ce processus physique laisse intactes les

molécules de caroténoïdes qui peuvent donc intervenir dans plusieurs cycles successifs de captation de $^1\text{O}_2$. Les caroténoïdes n'agissent pas seulement sur $^1\text{O}_2$; mais aussi sur les radicaux $^*\text{NO}_2$, thiol et sulfonyl (Everett *al.*, 1996 ; Mortensen *et al.*, 1997). Woodall *et al.* (1997) notent que les caroténoïdes sont diversement sensibles aux radicaux libres (formés par une réaction de Fenton modifiée) ou aux radicaux peroxydes. En fonction des conditions expérimentales, les auteurs classent la réactivité des caroténoïdes dans l'ordre décroissant suivant : lycopène > β -carotène > zéaxanthine > échinénone, isozéaxanthine > astaxanthine, canthaxanthine.

- **Traitement de la douleur**

Le caroténoïde le plus étudié pour le soulagement de la douleur est le β -carotène. Il a été démontré que l'utilisation du β -carotène par voie orale ou locale peut réduire la chaleur des inflammations et les douleurs de la polyarthrite rhumatoïde ou la fibromyalgie (Fraenkel *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2011). En outre, le β -carotène procure un soulagement de l'arthrose (De Silva *et al.*, 2011).

L'industrie pharmaceutique commercialise le β -carotène (ajouté à une concentration égale ou inférieure à 0.075%) comme un baume pour une application externe afin de calmer la douleur des muscles endoloris (Knotkova *et al.*, 2008). Le β -carotène est également utilisé pour des études neuropharmacologiques concernant le traitement de la douleur et pour la thermorégulation.

Les crèmes contenant du β -carotène peuvent aussi aider à réduire la douleur post-opératoire pour les patients ayant subi une mastectomie (Zachariah *et al.*, 2008. Wahyuni *et al.*, 2013 ; Zis *et al.*, 2014).

- **Caroténoïdes et cancer**

Les caroténoïdes, en synergie avec d'autres micronutriments, interviendraient dans de nombreux processus biologiques permettant la réduction de maladies, notamment les cancers dont les plus importants sont ceux des poumons, gorge, colorectal et de la prostate (Reynaud, 2009). En effet, des études *in vitro* (Ajila *et al.*, 2012; Haddad *et al.*, 2013 ; Gloria *et al.*, 2014) ont montré que les caroténoïdes inhiberaient la prolifération de cellules cancéreuses, ils interviendraient aussi dans la communication intercellulaire et pourraient jouer un rôle

dans la modulation de l'expression de certains gènes. Tous ces facteurs auraient un effet protecteur contre les cardiopathies (Krinsky et *al.*, 2005).

L'activité anticancéreuse des caroténoïdes (β -carotène et Lycopène) a été signalée ces dernières années (Surh, 2002). Les caroténoïdes exercent une bonne activité anti-tumorale non seulement "*in vitro*" mais aussi "*in vivo*". Dans des cultures cellulaires, le β -carotène a été capable de bloquer la migration des cellules cancéreuses du sein et de tuer celles de la prostate; alors que lycopène a induit l'autophagie dans les cellules cancéreuses HCT116 du côlon humain (Oh et *al.*, 2008; Thoennissen et *al.*, 2010; Yang et *al.*, 2010; Luo et *al.*, 2011).

Récemment, le β -carotène a été indiqué pour induire l'apoptose dans certains types de cellules, y compris les cellules humaines de cancer du sein (Tuoya et *al.*, 2006; Lau et *al.*, 2014), de prostate (Jankovic et *al.*, 2010), de l'hépatocarcinome (Jung et *al.*, 2001), de gliome (Qiao et *al.*, 2005), de la leucémie (Tsou et *al.*, 2006 ; Jin et *al.*, 2014) et celles du carcinome épidermoïde de l'oesophage (Wu et *al.*, 2006). Cependant, le mécanisme par lequel le β -carotène induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses est encore mal connu (Sanchez et *al.*, 2007).

- Caroténoïdes et perte de poids

Plusieurs études ont montré que le β -carotène retarde la prise de poids corporel chez le rat par l'augmentation de la thermogenèse dans le tissu adipeux blanc grâce à l'amélioration de la sécrétion de catécholamines, la stimulation de la lipomobilisation, l'abaissement de la triglycéridémie, et la réduction de la consommation d'énergie en augmentant l'activité du système nerveux sympathique, plutôt que l'aversion gustative (Joo et *al.*, 2010; Mun et *al.*, 2014).

Dans une autre étude, la β -carotène administrée en capsules à des sujets présentant une surcharge pondérale modérée a aidé à augmenter leur satiété ainsi qu'à diminuer leurs apports caloriques et de matière grasse (Westerterp-Plantenga et *al.*, 2005 ; Borys et *al.*, 2012).

Selon Date et *al.* (2002), l'administration de β -carotène favoriserait la perte de poids en réduisant la sécrétion d'une hormone orexigène, la ghréline.

- Caroténoïdes et maladies cardiovasculaires

La maladie coronarienne, l'infarctus du myocarde, l'hypertension et l'athérosclérose sont les principales maladies cardiovasculaires représentant une menace potentielle pour la santé humaine. Il a été rapporté que les caroténoïdes ont des effets bénéfiques potentiels sur le système cardiovasculaire (Harada et Okajima, 2009; Peng et Li, 2010). Il est bien connu que le système cardiovasculaire est riche en nerfs sensoriels sensibles au β -carotène, qui jouent un rôle considérable dans la régulation de la fonction cardiovasculaire par la libération de plusieurs neurotransmetteurs tels que le peptide relié au gène calcitonine (CGRP) et la substance P (SP) (Zvara et *al.*, 2006 ; Peng et Li, 2010).

Par ailleurs, le β -carotène et le lycopène inhibent l'agrégation plaquettaire et l'activité des facteurs de coagulation VIII et IX (Adams et *al.*, 2009), une propriété qui peut contribuer à la prévention de l'apparition et / ou la réduction de l'incidence des maladies cardio-vasculaires (Luo et *al.*, 2011) .

- Caroténoïdes et inflammation

Il a été démontré que le caroténoïde « lycopène », en tant qu'agent anti-inflammatoire, réduit les biomarqueurs inflammatoires *in vitro* et *in vivo*. En tant qu'antioxydant, le lycopène peut réduire le stress oxydatif cellulaire et est ainsi capable de modifier les réponses inflammatoires en inhibant la production de cytokines via l'inactivation du facteur nucléaire-kB (NF-kB) (Kim et *al.* , 2004). Le facteur NF-kB joue un rôle central dans la régulation de la transcription d'un ensemble spécifique de gènes contrôlant la production de cytokines pro-inflammatoires. L'activation et la translocation de NF-kB dans le noyau conduit à sa liaison à l'ADN dans les régions promotrices des gènes cibles, ce qui entraîne l'induction de leur libération et la production de protéines telles que l'interleukine (IL) -6 et le facteur α de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor ou TNF α). L'activité du facteur nucléaire NF-kB change avec l'état redox cellulaire et est activée par une augmentation de la production de ROS (reactive oxygen species). Le lycopène empêche ce processus en inhibant la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF-kB (Kim et *al.*, 2004). Il a été décrit une variété de mécanismes supplémentaires, par lesquels le lycopène a également été signalé avoir des effets immunomodulateurs, tels que la promotion de l'apoptose des cellules oxydées

chez les animaux, l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) et l'activité du récepteur scavenger, l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses (SMC), l'amélioration de la jonction lacunaire communication (GJC), la suppression de la signalisation du facteur de croissance, la réduction des dommages à l'ADN et l'induction d'enzymes de détoxification (wood, 2013).

I. 2.2. Les polyphénols

Les plantes sont connues pour produire un grand nombre de composés à faible poids moléculaire dont la structure ne fut que récemment déterminée ; et ceci malgré leur exploitation et leur utilisation ancestrale, comme médicaments ou aliments (Garcia- Pérez, 2008). Parmi ces molécules, on a les polyphénols, qui sont un groupe de composés phytochimiques, présents en grande quantité dans les fruits, les légumes et les produits végétaux naturels (Vauzour, 2014).

L'expression « composés phénoliques » est utilisée pour toute substance chimique possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (—OH) (Bloor, 2001, Bennetau-Pelissero, 2014).

I.2.2.1. Place des polyphénols dans la courge

Jusqu'à présent, la plupart des études réalisées sur la courge ont été consacrées à l'analyse des caroténoïdes, qui sont responsables de la couleur de ce fruit, mais peu de recherches ont été menées sur le profil phénolique.

Plusieurs auteurs ont rapporté que la courge est une source très riche en polyphénols (Marin et *al.*, 2004 ; Materska et Perucka, 2005 ; Wahyuni et *al.*, 2011 ; Materska, 2014). Parmi ces composées, les acides hydroxycinnamiques (acide transferulique et trans-sinapique) et les flavonoïdes (quercétine, lutéoline et apigénine sous leurs formes glycosides) sont les plus représentés (Marin et *al.*, 2004 ; Materska et Perucka, 2005). Le contenu en polyphénols varie selon la variété et la maturité du fruit. Le taux des flavonoïdes varie de 1 à 852 mg/kg dans les différents types de courge en fonction des facteurs génétiques de la plante et des conditions environnementales (Lee et *al.*, 1995).

I.2.2.2. Différents types de polyphénols

Il existe plus de 8000 composés phénoliques répertoriés en plusieurs classes dont les plus représentatives sont celles des acides phénoliques et des flavonoïdes (Fig.7) (Robards et *al.*, 1999).

- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques les plus courants ne sont pas présents dans les plantes à l'état libre, mais plutôt sous forme d'esters de glucose, d'acide tartrique ou d'acide quinique (Herrmann, 1989 ; Vauzour, 2014). L'acide caféique est l'acide phénolique le plus abondant et existe principalement sous forme d'ester quinique (e.g. acide chlorogénique) que l'on retrouve principalement dans les myrtilles, les kiwis, les prunes, les pommes et le café (Macheix et Fleuriet, 1998; Manach et *al.*, 2004; Grigoras, 2012; Vauzour, 2014).

- Les stilbenes

Les stilbenes sont synthétisés par l'addition de 1 à 3 molécules de malonyl-CoA aux acides cinnamiques, qui dérivent de la voie de biosynthèse des phénylpropanes. La forme monomère stilbéne est, par définition, le 1,2-diphényléthène. Les stilbénes, quant à eux, représentent les dérivés hydroxylés ou autres du stilbéne et sont fréquemment retrouvés dans les plantes. Le regroupement des stilbénes avec les bibenzyles, qui ont aussi un squelette C6-C2-C6, forme la famille des stilbénoloïdes (Fig.8) (Shibutani et *al.*, 2004; Stevanovic et Perrin, 2009; Vauzour, 2014).

- Les lignanes

Ces composés de haut poids moléculaire contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémi-cellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation (co-polymérisation) de trois alcools phénylpropéniques (Fig.9) (Nkhili, 2009).

Leur synthèse est contrôlée enzymatiquement et donne des liaisons différentes entre les carbones des chaînes propane. Lorsque les unités phénylpropane sont liées par des liaisons C-C au niveau des positions 8 et 8', le composé est considéré comme un lignane, alors que si ces derniers sont liés autrement que par les liaisons C-C 8- 8', il s'agit d'un néolignane (Moss,

2000). Ainsi, on trouve des néolignanes contenant les liaisons 8-0-4', 3-0-4' (oxynéolignanes), 3-3', 8-3', 1-3' etc, (Moss, 2000 ; Garcia-Pérez, 2008).

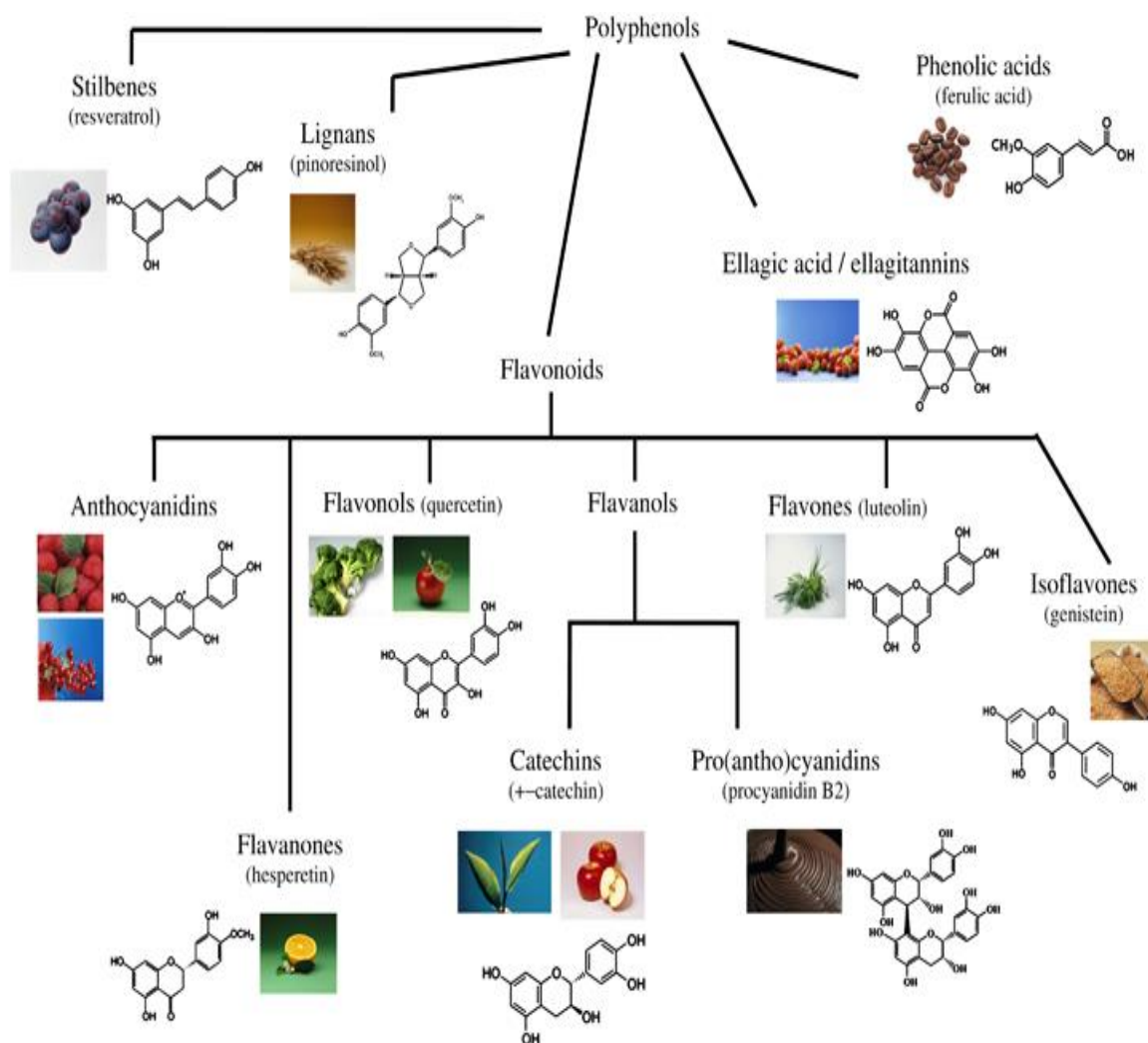


Figure 7 : Les principales classes de composés phénoliques (Ferrazzano et al.,2011).

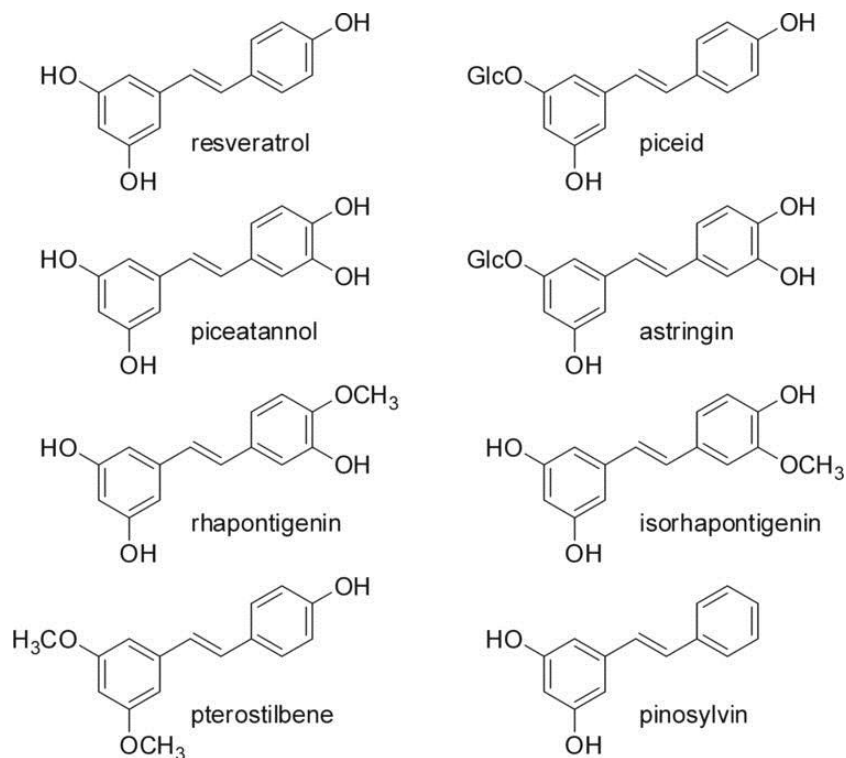


Figure 8 : Quelques stilbènes retrouvés chez les plantes (Stevanovic et Perrin, 2009).

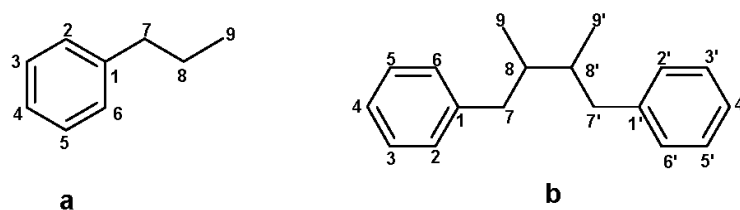


Figure 9: Structure de base des lignanes (a) : phénylpropane (b) : lignane (Garcia-Pérez, 2008).

- Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (Fig.10). Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes.

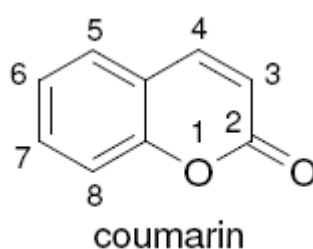


Figure 10 : Structure du benzo-2-pyrone (Muanda, 2010).

Dans les plantes, on les rencontre chez les Apiacées, les Astéracées, les Fabacées, les Rosacées, les Rubiacées, les Rutacées et les Solanacées. Du point de vue structural, ils sont classés en coumarines simples avec des substituants sur le cycle du benzène, furanocoumarines, pyranocoumarines, et en coumarines substituées en position 3 et/ou 4. Le dernier groupe serait celui des dimères (Sakagami et al., 2005 ; Muanda, 2010).

- Les tanins

Ils représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse et concise car il n'y a pas de structure chimique de base. Leur structure chimique est, en effet, variable, et ils sont rassemblés en famille en fonction d'activités communes. De ce fait, toute classification chimique des tanins est forcément arbitraire (Nkhili, 2009). Cependant, on se réfère souvent à une distinction entre tanins hydrolysables et tanins condensés.

Les tanins hydrolysables sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou l'un de ses dérivés (acide ellagique, chébulique ou

valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.

Les tanins condensés sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines). Ils sont aussi désignés sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides.

- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés polyphénoliques les plus abondants contenus dans les végétaux. Leur structure comprend un squelette composé de deux cycles aromatiques (A et B) porteurs de plusieurs fonctions phénol et réunis par une chaîne de trois atomes de carbone ; ces derniers étant le plus souvent engagés dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène (Stoclet et Schini-Kerth, 2011).

Il existe dans les aliments plusieurs centaines de polyphénols (plus de 500 y ont été caractérisés aujourd'hui), principalement des flavonoïdes (Scalbert et Williamson, 2000 ; Manach et *al.*, 2004 ; Stoclet et Schini-Kerth, 2011). Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, les chloroplastes. Dans les aliments, ils sont souvent présents sous forme d'hétérosides (Guignard, 1996).

Selon le nombre, la position et la nature des substituants des deux cycles aromatiques et du degré d'oxydation et de substitution de la position 3 du cycle C, on distingue six sous-groupes de flavonoïdes (Fig.11) :

- Les flavonols (par ex. kaempférol, quercétine), qui sont abondants dans les oignons, les poireaux et le brocoli.
- Les flavones (par ex. apigénine, lutéoline), qui sont retrouvés dans le persil et le céleri
- Les isoflavones (par ex. daidzéine, génistéine), majoritaires dans les produits issus du soja
- Les flavanones (par ex. hespérétine, naringénine), qui sont particulièrement abondants dans les agrumes et les tomates

- Les flavanols (par ex. (+)-catéchine, (—)-épicatéchin, épigallocatechine, épigallocatechine gallate (EGCG), qui sont retrouvés dans le thé vert, le vin rouge, le chocolat
- Les anthocyanes (par ex. pélagonidine, cyanidine, malvidine), dont les sources incluent le vin rouge et les baies.

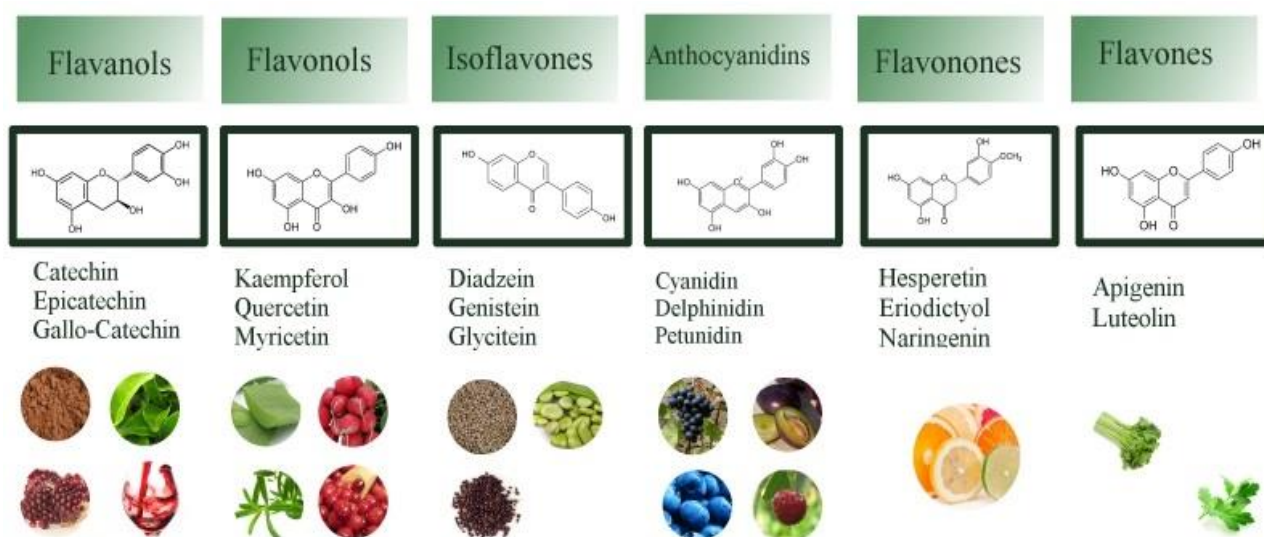


Figure 11 : Structure des flavonoïdes (aglycones) et position des principaux substituants (Stoclet et Schini-Kerth, 2011)

I.2.2.3. Propriétés physico-chimiques des polyphénols

Comme l'ensemble des dérivés hydroxylés, les phénols sont des molécules associées par des liaisons hydrogène, donc peu volatiles (Simirgiotis et Schmeda-iirschmann, 2010 ; Petigny et *al.*, 2014) . Les groupements hydroxyles en position para et ortho, les noyaux phénoliques de polyphénols présentent un caractère acide renforcé, ce qui permet une dissociation au moins partielle à pH neutre. Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques, particulièrement les substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (- M) et substituants à effet mésomère donneur d'électrons (+M) (Dangles, 1999).

La solubilité des flavonoïdes dans l'eau et dans des solvants très apolaires est faible et

dépendante du pH. En effet, à un pH 1.5, la solubilité dans l'eau de l'hesperitine et de la naringénine est respectivement de 6 et de 25 mg/L, alors qu'à un pH 8 la solubilité est quatre fois plus élevée. D'autre part, la solubilité de la rutine, de la naringine et de la luercéline dans l'eau à 20°C est respectivement de l'ordre de 125 mg/L, 0,5 g/l, et < 10 mg/L. Benavente-Garcia *et al.* (2001) ont évalué la solubilité de la néohespéridine dihydrochalcone dans différents mélanges eau/éthanol. La solubilité de ce composé à 20°C dans l'eau, l'éthanol et le mélange eau/éthanol (1/1) est respectivement de 0,4 g/L, 12 g/L et 123 g/L (Anthoni, 2007).

Les acides phénoliques sont généralement caractérisés par des maximums d'absorption entre 254 et 320 nm. Par exemple, l'acide vanillique peut être détecté à 254 nm, l'acide gallique et syringique à 275 nm, l'acide salicylique à 305 nm tandis que les acides chlorogénique, caféique, gentisique, sinapique, p-coumarique, férulique et rosmarinique sont caractérisés par une absorption maximale à 320 nm (Wen *et al.*, 2005 ; Garcia-Perez, 2008). Les spectres UV des flavonoïdes permettent d'observer deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300-395 nm) due à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et de la bande II (240-280 nm) qui est associée à l'absorption de la partie benzoyle (Harborne et Williams, 2000).

La lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme, d'ions métalliques et d'oxydants ont été décrits comme des paramètres influençant la stabilité des polyphénols (Anthoni, 2007).

I.2.2.4. Intérêts santé des polyphénols

Les composés phénoliques sont dotés d'un grand nombre de propriétés biologiques qui sont exploitées dans de nombreux domaines, et en particulier, thérapeutique et pharmaceutique (Fig. 12).

- Propriétés antioxydantes

Historiquement, les actions biologiques des polyphénols ont été attribuées à leurs propriétés antioxydantes, que ce soit par leur capacité réductrice intrinsèque ou par leur influence sur le statut redox intracellulaire (Visioli *et al.*, 1998 Halliwell, 2006).

Les polyphénols, et, en particulier, les flavonoïdes sont d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène ($O_2^\bullet$, $HO^\bullet$, $NO^\bullet$, H_2O_2 , $HOCl$, $RO^\bullet$ et $ROO^\bullet$) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN).

Cette propriété, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif, en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives. Les radicaux libres seraient aussi impliqués dans le processus de vieillissement (Quideau et *al.*, 2011).

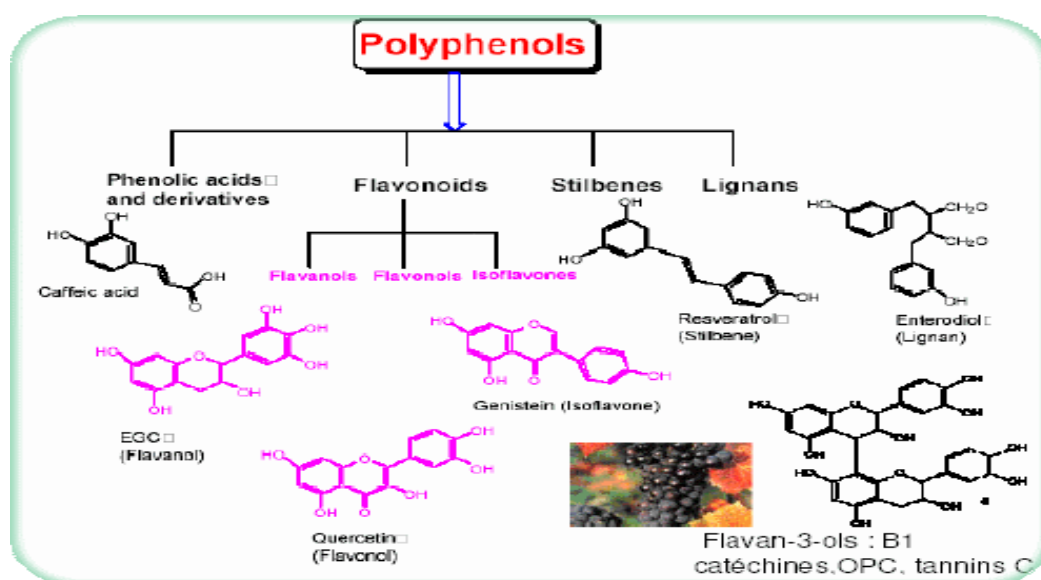
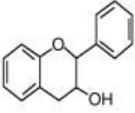
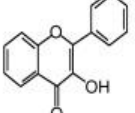
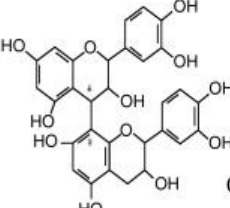
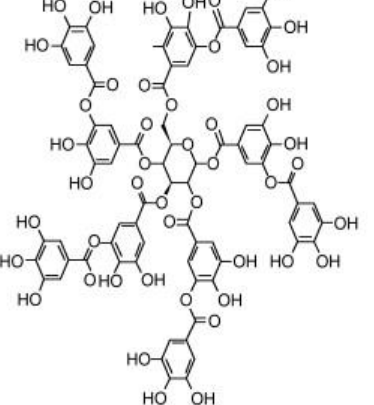
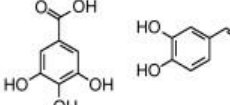
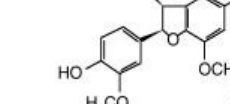


Figure 12 : Polyphénols à effets santé. Quercétine : anti-inflammatoire ; Entérolactone : vasculo-protecteur et protecteur osseux ; Resvératrol : anticancéreux ; Génistéine : anti-bouffées de chaleur et protectrice de l'os ; (Bennetau-Pelissero, 2014).

- Propriétés antimicrobiennes

La figure 13 représente les différentes classes des polyphénols à activité antimicrobienne. Les propriétés antimicrobiennes de certaines classes de polyphénols

 FLAVAN-3-OL	ANTIBACTERIAL ANTIVIRAL ANTIFUNGAL <i>V.cholerae</i> - <i>S.mutans</i> - <i>C.jejuni</i> <i>C.perfringes</i> - <i>E.coli</i> - <i>B.Cereus</i> <i>H.pylori</i> - <i>S.aureus</i> - <i>L.acidophilus</i> <i>A.naeslundii</i> - <i>P.oralis</i> - <i>P.gingivalis</i> <i>P.melaninogenica</i> - <i>F.nucleatum</i> - <i>C.pneumonia</i> Adenovirus – Enterovirus – Flu virus <i>Candida albicans</i> <i>Microsporium gypseum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i>
 FLAVONOL	
 CONDENSED TANNIN	ANTIBACTERIAL ANTIVIRAL <i>S.mutans</i> <i>E.coli</i> <i>S.aureus</i> influenza A virus type -1 herpes simplex virus (HSV)
 HYDROLYSABLE TANNIS	ANTIBACTERIAL ANTIVIRAL ANTIFUNGAL Different strains of : <i>Salmonella</i> - <i>Staphylococcus</i> <i>Helicobacter</i> - <i>E.coli</i> - <i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i> - <i>Campylobacter</i> <i>Lysteria</i> Epstein-Barr virus Herpes virus HSV -1 and HSV -2, <i>Candida parapsilosis</i>
 PHENOLIC ACID	ANTIBACTERIAL <i>S.aureus</i> - <i>L.monocytogenes</i> <i>E.coli</i> - <i>P.aeruginosa</i>
 NEOLIGNAN	ANTIBACTERIAL Different strains of : <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Current Opinion in Biotechnology

Figure 13 : Polyphénols à effet antimicrobien (Daglia, 2012).

ont été proposées soit pour développer de nouveaux conservateurs alimentaires naturels (Rodriguez Vaquero *et al.*, 2010), soit pour la mise au point de thérapies innovantes en matière de traitement de diverses infections microbiennes (Daglia, 2012 ; Kortei *et al.*, 2014).

- Polyphénols et maladies cardiovasculaires

De nombreuses études épidémiologiques (Lijima *et al.*, 2000 ; Orallo *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2003 ; Schroeter *et al.*, 2005 ; Perez-Vizcaino *et al.*, 2006 ; Auger et Schini-Kerth, 2014) ont montré qu'il existait une association inverse entre la morbi-mortalité cardiovasculaire et la consommation de produits riches en polyphénols tels que les fruits, les légumes, le vin rouge, le cacao et le thé.

L'effet bénéfique des polyphénols sur la santé cardiovasculaire a été attribué en partie à leur effet direct sur les vaisseaux sanguins et plus particulièrement sur l'endothélium. En effet, des études expérimentales et cliniques ont révélé que les polyphénols sont capables d'augmenter la formation endothéliale de facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur et un inhibiteur de réponses pro-inflammatoires et pro-thrombotiques, et d'améliorer la dysfonction endothéliale et le stress oxydant vasculaire qui contribuent au développement des pathologies cardiovasculaires majeures comme l'hypertension artérielle (Auger et Schini-Kerth, 2014).

-Polyphénols et inflammation

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipoxycgénase, l'acide arachidonique est métabolisé respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Une étude de Landolfi et son groupe a montré que certains polyphénols sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes (Landolfi *et al.*, 1984). Les effets de la quercétine et de la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipoxycgénase. Cependant, à de faibles concentrations, seule la lipoxycgénase est affectée. En revanche, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysine agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (Nkhili, 2009).

La phagocytose qui accompagne une infection virale ou bactérienne est suivie d'une production d'espèces oxygénées réactives par les neutrophiles, ce qui va promouvoir l'inflammation. D'une manière générale, les espèces radicalaires, quelles que soient leurs origines, peuvent induire des dommages tissulaires, favoriser le processus de vieillissement, voire être à l'origine de certaines pathologies telles que le cancer et l'athérosclérose (Ward, 1994). Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contrer cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles (Limasset *et al.*, 1993).

- Polyphénols et cancer

Plusieurs études menées *in vitro* sur des lignées de cellules cancéreuses (Yang *et al.*, 2010 ; Tabaczar *et al.*, 2014 ; Pan *et al.*, 2015 ; Pavan *et al.*, 2015) ou *in vivo* à l'aide de modèles animaux (Lee *et al.*, 2006 ; Alonso-Castro *et al.*, 2013 ; Thangavel et Vaiyapuri 2013) ont rapporté que les composés phénoliques possèdent une activité anti-carcinogène. Les flavonoïdes ont montré des effets protecteurs contre les cancers de la prostate, du côlon et du poumon (Duthie, 2000 ; Nkhili, 2009).

Plusieurs mécanismes d'action ont été identifiés : activité pro- ou anti-oestrogénique, effets antiprolifératifs, induction de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose, prévention de l'oxydation, activité anti-inflammatoire, modification de la signalisation cellulaire (Garcia Lafuente *et al.*, 2009). Les études *in vitro* (Lee *et al.*, 2006 ; Chen et Chen, 2013) ont montré que les polyphénols pouvaient agir sur les voies de signalisation impliquées dans les phénomènes de prolifération et de différenciation.

CHAPITRE II

MATERIELS

ET

METHODES

Chapitre II. Matériels et méthodes.

II.1. Matériel végétal et stades végétatifs de récolte des fruits

Le matériel végétal est constitué de fruits de courge de muscade (*Cucurbita moschata*) qui ont été récoltés à trois différents stades végétatifs de maturation (Jeune, moyen et mûr). La récolte a été réalisée dans la même ferme de la région de Mostaganem (Algérie).

- Les fruits de stade jeune ont été récoltés le mois d'août 2014.
- Les fruits de stade de moyenne maturité ont été récoltés le mois de septembre 2014.
- Les fruits de stade mûr ont été récoltés le mois d'octobre 2014.

Ces fruits ont été bien lavés à l'eau de robinet, légèrement séchés et entièrement broyés dans un moulin électrique en purée sans les graines, bien étiquetés et conservé à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.



Figure14 : les trois différents stades végétatifs récoltés de *Cucurbita moschata*

II.2. Les microorganismes et les rats d'expérience.

Pour les tests de l'activité antibactérienne, une gamme de neuf bactéries pathogènes et deux bactéries bénéfiques a été utilisée.

II.2.1 Les souches pathogènes

Les souches pathogènes proviennent, pour la plupart, de l' *American Type Culture Collection (ATCC)* et il s'agit de : *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Proteus mirabilis* (ATCC 13315),

Enterococcus hirae (ATCC 10541), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et la souche commensale *Escherichia coli* (ATCC 25922). Ces souches nous ont aimablement été fournies par le laboratoire de microbiologie du département des sciences pharmaceutiques et produits de santé de l'université de Messine (Italie). Une neuvième souche isolée dans notre laboratoire, *Shigella* sp, a également été utilisée dans cette expérience.

II.2.2. Les souches bénéfiques

La souche *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 provient du laboratoire UR 910 écologie et physiologie des systèmes digestif INRA 78352 Jouy-en-Josas, France. La souche *Lactobacillus rhamnosus* LbRE-LSAS, provient de la collection de notre laboratoire LMBAFS (Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé, Université de Mostaganem).

II.2.3. Les rats d'expérience.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* a été réalisée sur des rats mâles Wistar dont le poids varie de 150 à 200g et qui nous ont été fournis par l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux sont placés dans des cages métaboliques de polypropylène (à raison de 6 rats par cage) munies d'un porte étiquette où est mentionné le nom du lot, le traitement subi et les dates des expérimentations et exposés à la lumière 12h/24h. Les locaux sont dotés d'une climatisation dynamique avec une température de 20 - 24°C, le bruit ne dépasse pas 65 décibels, et un taux d'humidité de 55 ± 10 %. Ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard.

Les rats ont été gardés dans ces conditions pendant une période d'adaptation de deux semaines avant le début de l'expérimentation. Les animaux sont manipulés et pesés tous les jours afin de les familiariser avec les manipulateurs.

II.3. Méthodes de biochimie préparative et de dosage des polyphénols de courge

II.3.1. Extraction des polyphénols de courge

II.3.1.1. Les solvants utilisés et procédure d'extraction

Les solvants utilisés sont le méthanol et l'acétate d'éthyle (Sigma Aldrich,

Allemagne). La préparation des extraits phénoliques à partir des courges issues des trois différents stades végétatifs a été effectuée selon la méthode décrite par Mokhtar et *al.* (2014) avec quelques modifications. Un échantillon de 50 g de courge broyée a été mis avec 125 mL de mélange d'HCl 0.05% (v/v) et de méthanol (10/90 : v/v) placé sous agitation à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. Une deuxième extraction est effectuée avec l'acétate d'éthyle. Les extraits sont ensuite filtrés sur papier Watman N°4. Les deux extraits ont été combinés afin d'être évaporés à sec avec un évaporateur rotatif à une température réduite de 45°C. Cette opération a été répétée trois fois.

II.3.1.2. Rendement de l'extraction des polyphénols

Les rendements des extractions des polyphénols ont été calculés en utilisant la formule suivante: (Harbourne et *al.*, 2009).

$$R = (M / M_1) * 100$$

R : Le rendement d'extraction en %.

M : masse en g des extraits de polyphénols.

M₁: masse en g de la matière végétale initiale.

II.3.2. Dosage des polyphénols totaux

Principe :

Le contenu en polyphénols totaux des trois extraits a été déterminé selon la méthode colorimétrique de Gutfinger (1981) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dosage est basé sur la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu (acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique) en un complexe d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène lors de l'oxydation des phénols. Le spectre d'absorption maximale de ce complexe est à $\lambda = 725\text{nm}$ (Daels-Rakotoarison, 1999). L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité de phénols ayant réagi.

Mode opératoire :

La procédure consiste à compléter 100 μL des trois extraits de courge ou de standard à un volume de 5 mL avec l'eau distillée et auxquels, on ajoute 0.5 mL de réactif

de FolinCiocalteu. Après 3 min, 1 mL de solution de carbonate de sodium à 35% (P/V) est additionnée avant de compléter tout ce mélange à 10 mL avec de l'eau distillée pour le laisser réagir pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 725 nm.

Le taux de phénols totaux dans les extraits, a été calculé à partir d'une droite d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique comme standard de référence provient de chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de poudre (*mg Eq AG/ g*).

II.3.3 Dosage des flavonoïdes

Principe :

La teneur totale en flavonoïdes dans les extraits a été déterminée par spectrophotométrie selon la technique décrite par Arvouet-Grand et *al.* (1994) qui fait réagir le chlorure d'aluminium avec les phénols pour former un complexe flavonoïde-aluminium qui absorbe à 415nm.

Mode opératoire :

Un volume de 1 mL d'une solution éthanolique d' AlCl_3 (2% : P/V) a été ajouté à 1mL d'échantillon. Après 10 min d'incubation à la température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 415 nm.

Une courbe d'étalonnage établie avec différentes concentrations de quercétine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), a été établie pour servir à la détermination de la concentration en flavonoïdes des échantillons. La teneur totale en flavonoïdes des extraits de plantes a été exprimée en mg d'équivalent de quercétine par g de poudre de courge (*mg Eq Q/ g*).

II.3.4. Chromatographie des extraits des polyphénols de courge par chromatographie liquide (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse

II.3.4.1. Appareillage.

L'appareillage HPLC utilisé pour l'analyse par chromatographie liquide de nos échantillons de courge présente les caractéristiques suivantes :

Il s'agit d'un Thermo Finnigan Surveyor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) équipé de:

- Une pompe quaternaire
- Détecteur à réseau de photodiodes UV-Vis surveyor (PDA)
- Spectrophotomètre de masse à piège à ions LCQ Advantage Max.
- Une source d'ionisation par électrospray (ESI).

II.3.4.2. Conditions chromatographiques.

L'élution des 5µL d'échantillon injectés dans la colonne a été effectuée sous un débit de 1mL/min. L'absorbance des solutés s'est faite à $\lambda = 280$ nm et le recueil des données

spectrales a été opéré dans la plage située entre 200 et 800nm pour tous les pics. Les données HPLC-ESI-MS / MS ont été acquises en mode d'ionisation positive et négative, à l'aide du logiciel Xcalibur.

II.3.4.2.1. La phase mobile et stationnaire, le gradient de concentration.

La phase stationnaire de séparation est une colonne Supelco C18 (150 x 45 mm, 5 mm). La phase mobile était constituée d'eau (A) et de méthanol (B) acidifiés avec de l'acide acétique à 0.075% (V/V) et l'élution a été effectuée avec le gradient suivant: 2% de B pendant les 5 premières min, puis gradient linéaire de B de 2 à 100% dans les 115 min suivantes.

II.3.4.2.2. Analyse quantitative des fractions phénoliques obtenues par HPLC.

La détermination quantitative du contenu phénolique des extraits de courge a été réalisée par interpolation des courbes d'étalonnage des polyphénols de référence.

II.4. Méthodes d'extraction, d'identification et de dosage des caroténoïdes de la courge.

II.4.1. Extraction des caroténoïdes

II.4.1.1. Les solvants utilisés et procédure d'extraction des caroténoïdes

L'extraction des caroténoïdes à partir des fruits de courge récoltés aux trois différents stades végétatifs a été effectuée selon la méthode de Dugo et *al.* (2008). Cela

consiste à traiter 100 g de courge broyée avec 300 mL d'un mélange de solvants méthanol/ acétate d'éthyle/ éther de pétrole (V/V/V : 1:1:1). Cette opération est répétée 4 fois. Après extraction, l'échantillon est centrifugé à 1500xg pendant 15 min et le surnageant a été récupéré. 2 mg de BHT (société Extrasynthèse Genay, France) ont été ajoutés avant l'évaporation des solvants à une température de 35°C jusqu'à séchage total.

II.4.2. Rendement de l'extraction des caroténoïdes

Le rendement de l'extraction des caroténoïdes ont été calculés de la même façon que pour les polyphénols par la formule suivante:

$$R = (M / M_1) * 100$$

R : Le rendement d'extraction en %.

M : masse en g des extraits de caroténoïdes.

M₁: masse en g de la matière végétale initiale.

II.4.3. Dosage colorimétrique des caroténoïdes totaux de courge

La teneur en caroténoïdes totaux a été déterminée selon la méthode de Talcott et Howard (1999) qui utilise la spectrophotométrie où l'absorbance a été mesurée à 470 nm.

Les résultats exprimés en mg d'équivalent de β -carotène / g de courge ont été obtenus par extrapolation sur une droite étalon établie avec différentes concentrations de β -carotène (0.375 à 5 ppm).

II.4.3. Analyse des caroténoïdes de courge par chromatographie liquide (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse.

L'analyse des caroténoïdes de courge a été réalisée en utilisant le même appareillage HPLC couplée à la spectrométrie de masse et qui a été décrit auparavant (se référer au paragraphe II.3.4.)

II.4.3.1. Analyse qualitative des différents caroténoïdes séparés par HPLC

II.4.3.1.1. La phase mobile et le gradient de concentration.

La phase mobile (A) était constituée d'eau et la phase mobile (B) de méthanol acidifié à 1% d'acide acétique. L'élution s'est effectuée de la manière suivante:

- Les cinq premières minutes : 5% de B

- Entre 5-30 min : 5 à 100%
- débit = 0.8 mL/min

Le spectre UV-Vis était compris dans un intervalle de 400-700 nm et les chromatogrammes ont été obtenus à 450 nm. Le volume d'injection était de 20 µl.

II.4.3.1.2. La phase stationnaire

Une colonne analytique C18, 250 x 4,6 mm, I.D. avec des particules de 5 µm (supelco) a été utilisée.

II.4.3.2. Analyse quantitative des fractions caroténoïdes obtenues par HPLC

La quantification a été réalisée grâce à la droite d'étalonnage de β-carotène (0.05, 0.1, 1, 10, 25, 50 et 100 ppm) dont l'équation est $y = 15345x - 24273$.

II.5. Méthodes d'étude in Vitro des propriétés biologiques des extraits phénoliques et de caroténoïdes de courge des différents stades.

Nous avons étudié l'activité antibactérienne des trois extraits phénoliques vis-à-vis des bactéries pathogènes et bénéfiques par la méthode de diffusion à partir d'un disque solide et l'activité antioxydante des fractions de polyphénols et de caroténoïdes des extraits issus de courge de différents stades en utilisant deux méthodes (test au DPPH et ABTS).

II.5.1. Détermination du potentiel antioxydant des extraits de courge

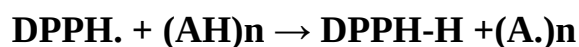
II.5.1.1. Test de réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH°)

L'activité antioxydante des extraits de polyphénols et des caroténoïdes est mesurée par l'utilisation de la méthode de DPPH, qui est un radical libre, stable, et possède une bande d'absorbance à 517 nm.

Principe :

Le Diphényl picryl-hydrazyle (DPPH), est un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Sanchez-Moreno, 2002).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphényle picryl hydrazine (jaune) (Figure 15). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

Mode opératoire :

La capacité de piégeage des radicaux libres des polyphénols et des caroténoïdes de *Cucurbita* a été testée en tant que blanchiment du radical stable DPPH. Le dosage du DPPH a été effectué selon la méthode de Siracusa et al. (2011).

Un échantillon de 37.5 µL de différentes concentrations de chaque extrait a été ajouté à 1,5 mL de solution DPPH (0.1 mM). Après 20 minutes d'incubation, l'absorbance à 517 nm a été mesurée. Les concentrations sont exprimées en mMol TE / g d'extrait (TE = trolox équivalent).

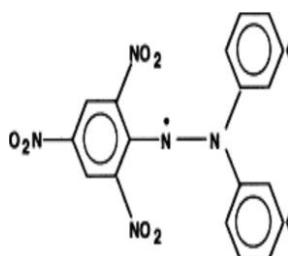
Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité Anti-radicalaire} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

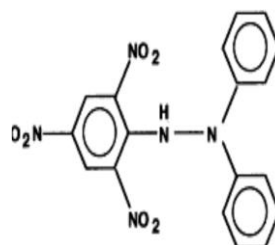
Avec :

A₁ : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A₂ : absorbance en présence d'extrait ou standard.



DPPH (radical libre)



DPPH (radical capté)

Figure 15: Forme libre et réduite du Diphényl picryl-hydrazyle (DPPH)
(Molyneux, 2004).

II.5.1.2. Capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC)

Dans le test TEAC, l'activité antioxydante est déterminée en fonction de la capacité d'un composé à piéger le radical ABTS stable [2,2-azinobis- (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] par rapport à l'activité du Trolox standard.

La solution ABTS est préparée 12 à 14 heures plus tôt et maintenue dans l'obscurité en mélangeant 1.7 mMol de L-1 d'ABTS à 4.3 mMol de L-1 de peroxydisulfate de potassium dans de l'eau dans un rapport de 5: 1. La solution concentrée d'ABTS a été diluée avec du méthanol jusqu'à une absorbance finale de 0.70 ± 0.02 à 734 nm. Une solution mère de trolox est préparée dans du méthanol à différentes concentrations comprises entre 0 et 250 mMol.

Un volume de 0.1 mL de l'échantillon testé ou de l'étalon à différentes concentrations a été ajouté à 2 mL de solution d'ABTS et l'absorbance a été mesurée à 734 nm après 6 minutes contre un blanc. Le TEAC de l'antioxydant a été calculé en rapportant cette diminution de l'absorbance à celle d'une solution de trolox sur une base molaire (Buenguer et *al.*, 2006).

II.5.2. Mise en évidence et détermination de l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques de courge

- **Repiquage et revivification des bactéries pathogènes**

Les souches sont conservées dans des milieux appropriés. Elles sont activées et maintenues par un repiquage. On prélève à l'aide d'une anse à platine des colonies, on les ajoute à 9 mL de bouillon nutritif, on ferme bien les tubes à essai puis on agite pour rendre parfaitement le mélange homogène et enfin on incube à 37° C pendant 72 heures.

- **Préparation des suspensions des bactéries pathogènes**

À partir des tubes à essai, on prélève 100 µL à l'aide d'une micropipette et en utilisant de la méthode d'ensemencement en masse, on l'ensemence sur le milieu sélectif gélosé coulé sur la boîte de pétri puis on incube à 37° C pendant 24 à 48 heures.

La préparation des suspensions bactériennes se fait par le transfert de quelques colonies à l'aide d'une pipette pasteur à partir des cultures bactériennes jeunes dans une solution de Mueller Hinton liquide (MH) pour avoir un inoculum de 10^8 UFC /mL (Ndip et *al.*, 2007).

II.5.2.1. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur milieu gélose.

- **Spectre antibactérien des extraits**

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits phénoliques, la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier a été utilisée (Essawi et Srouf, 2000 ; Choi et *al.*, 2006 ; Karthikeyan et *al.*, 2009 ; Saadabi et *al.*, 2011).

Les différents extraits phénoliques sont dissous dans l'eau distillée stérile et le DMSO a été utilisé comme témoin négatif. Des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre contenant le milieu Mueller Hinton agar, sont inoculées par la suspension bactérienne pathogène une préculture préparé 16 heures au préalable et ajustés à 10^8 UFC /mL. Ensuite un disque de papier Whatman stérile de 6 mm de diamètre imbibé par 20 μ l d'extrait (reconstitué selon la concentration voulue) est déposé à la surface de la géloseensemencée (Bayoub et *al.*, 2010 ; Gupta et *al.*, 2012).

L'ensemble est incubé pendant 24 heures à 37°C, la présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire claire dans laquelle il n'y a pas de croissance de microorganismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germeest sensible.

II.5.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) représente la plus faible concentration d'extrait antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après une incubation de 18 à 24h (Skandamis et *al.*, 2001).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice a été réalisée par la méthode des microdilutions en milieu solide décrite par Billerbeck et *al.*, (2002).

La CMI du meilleur extrait de polyphénols de courge a été déterminée par la méthode de microdilution en bouillon selon le CLSI (2008). Une suspension bactérienne de 100 µL a été ajoutée aux puits d'une plaque de microtitration à 96 puits stérile contenant déjà 100 µL des échantillons testés dilués est incubée pendant 24 heures à 37 °C. La concentration finale de l'inoculum était d'environ 5.10^5 UFC /mL.

II.5.3. Mise en évidence in Vitro de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait phénolique et de caroténoïdes de courge récoltée au stade mûr.

II.5.3.1. Test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine par les extraits de courge.

L'activité anti-inflammatoire des polyphénols et des caroténoïdes de *Cucurbita* a été étudiée en utilisant la technique de l'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine selon la méthode décrite par Sakat et *al.* (2010) ainsi que par Leelaprakash et Mohan Dass (2010). Une solution d'essai (1 mL) contenant différentes concentrations de polyphénols ou de caroténoïdes de courge a été mélangée avec 1 mL de solution d'albumine 1 mM dans du tampon phosphate. Les échantillons ont été incubés à 27 ± 1 °C pendant 15 minutes puis chauffés à 60 ± 1 °C pendant 10 minutes. Après refroidissement, la turbidité a été mesurée à

660 nm. L'ibuprofène a été utilisé comme standard. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{d'inhibition} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) \times 100 / \text{Abs Contrôle}$$

II.5.3.2. Test de stabilisation des globules rouges vis-à-vis de l'hémolyse (HRBC) par les extraits de courge.

L'effet d'extraits de polyphénols et de caroténoïdes de fruit de *Cucurbita* récolté au stade mûr sur l'hémolyse de HRBC a été évalué en utilisant la méthode de Yoganandam et *al.* (2010). Le sang a été prélevé sur des volontaires sains.

Le sang recueilli a été mélangé avec un volume égal de solution d'Alsever stérilisée (2%

de dextrose, 0.8% de citrate de sodium, 0.05% d'acide citrique et 0.42% de chlorure de sodium dans 100 mL d'eau). Le mélange a été centrifugé à 3000 tr / min et les cellules compactées ont été lavées avec de l'isosaline (0.85%, pH 7.2).

Un volume de 5 mL des échantillons testés (50-100-250-500-1000 µg / mL) ou du Diclofénac-sodium comme médicament standard (50, 100, 200 µg/mL) a été ajouté à 1 mL de tampon phosphate (0.15 M, pH 7.4), 2 mL de solution d'hyposaline (0.36%) et 0.5 mL de suspension de HRBC. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 30 minutes et centrifugé pendant 20 minutes à 3000 tr / min.

La teneur en hémoglobine dans la suspension a été estimée en utilisant un spectrophotomètre à 560 nm. Le pourcentage d'hémolyse produit en présence d'eau distillée a été pris à 100%. La stabilisation de la membrane HRBC a été calculée en utilisant la formule :

$$\% \text{ stabilisation} = 100 - [(A_1 (\text{échantillon} / \text{standard}) / A_0 (\text{contrôle}) \times 100]$$

Où: A_0 est l'absorbance de la réaction de contrôle et A_1 l'absorbance en présence d'échantillon ou de standard (Diclofénac).

II.6. Mise en évidence in Vivo des propriétés anti-inflammatoires de l'extrait phénolique et de caroténoïdes de courge de stade mûr chez le rat Wistar.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait phénolique et de caroténoïdes a été évaluée en mesurant l'œdème induit par la carragénine (Mulla et *al.*, 2010; Sharma et *al.*, 2010 ; Alam et *al.*, 2011).

Principe :

Vérification de l'action inhibitrice des extraits de stade mûr de courge sur l'inflammation chimique provoquée par l'injection de 0.1 mL du carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat (Khabbal et *al.*, 2006).

II.6.1. Conditions d'élevage et mise en lots des rats.

Pour étudier l'activité anti-inflammatoire, des rats males Wistar adultes, âgés de 8 semaines, pesant entre 150 et 200g ($n = 42$) nous ont été fournis par l'Institut Pasteur

(Alger, Algérie). Ils sont mis dans des cages à raison de 6 rats par cage, placées dans une pièce convenablement aérée, à température contrôlée ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), un cycle de 12h lumière-obscurité et une humidité relative de $55 \pm 10\%$. Les cages sont en plastique, transparentes et de dimensions normalisées : d'une longueur de 55 cm, d'une largeur de 33 cm et d'une hauteur de 19 cm.

Tous les animaux ont été nourris ad libitum avec un régime standard sous forme de granulé (bâtonnets) (Fig.16) et un accès libre à l'eau potable. Les rats sont privés de nourriture une nuit avant le début de l'expérimentation. A la fin de cette dernière, les rats sont sacrifiés en conformité avec les lignes directrices établies par l'Union Européenne sur la protection des animaux (CEE Conseil 86/609).

II.6.2. Procédure d'induction de l'inflammation

L'induction de l'inflammation chez les rats se fait selon le protocole préconisé par Solanki et *al.* (2015) et Rateesh et *al.* (2009). Les mesures de l'œdème se font par l'utilisation d'un pied à coulisse digital (Caliber Mitutoyo). Aussi des analyses de paramètres inflammatoires sériques sont effectuées. Les 42 rats utilisés pour cette expérimentation sont mis à jeun pendant 16 heures avant l'expérimentation.

Les différents lots :

- Lot 1 : témoin négatif (lot référence)

Les rats ($n = 6$) reçoivent une injection intra-péritonéale de 100 μL d'une solution saline (NaCL 0.09% : P/V), et 1h après une injection sous cutanée 100 μL de carragénine 1% dans l'eau physiologique au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte droite de l'extrémité vers l'articulation sans dépasser celle-ci.

- Lot 2 : témoin positif (lot référence)

Les rats ($n=6$) reçoivent une injection intra-péritonéale de 100 μL de Diclofénac 20 mg/kg comme un médicament de référence, et 1h après une injection sous plantaire de la patte droite de 100 μL de carragénine 1% dans l'eau physiologique.



Figure 16: Rats adultes mâles de souche Wistar

- Lot 3 : rats normaux (lot référence)

Ce lot de rats (n=6) ne reçoivent aucun inducteur d'inflammation et aucun traitement.

**- Lots 4 et 5 : rats traités par l'extrait de polyphénols (EP) de courge
(lots d'essai ou expérimentaux)**

Ces rats (n=6) reçoivent respectivement une injection intra-péritonéale de 100 μ L d'extrait de polyphénols de courge de stade mûr; les doses de 5 et 10 mg/kg dans l'eau physiologique ont été testées (Fig. 17), et 1h après une injection sous plantaire de la patte droite de 100 μ L de carragénine 1% dans l'eau physiologique (Fig. 18).

- Lots 5 et 6 : rats traités par l'extrait de caroténoïdes (EC) de courge (lots essai)

Les rats (n=6) reçoivent respectivement une injection intra-péritonéale de 100 μ L d'extrait de caroténoïdes de courge de stade mûr; les doses de 5 et 10 mg/kg dans l'eau physiologique ont été testées, et 1h après une injection sous plantaire de la patte droite de 100 μ L de carragénine 1% dans l'eau physiologique.

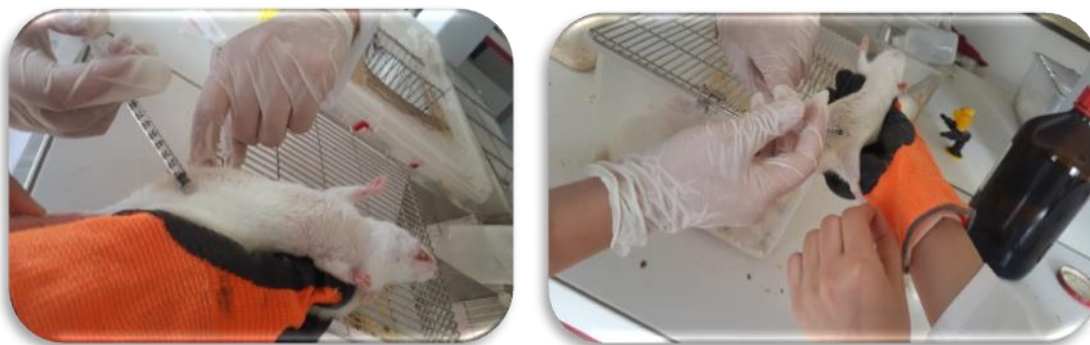


Figure 17 : Injection intra-péritonéale (IP) des extraits de caroténoïdes ou de polyphénols de *Cucurbita moschata* et de Diclofénac chez les rats mâles Wistar.



Figure 18 : Injection sub-plantaire de la carragénine 1% dans la patte droite des rats

II.6.3. Procédure de mesure de la taille des œdèmes.

Les mesures de la taille des œdèmes se font avec un pied à coulisses digital à 0 h avant l'injection de carragénine et à 3 h, ensuite 6 h après l'injection de carragénine (Fig. 19).

Le pourcentage d'augmentation (% Aug) du volume de la patte est déterminé par la mesure des épaisseurs de l'œdème au centre de la région sub-plantaire comme suit :

$$\% \text{ Aug} = V_t - V_0 / V_0 \times 100$$

Avec :

V_0 : Volume de la patte du rat témoin

V_t : Volume après injection de carragénine et traitement (Diclofénac ou EC et EP)

Le pourcentage d'inhibition (% inh) de l'inflammation par les différents traitements est calculé comme suit :

$$\% \text{ inh} = P_0 - P_t / P_0 \times 100$$

Avec

P_0 : % d'augmentation de la patte du témoin

P_t : % d'augmentation de la patte du lot traité



Figure 19 : Mesure de la taille des œdèmes dans la patte droite des rats à l'aide d'un pied à coulisse

II.6.4. Opération de sacrifice des rats et prélèvement sanguin.

Après 3 heures et à la fin de l'expérimentation (après 6 heures), les rats sont anesthésiés à l'éther dans une cloche en verre (Fig. 20). Le sang est prélevé par ponction

dans l'aorte jugulaire. L'avantage de cette technique est la possibilité de collecter du sang stérile et la capacité à réaliser une exsanguination complète (Weiss et *al.*, 2000 ; Elkadi et *al.*, 2014). Pour le dosage immunochimique le sang est centrifugé à 2500 tr/mn à une température de 4°C pendant 15 minutes. Le sérum obtenu peut être congelé jusqu'à 48 heures à – 20°C avant utilisation.



Figure 20 : Anesthésie de rat wistar avant sacrifice

II.6.5. Dosage de la protéine C réactive (CRP)

La protéine C-réactive est une protéine de la phase aigue qui apparait dans le sang lors des processus inflammatoires. Les modifications du taux des protéines de la réponse inflammatoires peuvent être dosées en immuno-néphélométrie et l'évaluation dans le temps des taux sériques peut avoir une grande valeur indicative. La CRP est une protéine à variation élevée (jusqu'à 1000 fois la norme), ayant une demie-vie courte (un jour) et dont le délai de réponse est court (6 à 12 heures). Le dosage de la CRP se fait par la technique immunoturbidimétrique (Marrack et Richards 1971 ; Ritchie, 1967).

Principe :

Le trouble formé par la réaction antigène (CRP)-anticorps (polyclonal de chèvre anti CRP) est apprécié par spectrophotométrie à 340 nm (Marrack et Richards, 1971 ; Ritchie, 1967).

Réactifs

R1 : Tampon phosphate NaCL pH 7.43

Polyéthylène glycol 40 g/l

Azide de sodium 0.95 g/l

R2 : Antisérum polyclonal de chèvre anti CRP

Tampon phosphate NaCL pH 7.43

Azide de sodium 0.95 g/l

Mode opératoire

60 µL de sérum sont additionnés de 1mL de tampon R1 et l'absorbance est lue à 340 nm contre un blanc contenant du NaCL 0.9% (P/V) + 1 mL de tampon R1. Les absorbances sont lues avant et après addition dans les tubes de 100 µL d'antisérum anti-CRP.

La différence d'absorbance est évaluée en utilisant la courbe de calibration réalisée avec cinq concentrations de CRP selon un kit de calibration prêt à l'emploi (Biolabo, Maizy-France).

II.6.6. Dénombrement des globules blancs (FNS)

Prélèvement :

Le prélèvement, ou ponction, est effectuée sur l'aorte selon les procédures terminales pratiquées sur des animaux anesthésiés, permettant de réaliser une exsanguination avant l'euthanasie. Il faut pratiquer une laparotomie, puis ponctionner le vaisseau avec une aiguille de diamètre maximum et de longueur minimale pour éviter la coagulation. Les avantages de ces techniques, par rapport à la décapitation, sont la possibilité de collecter du sang stérile et à réaliser une exsanguination complète (Archer 1977, Kraus 1980, Laroche et Rousselet, 1990 ; Weiss et *al.*, 2000). Il existe aussi des techniques de cathétérisation permanente permettant des prélèvements répétés sans anesthésie (Kraus, 1980).

La numérisation des trois lignées GR, GB, PLT utilise deux principes très différents :

- **La Variation d'impédance**

Le principe Coulter, du nom des inventeurs (Wallace et Coulter, 1953) est la méthode de référence la plus répandue. Utilisée pour les numérations, et la formule leucocytaire approchée. Le principe de la mesure par impédance est le passage de cellules en suspension dans un liquide conducteur à travers un orifice qui modifie la résistance électrique entre deux électrodes (principe Coulter). Cette variation d'impédance est enregistrée sous forme d'impulsions. Le nombre d'impulsions enregistré correspond au passage des cellules.

- **La mesure optique**

Associe les principes de bases de la Cytométrie en Flux (1977) :

-focalisation hydrodynamique

-diffraction lumineuse recueillie à différentes angles/incidence

Elle est utilisée surtout pour la numération des GB associée à la FL, cependant quelques automates utilisent la mesure optique pour les numérations des 3 lignées GR, GB, PLT (Bayer automate ADVIA 120, sysmex automate XT 2000).

II.6.7. Examen histologique des pattes enflammées.

Six échantillons de pattes droites traitées à la carragénine, des pattes traitées par les extraits de polyphénols et de caroténoïdes de courge, du Diclofénac et des pattes normales ont été recueillis et fixés par immersion dans une solution de formaldéhyde à 10% pendant plusieurs jours. Après cela, les tissus fixés ont été incorporés dans de la paraffine pour réaliser des coupes de 3-4 μm . Les coupes tissulaires ont été montées sur des lames de verre et colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) pour une analyse en microscopie optique. L'évaluation a été menée en aveugle par un pathologiste.

II.7. Traitement statistique des résultats

Chaque expérience a été indépendamment réalisée en 3 exemplaires et répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANNOVA) en utilisant le logiciel Stat box version 6.4 (1999).

La comparaison de moyennes a été réalisée par le test de Student- Newman-Keuls au seuil de 5% pour comparaison multiple. A $P < 0.05$, la différence est considérée significative.

CHAPITRE III

RESULTATS

ET

DISCUSSION

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Résultats d'analyse des polyphénols de la courge.

III.1.1. Teneurs en composés phénoliques de la courge.

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des trois extraits de courge récoltée à trois stades différents (vert jeune, vert immature et mûr) sont reportées dans le tableau 3, et sont respectivement exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique (mg EAG) et en mg de quercétine (mg EQ) par 100g de courge fraîche. L'équation de la courbe d'étalonnage des polyphénols totaux est $y = 0.002 x + 0.031$ et le coefficient de corrélation de l'ordre de $R^2 = 0.991$ (fig.21) ; tandis que celle des flavonoïdes totaux est $y = 0.015 x + 0.029$ et $R^2 = 0.998$ (fig.22).

Les polyphénols sont des substances largement répandues chez les végétaux principalement, et les fruits et les légumes en constituent une source importante pouvant procurer des bénéfices santé chez l'homme. Les résultats obtenus ont montré que les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux étaient variables en fonction du stade de maturité (tableau 3). En effet, on constate que la teneur en polyphénols totaux passe de 77.50 mg EAG/100g de courge fraîche au stade végétatif vert jeune à 97.43 mg EAG/100g de courge fraîche au stade végétatif vert immature, soit une augmentation de 26%. Il en est de même pour les flavonoïdes totaux dont la teneur augmente de 22% en passant de 23.47 mg EQ/100g courge fraîche au stade vert jeune à 28.66 mg EQ/100g courge fraîche au stade vert immature.

Les résultats du tableau 3 montrent également que plus la maturation de la courge progresse et moins la teneur en composés phénoliques est importante. En effet, la teneur en polyphénols totaux chute fortement lors de la progression du stade végétatif en passant de 97.43 mg EAG/100g de courge fraîche au stade végétatif vert immature à 55.60 mg EAG/100g de courge fraîche au stade végétatif mûr, ce qui représente une diminution de 43%.

Les flavonoïdes totaux subissent le même sort, puisque leur teneur passe de 28.66 mg EQ/100g courge fraîche au stade vert immature à 19.60 mg EQ/100g courge fraîche au

stade mûr, soit une diminution proche de 32%. De nombreux auteurs ont attribué la diminution de la teneur en composés phénoliques à l'oxydation des polyphénols par les polyphénoloxydases au cours de la maturation des fruits

Tableau 3: Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG) et flavonoides totaux (mg EQ) par 100g de courge fraîche.

Différents stades de maturation de la courge	Polyphénols totaux mg EAG / 100g de courge fraîche	Flavonoides totaux Mg EQ /100g de courge fraîche
Vert jeune	77.50±1.01	23.47 ± 0.90
Vert immature	97.43 ± 3.60	28.66 ± 0.33
Mûr	55.60 ± 3.60	19.60 ± 1.25

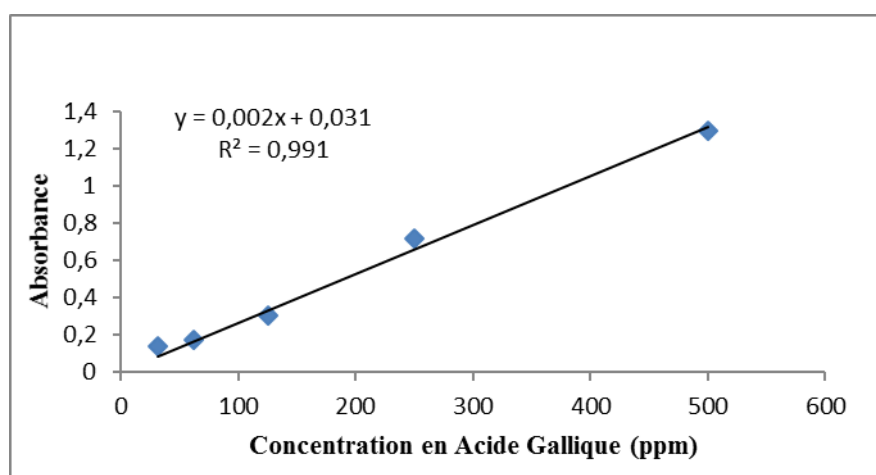


Figure 21: Droite étalon Acide gallique ($\lambda = 725\text{nm}$)

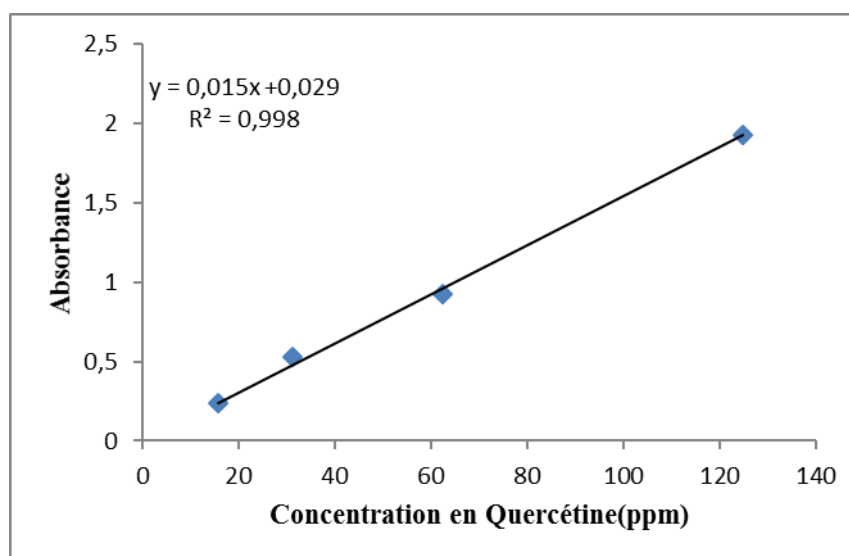


Figure 22 : Droite étalon Quercétine ($\lambda = 415\text{nm}$).

(Pepe et *al.*, 2015, Njoh Ellong et *al.*, 2015, Saravanan et *al.*, 2014, Rocha et *al.*, 2014, Petti et scully, 2009). Paradoxalement, Deng et *al.* (2013) avaient constaté que la concentration en phénols totaux des fruits mûrs était supérieure de 71% à celle des jeunes fruits.

Ces derniers auteurs avaient aussi rapporté que les concentrations en flavonoïdes, anthocyanines et en proanthocyanidines étaient respectivement de 4.5, 14 et 17% plus élevées chez les fruits mûrs que chez les jeunes fruits. La teneur en composés phénoliques totaux de leurs échantillons immatures et mûrs était respectivement de 10.3 et de 33.5 mg / 100g de courge ; alors que le calcul de celle en flavonoïdes totaux révélait des valeurs respectives pour la courge immature et mûre de 5.4 et 6 mg. Les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux obtenues dans nos échantillons étaient plus importantes, mais inférieures à celles rapportées par Rocha et *al.* (2014).

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différents solvants et de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

La maturation des fruits implique une série de réactions biochimiques qui conduisent à la production de composés phénoliques, de caroténoïdes et à la formation de composés volatils (Azizah et *al.*, 2009).

Des différences dans le contenu et les quantités des composés phytochimiques mentionnés précédemment peuvent se produire, mais cela dépend d'un certain nombre de facteurs tels que les facteurs extrinsèques (les facteurs géographiques et climatiques tels que : la lumière, la nature du sol, la saison, la région de culture), les facteurs génétiques, la variété de fruits, ou encore le degré de maturation de fruit et la durée de stockage (Ki Hyun kim et *al.*, 2013, Liero et *al.*, 2010, Aurigena et *al.*, 2014, Iswaldi et *al.*, 2013, Santos et *al.*, 2006, Bunea et *al.*, 2008).

L'étude de Njoh Ellong et *al.* (2015) a démontrée que le pois d'Angole était le légume le plus riche étudié en termes de teneur en polyphénols totaux qui étaient présents à hauteur de 978.6 mg /100 g ; ce qui représente presque quatre fois plus que le contenu phénolique de la courge étudiée. Le gombo, l'igname, le malanga et la patate douce étaient plus riches en polyphénols que l'échalote et le brocoli. L'acérola était plus riche en polyphénols que les courges avec une valeur de 727 mg / 100g et était le fruit le plus riche de Martinique en termes de polyphénols. Pomme de cajou et pomme étoile avaient des valeurs élevées, avec respectivement 603 et 515 mg /100g.

Les plus fortes concentrations en phénols totaux ont été rapportées par Valenzuela et *al.* (2014) dans les fractions méthanoliques de quatre variétés de *Cucurbita* sp avec des valeurs allant de 10.68 à 160.32 mg EAG /g d'extrait de chair de courge et de 0.09 à 0.20 mg EAG /g d'extrait de graines de courge. Parry et *al.* (2008) avaient rapporté une teneur en phénols totaux de l'ordre de 1.58 mg EAG /g d'extrait méthanolique d'huile de graines de courge.

III.1.2. Influence du stade de la maturation sur le profil phénolique de la courge.

L'analyse qualitative du profil phénolique des extraits de courge obtenu à partir des trois stades végétatifs (vert jeune, vert immature et mûr) a été réalisée par HPLC-PDA-ESI-MS. Les trois chromatogrammes obtenus (Fig. 23, 24 et 25) montrent clairement les

changements du profil phénolique de la courge au cours de sa maturation, puisque certains pics (phénols) visibles au stade vert jeune ne le sont plus au stade mûr.

L'analyse HPLC a permis la mise en évidence de 33 composés phénoliques (33 pics) bien individualisés dans le fruit courge aux stades vert jeune et vert immature (fig. 23 et 24). En revanche, la maturation du fruit s'accompagne d'une réduction du nombre de composés phénoliques présents à 23 (fig.25).

L'identité de ces 33 composés a été révélée et est reportée au tableau 4 qui laisse apparaître une prédominance des acides phénoliques comme l'acide caféique, acide cinapique, caftarique, ferulique, dérivés de l'acide dehydroferulique, syringique, coumarique, dérivés de l'acide protocatechuique, tartarique.

On note également la présence de quelques acides aminés. Les acides phénoliques représentent environ un tiers des phénols alimentaires et sont présents dans les plantes sous forme libre et liée (Iswaldi et *al.*, 2013). L'absence de l'acide chlorogénique de nos échantillons est à souligner en raison du signalement de sa présence dans d'autres variétés de courge par d'autres auteurs (Pepe et *al.*, 2015, Iswladi et *al.*, 2013).

Certains flavonoïdes ont également été identifiés dans l'extrait de courge, principalement le p-comaroylhexoside, la quercétine glucoside et la vanilline. Un autre composé phénolique appartenant à la classe des lignanes a été identifié ; il s'agit du Laricirésinol-sesquiliglan qui a été déjà décrit dans la courge dans d'autres publications (Delia et Amaya, 2010, Nawirska-Olszańska et *al.*, 2014).

Parmi les autres composés polaires, cinq acides aminés ont été détectés (valine, thréonine, tyrosine, phénylalanine et acide aspartique) et deux acides organiques (acide tartrique et maléate de feruloyle) et une glycosylamine (adénosine). Ces composés polaires ont également été décrits dans un travail antérieur mené par Iswaldi et *al.* (2013) dans la courge *Cucurbita pepo*.

La quantification a été faite avec le même appareillage qui a été étalonné avec des molécules phénoliques standards ayant servi à établir des droites étalons grâce auxquelles les valeurs des échantillons ont été déterminées par extrapolation.

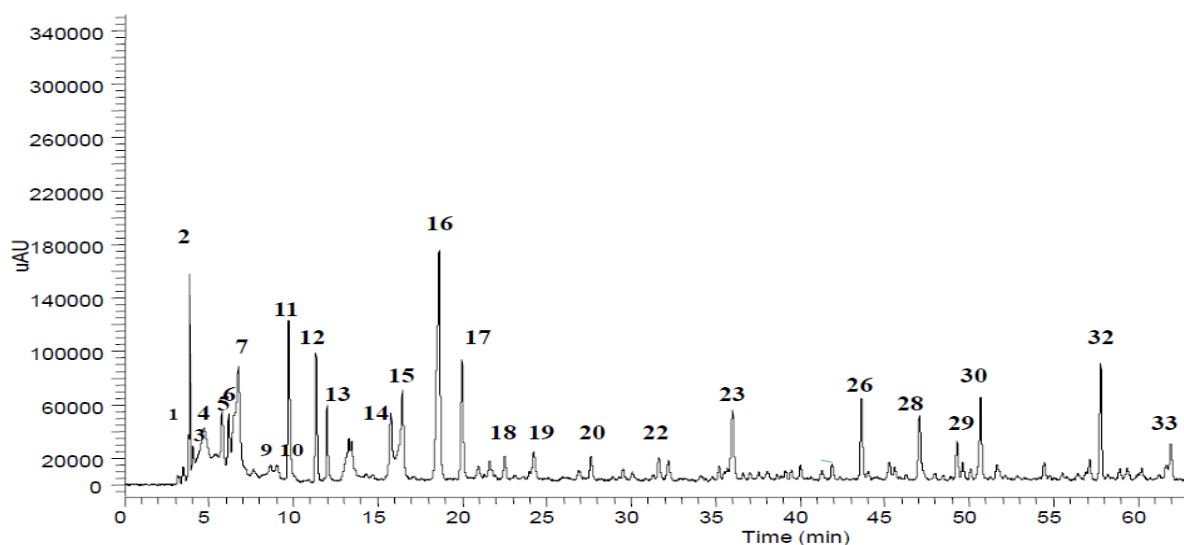


Figure 23: Identification des polyphénols de courge (*C. moschata* D.) au stade vert jeune par HPLC-PDA-ESI-MS

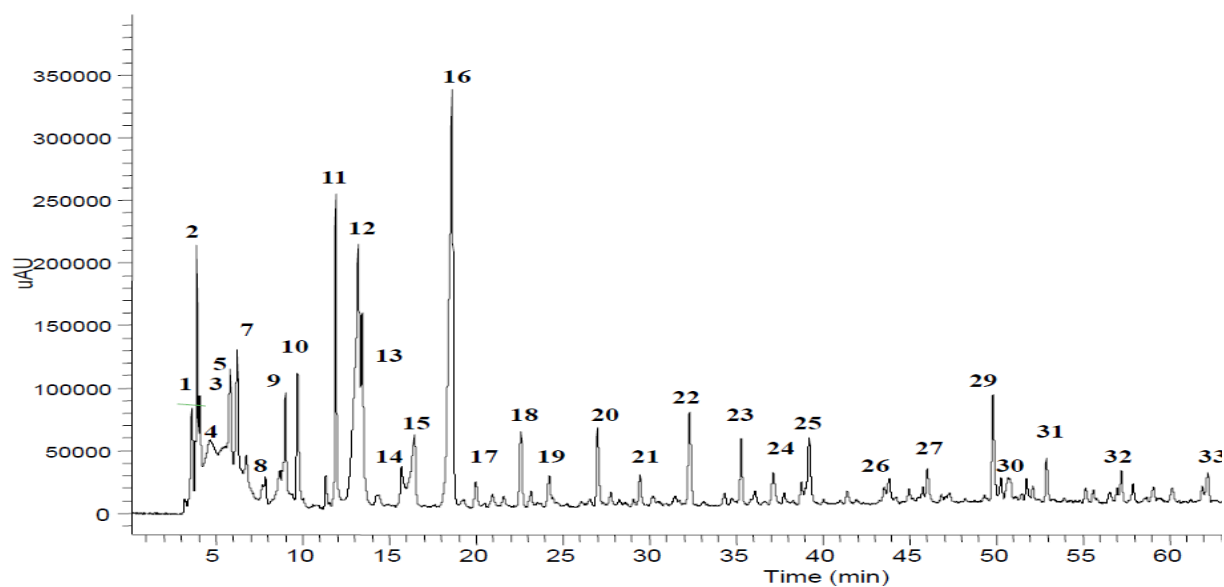


Figure 24 : Identification des polyphénols de courge (*C. moschata* D.) au stade vert immature par HPLC-PDA-ESI-MS.

Ces résultats sont en accord avec ceux d'études antérieures sur différentes variétés de courge (Torres Gama et al., 2006 ; Hagiwara et al., 1998 ; Kurz et al., 2008).

La détermination de la teneur en polyphénols dans l'extrait de courge analysé a été effectuée par extrapolation des valeurs des échantillons sur des courbes d'étalonnage et les résultats sont indiqués dans le tableau 5.

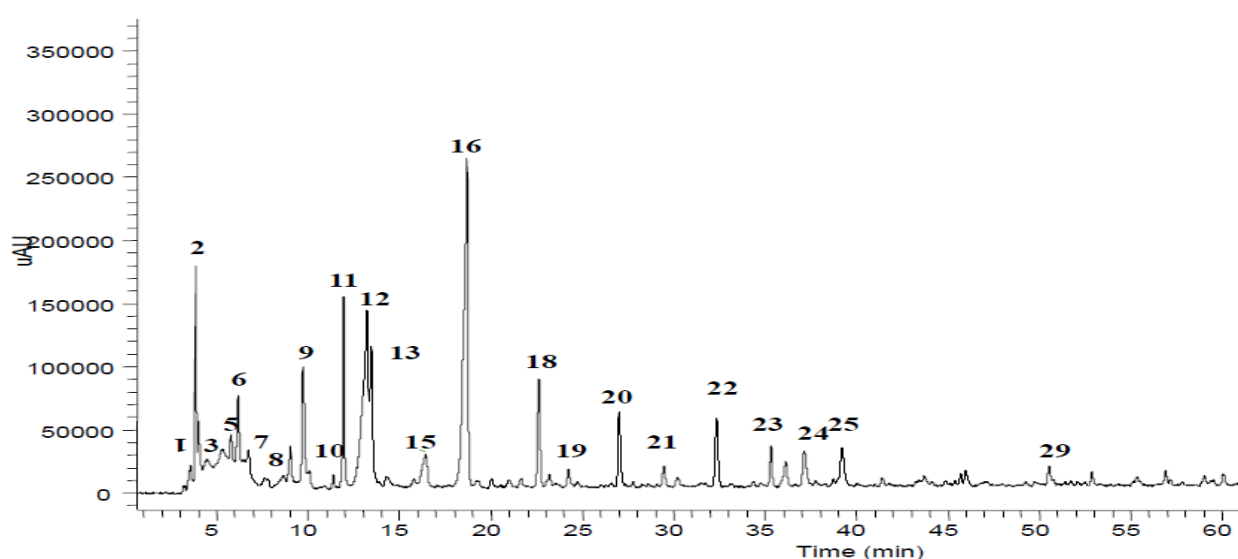


Figure 25: Identification des polyphénols de courge (*Cucurbita moschata* D.) au stade mûr par HPLC-PDA-ESI-MS.

L'acide syringique est le composé le plus abondant, représentant 37% des composés phénoliques de courge, suivi par l'acide cinnamique (11.93%), l'acide protocatéchique (11.30%), le p-comaroylhexoside (4.71%), la quercétine glucoside (4.53%) et la vanilline (4.29 %).

Selon les résultats de ce travail, les teneurs de certains acides phénoliques tels que l'acide caféique et son dérivé, l'acide protocatéchique, l'acide cinnamique, l'acide syringique, l'acide coumarique et l'acide dihydroferulique ; ainsi que celles des flavonoïdes comme la quercétine glucoside, la lutéoline 7-O-glucuronide, la lutéoline-7 -O-rutinoside, le

Tableau 4 : Identification des polyphénols de la courge (*Cucurbita moschata* D.) au stade vert immature par HPLC-PDA-ESI-MS.

N° pic	RT** (min)	Formule brute	[M-H] ⁻ ***	MS ² ****	Nom du composé
1	3.60	C ₉ H ₈ O ₄	215	215 179 100 135	Caffeic acid derivative
2	3.83	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325	163119	<i>p</i> -Comaroylhexoside
3	4.01	C ₅ H ₁₁ NO ₂	116	116 69 83	Valine
4	4.62	C ₄ H ₉ NO ₃	118	118 101 72	Threonine
5	5.78	C ₈ H ₈ O ₃	151	151	Vanillin
6	6.18	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	209	209	Sinapyl alcohol
7	6.75	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223	180 195	Sinapic acid
8	9.00	C ₁₄ H ₁₄ O ₈	505	179 132	Feruloyl malate
9	9.72	C ₄ H ₇ NO ₄	132	132 86	Aspartic acid
10	11.32	C ₉ H ₁₁ NO ₃	180	180	Tyrosine
11	11.99	C ₇ H ₆ O ₄	153	111 109	Protocatechuic acid
12	13.22	C ₉ H ₈ O ₂	147		Cinnamic acid
13	13,44	C ₄ H ₆ O ₆	149		Tartaric acid
14	15.73	C ₇ H ₆ O ₄	157	109	Protocatechuic acid derivate
15	16.46	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	266	136	Adenosine
16	18.63	C ₉ H ₁₀ O ₅	197	166 120	Syringic acid
17	19.97	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164	120	Phenylalanine
18	22.59	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195	181	Dihydroferulic acid derivative
19	24.23	C ₉ H ₈ O ₃	163		Coumaric acid
20	27.62	C ₉ H ₈ O ₄	179		Caffeic acid
21	29.46	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195	178	Dihydroferulic acid
22	32.32	C ₉ H ₁₀ O ₄	181		Syringaldehyde
23	35.99	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193		Ferulic acid
24	37.14	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289		Catechin
25	39.22	C ₁₃ H ₈ O ₆	259	215 187 231	1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone
26	43.63	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	311		Caftaric acid
27	46.06	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	457		Gallocatechin gallate

28	47.07	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₀	555		Lariciresinol-sesquilignan
29	49.83	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463	301	Quercetin glucoside
30	50.69	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441	539	Epicatechin gallate
31	52.92	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461		Luteolin-7-O-glucuronide
32	57.79	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	455	301	Quercetin-hexoside
33	62,21	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	593	285	Luteolin-7-O-rutinoside

N: numéro de pic, **RT: temps de rétention, ***[M-H]⁻: forme ionique de la molécule
****MS : spectrométrie de masse

p-comaroylhexoside, la vanilline et (-) et le gallo catechingallate) augmentent significativement (p <0,05) du stade vert jeune au stade vert immature. Cependant, ces teneurs diminuent lors du passage des fruits au stade mûr.

Nawirska-Olszańska et al. (2010) ont étudié les composés phénoliques dans différentes espèces des fruits du *Cucurbita maxima* et *Cucurbita pepo* à différents stades de maturité et ont constaté que, à mesure que la maturité progressait, la quantité d'acides phénoliques augmentait. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés dans la présente étude.

Des résultats similaires ont également été rapportés dans des recherches antérieures menées par Gündoğdu et al. (2013), qui ont étudié le développement de composés phénoliques à trois étapes de maturation chez les abricotiers (Rosaceae). Ils ont remarqué que le stade mi-mûr était le plus riche en acides phénoliques et en flavonoïdes.

Deux phénomènes distincts de variation des teneurs phénoliques ont été observés au cours de la maturation: soit une décroissance régulière (Wang et al., 2001, Ayala-Zavala et al., 2004), soit une hausse à la fin de la maturation (Serrano et al., 2005; al., 2011). Par ailleurs, les quantités plus élevées d'acide sinapique, d'acide férulique, d'acide caftarique,

Tableau 5 : Quantification des polyphénols de la courge (*C. moschata* D.) aux stades vert jeune, vert immature et mûr ($\mu\text{g} / \text{g}$).

N° Pic	Composé	Vert jeune	Vert immature	Mûr
1	Caffeic acid derivative	23.80 $\pm$ 1.41	102.58 $\pm$ 8.69	33.64 $\pm$ 2.60
2	<i>p</i> -comaroylhexoside	75.32 $\pm$ 2.17	171.14 $\pm$ 10.57	92.89 $\pm$ 5.84
3	Vanillin	10.74 $\pm$ 1.85	156.10 $\pm$ 7.69	43.99 $\pm$ 4.41
4	Sinapic acid	136.92 $\pm$ 8.21	27.16 $\pm$ 1.58	16.27 $\pm$ 1.41
5	Protocatechuic acid	96.90 $\pm$ 3.47	410.31 $\pm$ 13.99	229.46 $\pm$ 14.75
6	Cinnamic acid	43.04 $\pm$ 2.84	433.48 $\pm$ 19.27	316.46 $\pm$ 13.86
7	Protocatechuic acid derivate	228.79 $\pm$ 17.15	85.92 $\pm$ 4.31	-
8	Syringic acid	604.24 $\pm$ 18.55	1340.59 $\pm$ 28.12	998.55 $\pm$ 13.54
9	Dihydroferulic acid derivative	37.44 $\pm$ 2.38	105.66 $\pm$ 7.54	156.87 $\pm$ 8.78
10	Coumaric acid	33.33 $\pm$ 2.24	52.56 $\pm$ 4.87	30.56 $\pm$ 2.86
11	Caffeic acid	29.79 $\pm$ 1.79	106.80 $\pm$ 7.71	85.67 $\pm$ 5.88
12	Dihydroferulic acid	-	41.06 $\pm$ 3.15	29.64 $\pm$ 2.45
13	Ferulic acid	112.42 $\pm$ 7.98	85.24 $\pm$ 4.55	57.51 $\pm$ 3.84
14	Catechin	-	45.95 $\pm$ 2.21	59.79 $\pm$ 4.86
15	Caftaric acid	106.49 $\pm$ 9.15	43.35 $\pm$ 3.95	-
16	(-)-Gallocatechin gallate	-	41.21 $\pm$ 2.87	-
17	Quercetin glucoside	77.38 $\pm$ 5.66	164.66 $\pm$ 11.74	46.98 $\pm$ 3.27
18	(-)-Epicatechin gallate	75.80 $\pm$ 5.12	42.19 $\pm$ 2.13	-
19	Luteolin 7-O-glucuronide	-	71.35 $\pm$ 5.62	-
20	Quercetin-hexoside	127.02 $\pm$ 9.56	37.03 $\pm$ 1.18	-
21	Luteolin-7-O-rutinoside	65.15 $\pm$ 4.36	66.52 $\pm$ 3.49	-

de dérivé d'acide protocatéchuïque, de gallate d'épicatéchine et de quercétine-hexoside au premier stade (jeune vert) diminuent au stade de la maturité ($p < 0,05$).

Les résultats corroborent avec la littérature ; Zdunic et *al.* (2016) ont identifié huit composés dans différentes variétés de fruits de courge *C. pepo*, *C. maxima* et *C. moschata* et parmi eux les acides phénoliques étaient les plus dominants.

Les acides protocatechuïque et chlorogénique sont les acides phénoliques qui sont les plus largement distribués dans ces variétés, ainsi que dans diverses espèces végétales connues comme sources d'antioxydants puissants tels que le thé vert.

Dragovic-Uzelac et *al.* (2005) ont rapporté la présence d'acide chlorogénique dans *C. pepo*, *C. maxima* et *C. moschata*. Parmi les flavonoïdes identifiés, il y a l'hespéridine, glycoside d'hespérétine, qui caractérise les agrumes.

L'hespéridine présente différentes activités biologiques telles que les activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. L'ériodictyol-7-néohespéridoside est également présent dans les agrumes.

C'est un puissant antioxydant puisqu'il contient une fraction catéchol avec un cycle B et un groupement hydroxyle (5-OH) en cycle A et un groupement carbonyle en position 3, capable de chélater les cations métalliques. La vanilline n'a été observée que dans *C. moschata*.

Les différences constatées dans les quantités des composés phénoliques par rapport à ce qui a été rapporté par la littérature peuvent être dues au procédé d'extraction appliquée, la température utilisée ou la polarité des solvants.

D'autre part, l'influence de l'origine géographique des échantillons et aussi de l'année de la collecte, ne peut pas être exclue des causes de ces différences (Meirinhos et *al.*, 2005).

III.2. Résultats d'analyse des caroténoïdes de la courge.

III.2. 1. Teneur en caroténoïdes totaux de la courge

La teneur en caroténoïdes a été déterminée par une méthode spectrométrique. La droite étalon est établie en utilisant le β -carotène comme standard et les résultats sont

exprimés en mg équivalent de β -carotène par 100 g de courge fraîche (mg ECa/100 g). L'équation de la droite est $y = 0.109x + 0.006$ (fig.26) et le coefficient de corrélation $R^2 = 0.994$.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6 et ils indiquent que les caroténoïdes totaux sont présents dans la courge à raison de 0.117, 0.124 et de 0.415 mg ECa/ 100g de courge fraîche respectivement aux stades vert jeune, vert immature et mûr.

Ces résultats sont très inférieurs à ceux publiés par Kang et al. (2010) qui ont rapporté le contenu en caroténoïdes dans trois lots de courge orange, et ils ont trouvé que leur teneur est de l'ordre de 1.06, 1.12 et 0.9 mg ECa/100g de courge fraîche. La moyenne des teneurs rapportées par cet auteur (1.02 mg ECa/100g de courge fraîche) représente plus de 8 fois celles des stades jeune vert et vert immature, et plus de 2 fois celle du stade mûr trouvées dans le présent travail.

Il apparaît que contrairement aux composés phénoliques, la teneur en caroténoïdes totaux augmente nettement lorsque la courge arrive à maturité. Cette augmentation est de plus de 23.4% lorsque la courge passe du stade vert immature à celui de mûr.

Pandey et al. (2003) ont étudié la composition en caroténoïdes de courge durant différents stades de maturation, ils ont trouvé que la teneur en caroténoïdes totaux de la courge orange est de 14.85 mg/100g de courge fraîche au stade mûr.

Selon la littérature, le taux de caroténoïdes est plus élevé dans la courge au stade mûr que dans la courge immature ou même jeune (Jacobo-Valenzuela et al., 2011, Roura et al., 2007). Durant la maturation, la couleur verte de la courge, due à la présence des chlorophylles, disparaît avec la synthèse des pigments caroténoïdes (Petkova et Antova, 2015).

D'après Njoh Ellong et al. (2015), le cresson et la patate douce sont plus riches en caroténoïdes que le brocoli ; alors que la courge en était plus riche que la carotte et les épinards. La patate douce était même plus riche que la pomme de terre, chaque légume enregistrant 244.33 mg /100g et 64.64 mg /100g, respectivement. La teneur en caroténoïdes de la mandarine Mamey et de la mandarine macaque était plus élevée que 200 mg / 100g et étaient les fruits les plus riches étudiés.

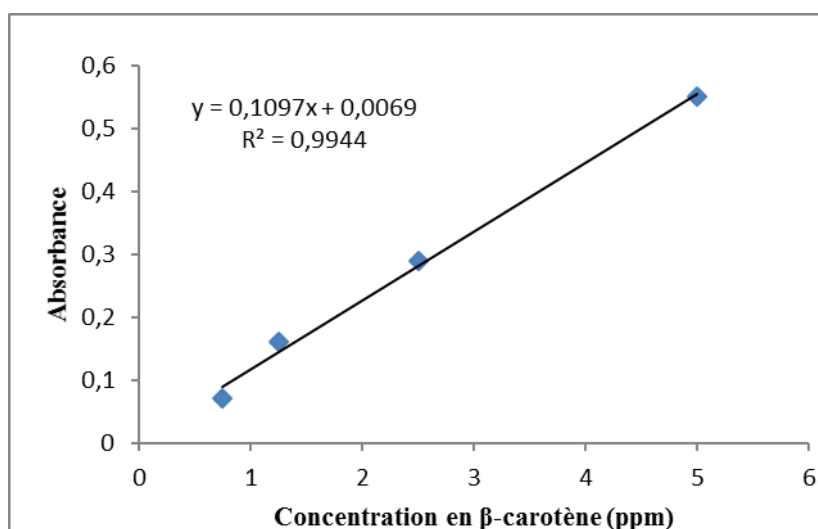


Figure 26: Droite étalon β-carotène ($\lambda = 470\text{nm}$).

Tableau 6 : Teneurs en caroténoïdes totaux de la courge (mg ECa/100g de courge fraîche) à différents stades de maturité.

Stade vert jeune	Stade vert immature	Stade mûr
0.117±0.10 mg	0.124±0.08 mg	0.415±0.19 mg

III.2.2. Variation qualitative et quantitative du profil en caroténoïdes de la courge en fonction du stade de maturation.

La teneur en caroténoïdes totaux a été déterminée par une méthode spectrométrique. La droite étalon est établie en utilisant le β-carotène comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent de β-carotène par 100 g de courge fraîche (mg ECa/100 g). L'équation de la droite étalon est $y = 0.109x + 0.006$ (fig.26) et le coefficient de corrélation $R^2 = 0.994$.

Le fractionnement par HPLC- PDA-ESI-MS des différents caroténoïdes de la courge

Cucurbita moschata récoltée à différents stades de maturation (vert jeune, vert immature et mûr) révèle 9 composés distincts (fig.27). Il s'agit de la néoxanthine, la cucurbitaxanthine A, la lutéoxanthine, la violaxanthine, la luteine, la zeaxanthine, l' α -carotène, le β -carotène et l'isomère *cis*- β -carotène.

Parmi ces composés, il y en a ceux qui ne sont pas représentés à certains stades de maturation car indétectables dans les conditions de l'expérience. C'est le cas de la néoxanthine aux stades vert immature et mûr, la violaxanthine au stade vert jeune et de l' α -carotène aux stades jeune vert et mûr (tableau 7).

Lee et *al.* (1984) avaient fractionné neuf caroténoïdes chez six variétés de courge d'hiver et avaient constaté que seul l' α -carotène y était présent à des concentrations appréciables, alors que les autres huit caroténoïdes n'étaient présents qu'à des concentrations inférieures à 1 $\mu\text{g} / \text{g}$.

De même, Arima et Rodriguez-Amaya (1988 ; 1990) avaient également détecté entre 14 et 19 caroténoïdes chez *C. moschata* et dont l' α -carotène et le β -carotène ont été les principaux. En revanche, l' α -carotène, la lutéine et la violaxanthine étaient les principaux caroténoïdes parmi les 15 caroténoïdes identifiés chez *C. maxima*. Par ailleurs, la lutéine et le β -carotène prédominaient parmi les 17 caroténoïdes identifiés chez *C. pepo*.

Malgré le grand nombre de caroténoïdes identifiés, il en y a seulement deux à quatre qui ont été détectés à des niveaux appréciables dans les différentes variétés de courge ; alors que les autres caroténoïdes étaient présents en très petites quantités ($< 3 \mu\text{g} / \text{g}$) ou bien à l'état de traces. Ces trois études ont toutes été effectuées par chromatographie sur colonne et mesure spectrophotométrique.

Matsuno et *al.* (1986) avaient isolé et élucidé par la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse les structures de deux nouveaux caroténoïdes chez *C. maxima*, et qu'ils avaient dénommé cucurbitaxanthine A et cucurbitaxanthine B.

Khachik et Beecher (1988), utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec une colonne C18 et une combinaison d'élution isocratique et de gradient d'élution, avaient séparé et identifié des caroténoïdes et des esters de caroténoïdes dans le

gland de courge *C. pepo* et dans trois variétés de courge *C. maxima*. Le profil chromatographique différait nettement entre les variétés bien que des mélanges complexes d'esters aient été observés. Ces auteurs avaient détecté seulement huit caroténoïdes.

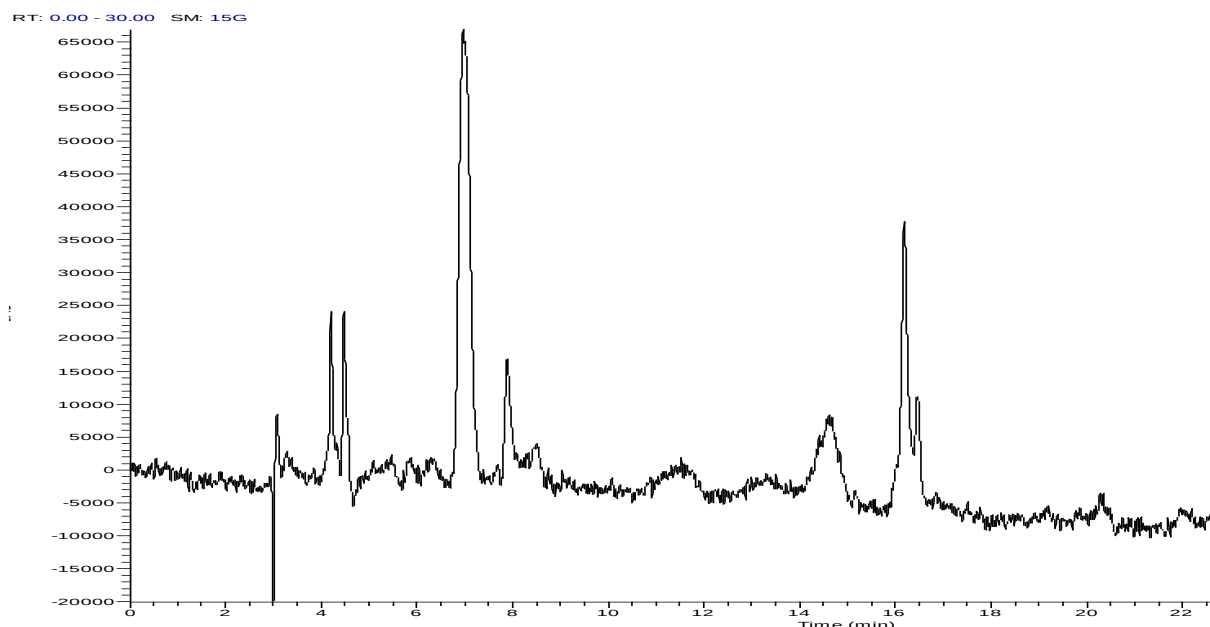


Figure 27: Chromatogramme type du fractionnement par HPLC- PDA-ESI-MS des différents caroténoïdes de la courge (*Cucurbita moschata*, D)

Identité des pics: 1: Néoxanthine, 2: cucurbitaxanthine A, 3: Lutéoxanthine, 4: Violaxanthine, 5: luteine, 6: Zeaxanthine, 7 : α -carotène 8 : β - carotène 9: Isomer *cis*- β -carotène

Selon une étude de Ganzález et *al.* (2001), la lutéine prédominait dans deux variétés de *C. maxima*, alors que l' α -carotène et le β -carotène étaient les principaux caroténoïdes d'une autre variété de cette même espèce. Ceci indique une variabilité variétale des caroténoïdes chez la courge.

Chez *C. pepo*, le β -carotène était le caroténoïde prédominant. Dix caroténoïdes ont

Tableau 7 : Différents caroténoïdes séparés et identifiés par HPLC-PDA-ESI-MS de *Cucurbita moschata* récoltée à trois différents stades de maturation

N° Pic	Temps de rétention RT (min)	Stade vert jeune	Stade vert immature	Stade mûr	Λ	[M-H] ⁺ *	Composés
1	4,09	40780	Absence	Absence	271 410 469	601,583	Neoxanthin
2	4,19	97948	127590	212969	263 437 473	584	cucurbitaxanthin A
3	4,47	61981	168850	54368	418 436 448	601 583	Luteoxanthin
4	4,55	Absence	98711	49159	416 441 470	601,583	Violaxanthin
5	6,94	537221	1131953	1280744	268 422 478	551 569	Lutein
6	7,86	130340	187724	162763	268 422 448 480	569	Zeaxanthin
7	14,62	Absence	499365	Absence	274 445 481	537	α -Carotene
8	16,19	402611	469497	625402	268 309 464	537	β -Carotene
9	16,47	97327	102627	153416	295 444 469	537	<i>cis</i> -Isomer of β -carotene

* [M-H]⁺: La forme ionique de la molécule

été identifiés dans une courge argentine *C.moschata*, mais seuls le β -carotène, l' α -carotène et la lutéine était quantifié. Murkovic et *al.* (2002) ont analysé un large éventail de courges et ont trouvé que les concentrations de caroténoïdes allaient de 0.6 à 74 $\mu\text{g} / \text{g}$ pour l' α -carotène, de 0 à 75 $\mu\text{g} / \text{g}$ pour le β -carotène, et de 0 à 170 $\mu\text{g} / \text{g}$ pour la lutéine.

Compte tenu de la variation qualitative et quantitative substantielle rapportée pour la composition en caroténoïdes des courges, plus de données sont nécessaires. Il est impératif de s'assurer que les caroténoïdes soient définitivement identifiés et que les variations quantitatives observées soient variétales (naturelles) et non dues à la variabilité analytique.

Pour ce qui est de l'aspect quantitatif, les différents caroténoïdes ont été évalués au stade mûr de la courge, car c'est à ce stade que l'on a détecté le maximum de caroténoïdes totaux (se référer au tableau 8).

Parmi les 9 caroténoïdes identifiés, la lutéine semble être la plus abondante avec une valeur de 16.47 $\mu\text{g/g}$ de courge fraîche au stade mûr, soit 40.07% du total des composés. Ensuite et dans un ordre quantitatif décroissant, il y a le β -carotène avec 13.54 $\mu\text{g/g}$ (soit 26.25%), la cucurbitaxanthin A avec 7.61 $\mu\text{g/g}$ (soit 18.51%), la lutéoxanthine avec 5.72 $\mu\text{g/g}$ (soit 10.46%) et la zéaxanthine avec 5.40 $\mu\text{g/g}$ (soit 4.70%) (tableau 8).

Tableau 8: Teneurs en différents caroténoïdes ($\mu\text{g/g}$) de la courge *Cucurbita moschata* récoltée à trois différents stades de maturation.

Différents Caroténoïdes	Quantité ($\mu\text{g/g}$)		
	Stade vert jeune	Stade vert immature	Stade mûr
Neoxanthin	3.65	/	/
Cucurbitaxanthin A	4.59	5.91	7.61
Luteoxanthin	4.88	5.56	5.72
Violaxanthine	/	5.43	4.20
Lutéine	10.48	12.76	16.47
Zéaxanthine	4.92	5.69	5.40
α -carotène	/	4.83	/
β -carotène	9.56	10.60	13.54
<i>cis</i> -Isomer of β -carotene	3.87	4.18	5.67
Total	41.95	54.96	58.61

Ce profil quantitatif reste quelque peu inférieur à celui rapporté par Pandey et *al.* (2003) pour la luteine (31.6%) ; mais supérieur par rapport à celui du β -carotène (13.7%).

Selon l'étude de Cristiane et *al.* (2007) menée sur plusieurs variétés de courge *C. moschata* au stade mûr, il y avait une prédominance du β -carotène et de l' α -carotène ; alors que la lutéine et la néoxanthine étaient respectivement les troisième et quatrième caroténoïdes majeurs. La violaxanthine n'a été détectée qu'à l'état de traces.

Kimura et *al.* (2007) ont trouvé que chez *C. moschata*, la teneur totale moyenne en

caroténoïdes augmente de 5.4 µg / g chez le fruit jeune à 79.6 µg / g dans le fruit mûr. Bien que la lutéine semble être le caroténoïde principal au stade immature, le β-carotène et l'α-carotène demeurent les caroténoïdes prédominants au stade de la maturité.

Par ailleurs, on sait aussi que la caroténogénèse se poursuit après la récolte à condition que le fruit ou le légume soit conservé intact. Ainsi, bien que les concentrations absolues diffèrent, le caroténoïde modèle est le même pour les fruits et légumes matures, qu'ils mûrissent sur l'arbre ou après récolte, mais ils ne doivent pas être abimés et doivent être gardés intacts (Kurz et al., 2008).

Par rapport aux travaux précédents sur les courges brésiliennes, les échantillons de fruits analysés dans cette étude semblent être plus mature et de maturité plus uniforme comme le reflète les résultats, bien que les valeurs moyennes pour le β-carotène (13.54µg / g) et l'α-carotène (4.83 µg / g) de *C. moschata* trouvées dans le présent travail se sont révélées plus faibles.

Les valeurs rapportées par Murkovic et al. (2002) se situent dans les larges plages obtenues (8.3-42.3 µg / g pour l'α-carotène et 14.1-79.3 µg / g pour le β-carotène). La concentration moyenne de β-carotène (15.4 µg / g) du fruit mature de *C. maxima* est légèrement comparable à la valeur précédente. Les teneurs de lutéine (16.47 µg / g) chez la courge *C. moschata* étudiée dans ce travail sont plus d'une fois et demi supérieures à celles de chez *C. pepo* (10.7 µg/g).

Selon l'étude de Murillo et al. (2010) sur le contenu en caroténoïdes de 10 fruits au stade mûr de légumes cultivés en Panama ; le fruit ayant la plus forte teneur en caroténoïdes était la courge *C. moschata* (173 µg / g), qui présentait également la teneur en lutéine (81.7µg /g) la plus élevée en comparaison avec celles de la carotte *Daucus carota* (3.6 µg/g), du piment orange *Capsium annuum* (7.9 µg/g), de la tomate *Solanum lycopersicum* (3.4 µg/g) ou encore du brocoli *Brassica oleracea* (1.4 µg/g).

Par ailleurs, d'autres études sur la courge (Azevedo-Meleiro et Rodriguez-Amaya, 2007; Murkovic, Mülleder et Neunteufl, 2002) ont souligné la relation entre la teneur en caroténoïdes de ce fruit et certains facteurs liés au stade végétatif de la plante et au

génotype de l'espèce.

Les courges pourraient être récoltées sur une large gamme de maturité et peuvent être stockées pour une longue période; ainsi, une variation substantielle des taux de caroténoïdes de ces fruits proposés à la vente peuvent être attendus. Il est bien établi que la maturation de caroténogènes de fruits et légumes se répercute sur une biosynthèse accrue des caroténoïdes (Kimura et *al.*, 2007).

Trois différentes espèces (*Cucurbita pepo*, *C. maxima*, *C. moschata*) et une variété issue du croisement de *C. maxima* et *C. moschata* ont été analysées par Murkovic et *al.* (2002) qui ont rapporté que la gamme des teneurs des trois caroténoïdes identifiés. Les seuils de détection ont été de 0.6 µg /g et de 74 µg /g pour le β-carotène chez *C. pepo* et *C. maxima* respectivement ; de 75 µg /g pour l'α-carotène chez *C. maxima* et de 170 µg /g pour la lutéine chez *C. pepo*.

Chez la plupart des variétés de courge, le β-carotène était le caroténoïde le plus abondant, excepté le cas de *C. maxima* où c'était l'α-carotène qui prédominait. Les variétés de *C. maxima* ont montré une teneur beaucoup plus élevée en lutéine. La variété issue du croisement de *C. maxima* et *C. moschata* s'est révélée également remarquablement riche en lutéine (120 µg /g).

III.3. Propriétés biologiques des polyphénols et des caroténoïdes de courge

III.3.1. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des polyphénols et des caroténoïdes de courge (*Cucurbita moschata*) a été déterminé avec deux tests : DPPH et ABTS. Les résultats sont reportés dans les tableaux 9 et 10 et les droites étalons sont représentées dans les figures 28 et 29.

Les résultats obtenus indiquent que les caroténoïdes extraits de la courge récoltée aux trois différents stades de maturation du fruit exercent un plus grand pouvoir antioxydant que celui des polyphénols quelque soit le test utilisé, DPPH ou ABTS.

L'activité anti-radicalaire des différents extraits a été évaluée par le test au DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le

Tableau 9 : Pouvoir antioxydant des polyphénols de courge
(μM trolox équivalent/ g de courge fraîche).

	DPPH (μM trolox équivalent/ g de courge fraîche)	ABTS (μM trolox équivalent/ g de courge fraîche)
Stade vert jeune	0.048 $\pm$ 0.005	0.055 $\pm$ 0.003
Stade vert immature	0.053 $\pm$ 0.008	0.067 $\pm$ 0.048
Stade mûr	0.065 $\pm$ 0.010	0.074 $\pm$ 0.021

Tableau 10 : Pouvoir antioxydant des Caroténoïdes de courge
(μM trolox équivalent/ g de courge fraîche).

	DPPH (μM trolox équivalent/g de courge fraîche)	ABTS (μM trolox équivalent/g de courge fraîche)
Stade vert jeune	2.128 $\pm$ 0.029	3.04 $\pm$ 0.003
Stade vert immature	3.239 $\pm$ 0.002	4.74 $\pm$ 0.007
Stade mûr	5.617 $\pm$ 0.005	6.491 $\pm$ 0.005

criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et *al.*, 2008).

Cependant, cette activité semble être légèrement surévaluée par la méthode de piégeage du radical ABTS et ceci pourrait être lié, d'une part à la meilleure solubilité de l'ABTS dans les solutions aqueuses et dans les solvants organiques et, d'autre part à sa plus rapide réactivité par rapport au DPPH.

En effet, si nous considérons l'activité anti radicalaire des polyphénols, le rapport entre la capacité de piégeage de l'ABTS et celle de réduction du radical DPPH est supérieur à l'unité ; et il est de l'ordre de 1.14, 1.26 et 1.38 pour la courge récoltée respectivement aux stades vert jeune, vert immature et mûr.

Le pouvoir antioxydant des polyphénols de courge évolue au cours du développement de la plante car il augmente au fur et à mesure que le fruit mûrit. Les valeurs du test DPPH passent de 0.048 à 0.065 μM trolox équivalent/ g de courge fraîche entre le stade vert jeune et celui de mûr avec une valeur médiane (0.053 μM trolox équivalent/ g de courge fraîche) au stade intermédiaire de vert immature.

Le même constat peut être fait au niveau des valeurs du test ABTS où la capacité de piégeage de ce radical par les polyphénols de courge passe de 0.055 au stade vert jeune à 0.074 μM trolox équivalent/ g de courge fraîche au stade mûr avec une valeur médiane de 0.067 au stade vert immature.

Ces observations nous ramènent à considérer que le pouvoir antioxydant des polyphénols de chair de courge augmente avec la progression de la maturation du fruit. Deng et *al.* (2012) ont évalué la capacité antioxydante via le test ABTS des composés phénoliques de 56 légumes parmi lesquels ceux de la courge *C. moschata* récoltée à deux stades végétatifs différents, vert jeune et mûr. Ils ont trouvé que les polyphénols de courge exprimaient une activité anti radicalaire de l'ordre de 0.38 ± 0.03 μM trolox équivalent/g courge fraîche récoltée au stade mûr et de 1.09 ± 0.05 μM trolox équivalent/g de courge fraîche récoltée au stade vert jeune ; ce qui donne un rapport d'activité antioxydante égal à

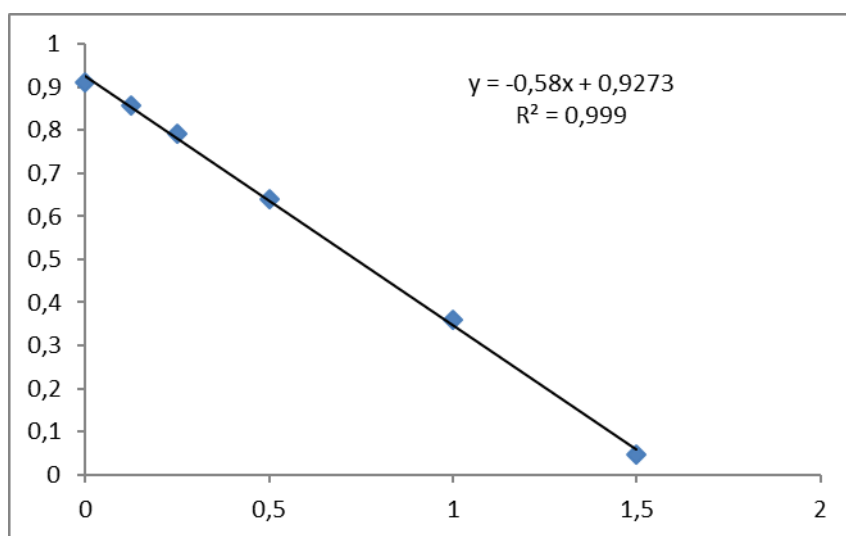


Figure 28: Droite étalon de trolox dans le test de DPPH

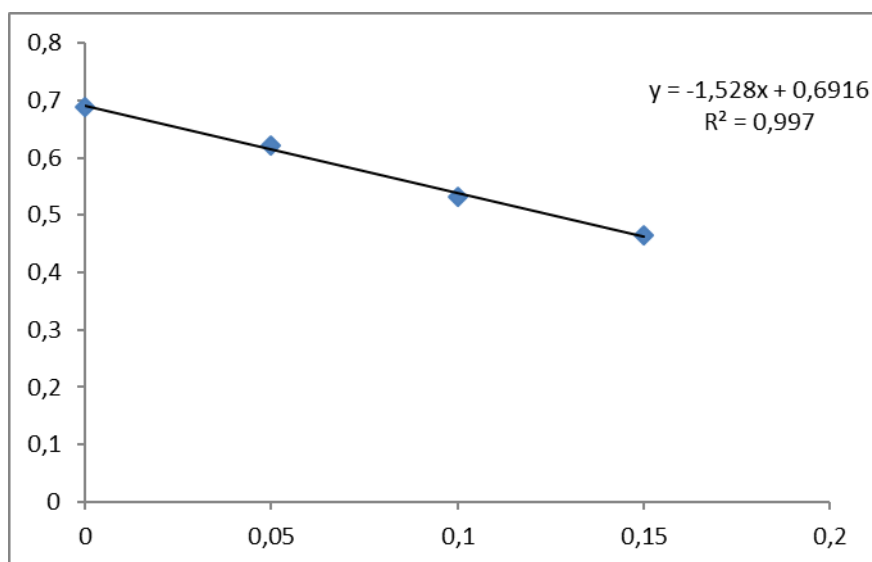


Figure 29 : Droite étalon de trolox dans le test ABTS

fraîche récoltée au stade vert jeune ; ce qui donne un rapport d'activité antioxydante égal à 2.87 en faveur des polyphénols issus du stade vert jeune.

L'interprétation de ces observations par ces auteurs attribue cette plus forte capacité antioxydante des extraits de courge de stade végétatif vert jeune à la différence dans le contenu phénolique des extraits qui sont moins riches en composés phénoliques au stade mûr.

D'autres auteurs, comme Azizah et al. (2009), ont évalué le pouvoir de piégeage du radical DPPH par des fractions de polyphénols et de caroténoïdes extraites de courge mûre ; ils ont obtenu des taux de réduction de ce radical qui avoisinent les 50%.

Yamaguchi et al. (2001) s'étaient penché sur l'effet de la cuisson de la courge fraîche sur son activité antioxydante et avaient constaté que la chaleur induisait une perte significative de cette activité qui passait de 78.4 ± 1.7 % dans la courge fraîche à 59.9 ± 1.9 % dans la courge cuite.

Selon une étude menée par Bhandari et Lee (2016) sur la capacité antioxydante de la tomate (*Solanum lycopersicum*) au cours des stades de maturation et la corrélation entre les polyphénols totaux et le processus de maturation. Leurs résultats indiquent que chaque composé antioxydant possède un modèle d'accumulation et de dégradation au cours du processus de maturation.

La tomate présentait des teneurs en phénols totaux de 2978.8 µg EAG /g de tomate fraîche et en flavonoïdes totaux de 2733.3 µg QE /g de tomate fraîche. La tomate apparaît comme une très bonne source en substances phénoliques qui seraient responsables de sa haute capacité antioxydante évaluée à 25.524 µmol TE /g tomate fraîche (Bhandari et Lee, 2016).

Ces derniers auteurs soulignent qu'au cours du processus de maturation, une forte corrélation positive s'installe entre les composés phénoliques et les flavonoïdes d'une part et une activité antioxydante, d'autre part. Ils concluent que la maturation chez les fruits et légumes s'accompagne d'une augmentation progressive de divers composés antioxydants

dans une certaine mesure qui se répercute sur l'augmentation concomitante de l'activité antioxydante.

Dans la présente étude, il a été constaté que tous les extraits de caroténoïdes de courge récoltée à trois stades végétatifs différents (vert jeune, vert immature et mûr) exercent une activité antioxydante directement proportionnelle à la quantité de caroténoïdes présente dans le fruit.

L'extrait de caroténoïdes de courge de stade mûr présentait le plus haut niveau d'activité antioxydante mesurée avec le test ABTS ($6.491 \pm 0.005 \mu\text{M TE/g}$), suivi par ceux des stades jeune immature ($4.74 \pm 0.007 \mu\text{M TE/g}$) et vert jeune ($3.04 \pm 0.003 \mu\text{M TE/g}$), respectivement (tableau 10).

Dans ce cas d'évaluation de l'activité anti radicalaire des caroténoïdes, il est à remarquer que le test ABTS donne des valeurs plus élevées que le test DPPH et par conséquent rend mieux compte du potentiel antioxydant que recèle la courge.

Le fruit de *C. moschata*, ainsi que sa graine sont connus pour être efficaces dans le traitement de certaines maladies, y compris le diabète sucré et l'arthrite rhumatismale (Mia-Isabelle et *al.*, 2010).

Les propriétés pharmacologiques de l'extrait de courge ont suscité l'intérêt des scientifiques qui ont cherché à en tirer des bénéfices santé.

Dans cette optique, Chanwitheesuk et *al.* (2005) ont rapporté que les composés typiques possédant une activité antioxydante chez la famille des Cucurbitaceae, notamment chez l'espèce *C. moschata* étudiée, ont été identifiés comme étant les vitamines C et E, les caroténoïdes et les composés phénoliques.

Une corrélation entre la teneur en carotènes totaux et l'indice antioxydant a été trouvée chez les Cucurbitaceae (*C. moschata*) avec une valeur de $2.91 \pm 0.03 \mu\text{M TE/g}$ avec le test au DPPH (Bouayed et Bohn, 2016). Cependant, il peut être observé que la quantité de xanthophylles totales dans le groupe de famille étudiées ait montré une corrélation avec l'indice antioxydant dans de nombreuses familles (Araliaceae, Cucurbitaceae, Légumineuses, Pipéracées et Ombellifères) (Chanwitheesuk et *al.*, 2005).

Dans une étude de Mia-Isabelle et *al.* (2010) sur le profil antioxydant de quelques végétaux communs tels que les épinards, chou frisé, coriandre, courge musquée, feuilles de patate douce, laitue chinoise, cresson, épinard rouge, chou fleuri et la ciboule ; il a été constaté qu'ils recèlent des teneurs élevées en caroténoïdes (plus de 90 mg ECa / 100g de poids frais). La plus forte activité antioxydante (3.91 μ M TE/g), déterminée via le test ABTS a été enregistrée avec les extraits de la courge musquée (*C. moschata*).

De nombreux autres travaux de recherche (González et Ancos, 2000 ; Venskutonis et Beek, 2004 ; Miranda et *al.*, 2000 ; Zainol et *al.*, 2003 ; Zielinski et Kozłowska, 2000) ont été consacrés à la mise en évidence et à la caractérisation de caroténoïdes naturels dans les fruits et les légumes potentiellement antioxydants.

Par ailleurs, plusieurs auteurs (Larson, 1988 ; Rice-Evans et Miller, 1996 ; Locke et Vivanco, 2003) s'accordent pour souligner le rôle de nombreux autres composés comme antioxydants potentiels de plantes supérieures (par exemple, vitamines C et E, caroténoïdes, dérivés de la chlorophylle, alcaloïdes, flavonoïdes, acides phénoliques et autres phénols).

Les caroténoïdes et les composés phénoliques présents dans les plantes sont largement décrits dans la littérature comme de bons antioxydants naturels dont l'effet peut être synergique (Wangcharoen et Morasuk, 2007).

Les caroténoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques qui sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes. Ils sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (Fuhrman et *al.*, 1995).

D'autres études (Hanasaki et *al.*, 1994; Cos et *al.*, 1998) ont également montré que les caroténoïdes sont de bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la zéaxanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde.

Les caroténoïdes et les polyphénols sont également connus pour modifier les

activités des enzymes comme la protéine kinase C, la protéine tyrosine kinase, aldose-réductase, la myéloperoxydase, la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la phospholipase, la transcriptase inverse, l'ornithine décarboxylase, lipoxygénase et la cyclooxygénase (Kohlmeier et Hastings, 1995).

Certaines de ces enzymes sont impliquées dans les fonctions immunitaires, la cancérogenèse, les transformations cellulaires, la croissance tumorale et les métastases. La propriété antioxydante et la modification de l'action enzymatique des caroténoïdes et des polyphénols illustrent clairement leurs propriétés pharmacologiques (Santos et *al.*, 1998).

L'activité antioxydante de ces composés dépend des facteurs suivants: la réactivité (agents donneurs de protons H^+ et d'électrons), la stabilité du radical formé, la réactivité avec d'autres antioxydants, la capacité de coordonner les métaux de transition, et l'interaction et la solubilité avec les membranes (Barreiros et *al.*, 2006).

L'action antioxydante de ces phytonutriments ne se manifeste non seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, mais aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques impliqués dans la production des espèces réactives oxygénées (Cotelle, 2000).

Le nombre de groupes hydroxyles phénoliques peut jouer un rôle important dans l'activité de piégeage des radicaux libres (Van Acker et *al.*, 1993; Justino et *al.*, 2004). Les publications à ce sujet montrent que les composés hydroxyles des flavonoïdes dans la position ortho-aromatique, comme la quercétine, ont une activité antioxydante contre les ROS (Soobrattee et *al.*, 2005).

En présence d' H_2O_2 , par exemple, des composés phénoliques tels que l'orthoquinol subissent une réaction de réduction qui donne naissance à des ortho-quinones et de l'eau en tant que produits de réaction (Dewick, 2002; Soobrattee et *al.*, 2005).

Pour une bonne activité de piégeage de flavonoïdes, un groupement catéchol sur le noyau B est nécessaire. Le groupement OH-3 peut fonctionner comme un site de chélation et peut également être oxydé. Le groupe 3-OH, en combinaison avec une double liaison C2-C3 augmente l'activité du piégeage (Van Acker et *al.*, 1996).

Les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres responsables de dommages à l'ADN et à la promotion de la tumeur. Leur activité anti-cancérigène s'exprime par de multiples mécanismes, comme l'activation et l'amélioration des activités des enzymes antioxydantes ou l'inhibition de certaines enzymes telles que la P-450 dans le foie (Olinski et *al.*, 2002 ; Marchand, 2002).

Les polyphénols sont aussi capables de capturer les radicaux OH car ce sont d'excellents agents réducteurs. L'étude réalisée par Zhao et *al.* (2005) rapporte que le verbascoside est capable d'inhiber la peroxydation lipidique par la chélation des ions ferreux et le piégeage du radical hydroxyle. De plus en plus de chercheurs s'accordent sur le fait que les polyphénols protègent les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs et, par conséquent, contribuent à limiter le risque de diverses maladies dégénératives associées au stress oxydatif (Luqman et Rizvi, 2006 ; Pandey et Rizvi, 2009).

III.3.2. Activité antimicrobienne des extraits phénoliques du fruit de *Cucurbita moschata*

III.3.2.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits phénoliques de la courge *Cucurbita moschata* récoltée aux trois différents stades végétatifs (vert jeune, vert immature et mûr) vis-à-vis d'une gamme de neuf souches pathogènes (*E. hirae* ATCC 10541, *P. mirabilis* ATCC 13315, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. dysenteriae* sp isolée au LMBAFS, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ATCC 7644 et *S. typhimurium* ATCC 13311) et de deux souches bénéfiques (*B. animalis* sbsp *lactis* Bb12 et *L. rhamnosus* LBRE-LSAS) a été déterminée.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition obtenus sont représentés dans le tableau 11. Les extraits phénoliques des fruits exercent un effet inhibiteur sur les bactéries pathogènes d'une manière différente selon le stade de récolte de la courge.

En effet, l'activité inhibitrice de ces extraits génère des diamètres d'inhibition qui varie d'un minimum de 3 mm pour *S. typhimurium* ATCC 13311, inhibée par un extrait phénolique de courge de stade mûr, à un maximum de 12 mm pour *S. aureus* ATCC

29213, inhibée par un extrait phénolique de courge de stade vert immature. Les souches probiotiques Bb12 et LBRE-LSAS semblent être résistantes vis-à-vis tous les échantillons testés vu qu'aucune zone d'inhibition n'a été obtenue.

Ainsi, il apparaît que les extraits phénoliques de courge récoltée au stade mûr ont une activité antibactérienne modérée qui s'est manifesté par des diamètres de zones d'inhibition allant de 3 ± 0 à $9.75 \text{ mm} \pm 0.4 \text{ mm}$. C'est à ce stade aussi que la quantité de polyphénols et de flavonoides mesurée est la plus faible.

En revanche, les stades jeunes, vert et vert immature, ont montré une meilleure activité antibactérienne avec des diamètres de zones d'inhibition qui varient de 4.16 ± 0.32 à $10.66 \pm 0.60 \text{ mm}$ et de 5 à 12 mm, respectivement.

Les extraits phénoliques qui ont l'activité antimicrobienne la plus élevée sont ceux de la courge récoltée au stade vert immature et c'est le stade auquel il y a le plus de polyphénols et de flavonoides

Cette activité d'inhibition des germes pathogènes apparaît comme étant corrélée avec la teneur en polyphénols et en flavonoides totaux de chaque stade de récolte de la courge.

La souche bactérienne la plus sensible et qui a marqué les plus grandes zones d'inhibition aux stades vert immature (12 mm) et vert jeune (10.66 mm) est *S. aureus* ATCC 29213. Cette forte sensibilité de *S. aureus* aux extraits phénoliques de courge se traduit par la plus faible CMI ($0.75 \text{ } \mu\text{g/mL}$) par rapport aux autres souches pathogènes.

La souche *S. dysenteriae* est également sensible car elle affiche des zones d'inhibition de diamètres égaux à $9.10 \pm 1.26 \text{ mm}$ et à $5.66 \pm 0.54 \text{ mm}$ sous l'effet des extraits phénoliques de courge de stades vert immature et vert jeune, respectivement. Ce niveau d'inhibition lui confère une CMI de $1.25 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

L'inhibition d'*E. coli* par les extraits phénoliques de courge aux stades vert immature et vert jeune s'est manifestée par des zones d'inhibition de diamètre de 8.33 ± 0.87 et de 6

± 0 , respectivement. En revanche, parmi les bactéries pathogènes testées, celle qui a montré le plus de résistance vis-à-vis les extraits de courge est *S. typhimurium* dont les diamètres des zones d'inhibition générées sont de 5 ± 0 ; 4.5 ± 3.39 et de 3 ± 0 mm obtenus avec les extraits phénoliques des trois stades, vert immature, vert jeune et mûr. La CMI pour cette bactérie est la plus élevée ; elle est de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Dans un ordre de grandeur de résistance décroissant (exprimé en diamètre de zone d'inhibition en mm) obtenu respectivement avec les extraits phénoliques de courge aux stades jeune vert, vert immature et mûr, se classent *P. mirabilis* ATCC 13315 (4.16 ± 0.32 ; 5.33 ± 0.50 et 3.33 ± 1.25 mm), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (4.75 ± 2.57 ; 6.0 ± 0.0 et 3.50 ± 0.50 mm), *B. subtilis* ATCC 66334 (5.0 ± 0.0 ; 6.25 ± 0.25 et 3.75 ± 0.89 mm) et enfin *L. monocytogenes* ATCC7644 (5.0 ± 0.0 ; 6.58 ± 2.02 et 4.0 ± 0.0 mm).

Les deux souches bactériennes bénéfiques, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 et *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS, se sont avérées insensibles aux extraits phénoliques de la courge, et ceci quelque soit le stade de récolte du fruit.

Les niveaux des diamètres des zones d'inhibition de germes pathogènes obtenus dans le présent travail restent légèrement inférieurs à ceux rapportés par Qian (2014) et Cueva et al. (2010) à propos de l'activité antibactérienne de l'extrait de polyphénols de *Cucurbita moschata* vis-à-vis de *Bacillus subtilis* (9.78 mm), *Staphylococcus aureus* (13.21 mm) et d'*Escherichia coli* (11.36 mm).

Le même constat peut être fait lorsqu'on compare nos résultats à ceux de Kamarudin et al. (2014) et Wan et al. (2012) qui rapportent des taux d'inhibition de bactéries pathogènes par des extraits de courge *Curcubita moschata* plus élevés.

Ces auteurs ont exploré le potentiel antibactérien *in vitro* de trois extraits (extrait de dichlorométhane ou DCM, extrait méthanolique ou MEOH et extrait aqueux) du fruit de *Curcubita moschata* (courge tropicale) au stade mûr contre des bactéries pathogènes pour l'homme. Ils ont testé la sensibilité des bactéries à Gram positif (*B. cereus*, *E. faecalis* et *S. aureus*) et des bactéries à Gram négatif (*B. cepacia*, *P. aeruginosa*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et *E. coli*) par la méthode de diffusion sur disque.

Tableau 11: Diamètres des zones d'inhibition (mm) et concentration minimale inhibitrice (CMI en µg/mL) obtenus avec les différentes souches.

Souches bactériennes	Zones d'inhibition en mm selon le stade de récolte de la courge			CMI (µg/mL)
	Stade vert jeune	Stade vert immature	Stade mûr	
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	6±0	7.16±0.38	4±0	2.5
<i>P. mirabilis</i> ATCC 13315	4.16±0.32	5.33±0.50	3.33±1.25	5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	5±0	6.25±0.25	3.75±0.89	5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4.75±2.57	6±0	3.5±0.5	5
<i>S.dysenteriae</i> sp (isolée au LMBAFS)	5.66±0.54	9.10±1.26	5.5±0.81	1.25
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	10.66±0.60	12±0	9.75±0.4	0.75
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6±0	8.33±0.87	5.25±0.64	1.25
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	5±0	6.58±2.02	4±0	2.5
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	4.5±3.39	5±0	3±0	5
<i>B. animalis</i> sbsp <i>lactis</i> Bb12	-	-	-	
<i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS (collection LMBAFS)	-	-	-	

* Pour les résultats du test négatif (DMSO), le diamètre de la zone d'inhibition est 00.00 mm.

Ils ont noté que le niveau d'inhibition dépendait du solvant d'extraction et de la nature de la souche considérée. L'activité antibactérienne la plus forte vis-à-vis de *S. aureus*, *B. cereus* et de *P. aeruginosa* a été respectivement observée avec les extraits DCM, MEOH et aqueux de *Curcubita*.

Ces auteurs rapportent que les différents extraits exerçaient une activité antibactérienne relative contre la plupart des bactéries testées avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 7 à 21mm.

Par ailleurs, Abd EI-Aziz et Abd EI-Kalek (2011) ont rapporté que l'extrait méthanolique de graines de *C. moschata* inhibait *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoni* ; mais n'avait pas d'effet sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats de cette étude sont similaires à ceux de Badr et *al.* (2013) qui ont constaté que des extraits de *C. pepo* inhibaient modérément des bactéries à Gram positif comme *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* avec des diamètres de zones d'inhibition de 5 et 4.75 mm, respectivement.

En utilisant la même méthode de diffusion sur disque, Muruganantham et *al.* (2016) ont mis en évidence une activité antibactérienne des extraits d'acétate d'éthyle du fruit de *C. maxima* vis-à-vis de *S. typhi* (5 mm), *E. coli* (13 mm), *E. faecalis* (11 mm) et de *B. cereus* (13 mm).

Les valeurs de CMI qui ont été déterminées dans une étude réalisée par Luciano-Montalvo et *al.* (2013) pour une panoplie d'autres plantes qui ont montré une activité inhibitrice sont: *G. barbadense* (le cotonnier) contre *S. aureus* et *S. saprophyticus* (0.5 µg/mL, 0.75 µg/mL), avec *T. ananassae* (plante vivace appelée Rose de Malaisie) (0.5, 0.5, 0.015 et 2.0 µg/mL) contre *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. aureus* et *S. saprophyticus* respectivement, avec *P. calomelanos* (Fougère) (2.0 µg/mL) contre *P. aeruginosa*.

Qian (2013) a rapporté que l'extrait de polysaccharides de *Cucurbita moschata* avait une activité antibactérienne élevée contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli* à la concentration

de 100 µg/mL. De même, Li et Fu (2005) ont à rapporté que les polysaccharides de courge pourraient efficacement inhiber la croissance de *E. coli*.

Prises ensemble, ces observations sont en faveur de l'utilisation de la courge comme source potentielle en principes actifs naturels exploitables dans les industries agro-alimentaire, pharmaceutique ou encore cosmétique.

En général, dans la plupart des études, les extraits de plantes ont montré que les souches à Gram positif sont considérées comme plus sensibles aux agents antibactériens par rapport aux souches à Gram négatif en raison de différences dans la structure de la paroi cellulaire (Ahmed et Beg, 2001).

Les souches Gram négatif possèdent une membrane phospholipidique externe portant les composants structurels du lipopolysaccharide. Ainsi, cela rend la paroi cellulaire imperméable aux substances chimiques antibactériennes. Par rapport à la souche Gram positive, la membrane contient une couche externe de peptidoglycane qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (Nikaido, 2003). L'efficacité antibactérienne d'un composé phénolique dépend de ses propriétés physico-chimiques et de l'hétérogénéité de sa structure (Basli et *al.*, 2012).

D'après les résultats obtenus sur l'activité antibactérienne des extraits phénoliques de courge *C. moschata*, il apparaît que certains extraits ont induit une activité antibactérienne modérée liée à la nature des différents composés phénoliques présents. À titre d'exemple, l'acide caféique n'est efficace que contre certaines bactéries (Brantner et *al.*, 1996) ; alors que la quercétine exerce une activité antibactérienne contre presque toutes les bactéries responsables des problèmes respiratoires, gastro-intestinaux et urinaires (Rigano et *al.*, 2006).

Etant donné que l'activité antibactérienne des extraits de plantes est due à la présence de différents constituants chimiques, la variation de la composition chimique des tissus de ces plantes en raison de leur progression dans le stade végétatif ou de tout autre facteur l'influant, pourrait expliquer les fluctuations observées dans cette propriété antibactérienne

de ces extraits. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action synergique de différents composés (Essawi, 2000).

Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, sont reconnus pour leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de la toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases et carbohydrases) et autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et l'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

En outre, leur activité antibactérienne est probablement due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires et les protéines solubles et de former un complexe avec les parois des cellules bactériennes qui provoque une perturbation de l'activité membranaire normale de la bactérie (Tsuchiya et al., 1996).

Dans une étude sur l'action antimicrobienne de la propolis, Mirzoeva et al. (1997) ont montré que les flavonoïdes et la quercétine provoquent une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne interne et une perturbation du potentiel membranaire. S'agissant de la même substance, Boufadi et al. (2016) avaient rapporté que les CMI des flavonoïdes de propolis étaient faibles par rapport à celles des polyphénols dans l'inhibition de la croissance de germes pathogènes comme *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Par ailleurs, Salvatore et al. (1998) ont rapporté que le « flavanone lonchocarpus A » inhibe la synthèse macromoléculaire chez *Bacillus megaterium*, et que la synthèse de l'ARN, de l'ADN, des constituants de la paroi cellulaire et des protéines ont été toutes inhibées.

Mori et al. (1987) ont montré que la synthèse de l'ADN est fortement inhibée par les flavonoïdes chez *Proteus vulgaris* ; tandis que la synthèse de l'ARN est la plus touchée chez *S. aureus*. Les flavonoïdes présentant cette activité sont la robinétine, la myricétine et l'épigallocatechine. La synthèse des protéines et des lipides est également touchée.

Ces auteurs suggèrent que le noyau B des flavonoïdes peut jouer un rôle dans l'intercalation ou une liaison hydrogène avec les empilements des bases d'acide nucléique et que ceci peut expliquer une action inhibitrice sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN.

Plus récemment, Plaper et *al.*, (2003) ont indiqué que la quercétine se lie à la sous-unité Gyr B d'*E.coli* et l'ADN gyrase inhibe l'activité de l'enzyme ATPase.

Dans une étude bibliographique, Scalbert (1991) a énuméré 33 études rapportant les activités inhibitrices des flavonoides et selon lesquelles, les flavonoides peuvent être toxiques pour les bactéries, ainsi que pour les champignons filamenteux et les levures.

Dans cette partie de notre étude, il a été démontré que la courge *Cucurbita moschata* recèle des composés capables d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes communément impliquées dans les toxi-infections. L'activité antimicrobienne de ces composés est variable selon le stade végétatif de récolte de la courge.

III.3.3. Activité anti-inflammatoire des extraits de polyphénols et de caroténoïdes de courge *Cucurbita moschata*.

III.3.3.1. Effet anti-inflammatoire in vitro des extraits de polyphénols et de caroténoïdes.

III.3.3.1.1. Effet sur l'inhibition de la dénaturation protéique

L'effet préventif des extraits de polyphénols et des extraits de caroténoïdes de la courge *C. moschata* récoltée au stade mûr a été étudié en utilisant le test de l'inhibition de la dénaturation de la sérum-albumine bovine (BSA).

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de ces phytonutriments sont résumés dans le tableau 12. Les caroténoïdes et les polyphénols de courge présentaient une bonne protection contre la dénaturation des protéines, mais l'effet des caroténoïdes était plus marqué.

L'inflammation est considérée comme un mécanisme de défense physiologique primaire qui aide le corps à se protéger lui-même contre différents stimuli. La dénaturation des protéines tissulaires est l'un des sujets les mieux documentés en raison de sa relation avec les maladies inflammatoires et arthritiques. Les enzymes lysosomâles libérées pendant l'inflammation produisent une variété de désordres. L'activité cellulaire supplémentaire de ces enzymes est considérée comme liée à l'inflammation aiguë ou chronique (Leelaprakash et MohanDass, 2011).

L'inflammation est un processus complexe, souvent associé à la douleur et impliquant

Tableau 12: Effet des polyphénols et des caroténoïdes de la courge *Cucurbita moschata* récoltée au stade mûr sur l'inhibition de la dénaturation protéique.

	Concentration (µg/mL)	% d'inhibition
Extrait de Carotenoides	50	37.4±1.83
	100	39.16±1.34
	250	45.32±0.24
	500	52.09±0.68
	1000	66.17±0.26
Extrait de Polyphénols	50	30.78±1.09
	100	33.27±1.10
	250	39.10±1.00
	500	41.56±0.77
	1000	53.88±0.50
Ibuprofen	50	58.04±0.25
	100	68.11±0.19
	250	74.91±0.32

des phénomènes tels que: l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'augmentation de la dénaturation des protéines et l'altération de la membrane cellulaire (Leelaprakash et MohanDass, 2011).

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par action de contraintes externes ou d'un composé, tel qu'un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou de la chaleur. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées. La dénaturation des protéines est une cause bien connue de l'inflammation (Leelaprakash et MohanDass, 2011; Ingle et Patel, 2011).

Le traitement de la protéine BSA avec la plus faible concentration (50 µg / mL) de polyphénols et de caroténoïdes de *C. moschata* a entraîné une inhibition modérée de sa dénaturation thermique (30 et 37%, respectivement), tandis que l'effet du standard ibuprofène, était plus important (58%). Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique de la sérum Albumine bovine par les extraits de courge est dose-dépendant. Le traitement de la protéine avec la concentration la plus élevée (1000 µg/ mL) de polyphénols et de caroténoïdes induisait respectivement 53 et 66% d'inhibition. L'inhibition de la dénaturation des protéines a été prise comme mesure de l'activité anti-arthritique *in vitro*. La production d'auto-antigène dans certaines maladies arthritiques peut être due à la dénaturation protéique (Umapathy et *al.*, 2010).

Les taux d'inhibition de la dénaturation protéique obtenus dans le présent travail sont quelque peu inférieurs à ceux rapportés par Bougandora et *al.* (2016) avec l'extrait de *Cistanche violacea* (plante saharienne). En effet, ces auteurs ont utilisé des concentrations d'extrait de cette plante comprises entre 400 et 600 µg / mL et ont obtenu des taux d'inhibition de la dénaturation de la BSA compris entre 62.05 et 68.09 %. Le taux d'inhibition le plus élevé (80.91%) a été observé avec le standard, le dichlofénac de sodium, à une concentration de 200 µg / mL

Selon l'étude menée par Leelaprakash et MohanDass (2011) qui ont utilisé l'extrait d'une plante vivace de l'Inde, *Enicostemma Axillare*, à une concentration de 500 µg / mL,

la dénaturation thermique de la BSA était inhibée à 71% ; alors que l'aspirine, utilisée comme anti-inflammatoire standard à la concentration de 100 µg / mL, a inhibé cette dénaturation à 68%.

Les espèces oxygénées réactives (ROS) pourraient provoquer une inflammation, et plusieurs études *in vitro* sur l'inflammation ont montré que les caroténoïdes comme le β-carotène, le lycopène et la lutéine ont été en mesure de réduire la production de ROS (Bouayed et Bohn, 2010).

Le lycopène a été suggéré comme un puissant composé pour diminuer les ROS et moduler les réactions redox sensibles des cellules cibles comprenant les protéines tyrosine phosphatases, protéines kinases et facteurs de transcription (Palozza et *al.*, 2012). Par exemple, le lycopène à 2 µg/ mL a pu réduire l'effet de la fumée sur les voies moléculaires impliquées dans l'inflammation, la prolifération cellulaire et l'apoptose, ainsi que sur les substances activant les enzymes cancérogènes (Palozza et *al.*, 2012).

Dans une autre étude réalisée par Simone et *al.* (2011), le lycopène utilisé à une concentration de 2 µg / mL a significativement réduit de 60% le taux des ROS chez l'homme stimulées par la fumée de cigarette.

La lutéine (20 µg/ mL) et le β-carotène (20 µg/ mL) ont induit une réduction significative de 20% et 10%, respectivement, des ROS dans des cellules après stimulation avec H₂O₂ (Kim et *al.*, 2011). De même, le β-carotène à 10 et 20 µg/ mL réduit significativement les ROS dans les cellules après stimulation par *Helicobacter pylori* (Jan et *al.*, 2009).

III.3.3.1.2 Effet sur la stabilisation membranaire des hématies (HRBC).

À la suite d'une réponse inflammatoire, des enzymes lysosomâles de neutrophiles activées sont libérées. Ces enzymes peuvent produire divers troubles. La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomâle et sa stabilisation implique que l'extrait peut également stabiliser les membranes lysosomâles (Leelaprakash et Mohan Dass, 2011; Shenoy et *al.*, 2010).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) agissent soit en inhibant ces enzymes lysosomâles soit en stabilisant la membrane lysosomâle (Vadivuand Lakshmi, 2008; Leelaprakashand MohanDass, 2011).

Les résultats de l'effet des extraits de polyphénols et de caroténoïdes de *C. moschata* par rapport au standard, le diclofénac de sodium, sont reportés dans le tableau 13. Les concentrations d'extraits de polyphénols et de caroténoïdes de courge testées dans la stabilisation membranaire des globules rouges sont 50, 100, 250, 500 et 1000 µg /mL.

La stabilisation de la membrane érythrocytaire par les extraits de courge est dose-dépendante car leur effet de protection augmentait avec les concentrations croissantes et était plus important avec les hématies traités avec les caroténoïdes de *C. moschata* qu'avec les polyphénols.

Les concentrations de caroténoïdes de *C. moschata* ayant permis un taux de protection des hématies contre la lyse membranaire compris entre 52.45 et 54.11% varient de 500 à 1000 µg /mL ; alors que l'anti-inflammatoire de référence, le diclofenac de sodium, utilisé à 250µg/mL, a donné un taux de protection largement supérieur à 71.91%.

L'effet préventif de *C. moschata* observé dans le présent travail est comparable à celui décrit chez *Cistanche violacea* par Bougandora et al. (2016).

Tableau 13: Effet des polyphénols et des caroténoïdes de *Cucurbita moschata* sur la stabilisation membranaire HRBC

Concentration (µg/mL)	Stabilisation membranaire HRBC (inhibition %)		
	Polyphénols	Caroténoïdes	Diclofenac-sodium
50	31.3±1.18	39.5±1.72	46.99±0.65
100	32.05±1.00	40.22±0.88	60.87±1.70
250	33.43±0.99	49.10±0.64	71.91±0.38
500	35.12±0.41	52.45±0.91	
1000	39.75±0.68	54.11±0.55	

Bougandora et *al.* (2016) ont trouvé que l'effet préventif de *Cistanche violacea* sur la lyse membranaire des hématies induite par hypotonicité est un effet dose-dépendant. Les extraits de cette plante utilisés à des concentrations comprises entre 400 et 1000 µg/mL assurent une protection des hématies contre la lyse membranaire à hauteur de 59 à 75%. Ce niveau de protection est comparable à celui obtenu (79.47%) avec l'anti-inflammatoire de référence, le dichlofenac de sodium utilisé à une concentration de 200µg / mL.

Vadivu et Lakshmi (2008) ont montré que l'extrait de feuilles de *C. moschata* avait une activité anti-inflammatoire *in vitro* qui était dose-dépendante et, qu'utilisé à une concentration de 1000 µg / mL, il assurait 67% de protection des HBRC en solution hypotonique ; alors que l'anti-inflammatoire standard, le dichlofenac, affichait une protection de 74%.

Les résultats de ces auteurs obtenus avec des extraits de feuilles sont légèrement supérieurs à ceux obtenus avec des extraits de fruit dans la présente expérimentation.

Cette activité protectrice des extraits du fruit ou des feuilles de courge vis-à-vis de la lyse membranaire des globules rouges a été attribuée aux diverses fractions de polyphénols (alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, stéroïdes, phénols) et de caroténoïdes qui agissent comme inhibiteurs ou piègeurs de radicaux libres, et parfois même comme pro-oxydants primaires (Sakat et *al.*, 2010).

Des travaux antérieurs (Del Carmen Recio et *al.*, 1999, Dinda et *al.*, 2007) avaient également montré que l'activité anti-inflammatoire des extraits de courge pourrait être due à l'effet d'un seul composant ou à l'effet synergique de plusieurs composants, tels que les iridoïdes, les phényléthanoïdes glycosides et l'apigénine.

Tundis et *al.* (2008) ont montré que les iridoïdes et les phényléthanoïdes glycosides possédaient une forte activité anti-inflammatoire L'apigénine flavone est aussi répertoriée comme un anti-inflammatoire (Soares et *al.*, 2006, Eldahshan et Azab, 2012).

III.3.3.2. Effet de l'extrait des polyphénols et des caroténoïdes sur la réaction inflammatoire.

III.3.3.2.1. Effet *in vivo* des extraits de polyphénols et des caroténoïdes sur la réaction inflammatoire de la patte de rat

L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* a été réalisée sur le modèle de l'œdème aigu de la patte de rats induit par l'injection de la carragénine qui provoque une expression maximale de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Nantel et *al.*, 1999).

Les extraits de courge testés dans l'activité anti-inflammatoire proviennent de fruits récoltés au stade mûr. Les épaisseurs de l'œdème (état inflammatoire) induits par la carragénine augmentent progressivement avec le temps. Les résultats sont regroupés dans le tableau 14.

Au début, les épaisseurs des œdèmes mesurées chez les rats avant injection de carragénine ne présentent pratiquement pas de différence et variaient de 3.67 ± 0.039 à 3.82 ± 0.110 mm. L'injection de carragénine (1%) aux rats induit une nette augmentation de cet œdème pendant les trois heures qui ont suivi.

Cependant, trois heures après injection de 1% de carragénine aux rats traités par les extraits de courge, les mesures de l'œdème au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche subissent une nette augmentation qui s'accroît par la suite jusqu'à la sixième heure ; après quoi, elles diminuent sensiblement. L'épaisseur de ces œdèmes passe de 3.67 ± 0.039 mm à 5.97 ± 0.0042 mm ensuite à 4.99 ± 0.0062 mm respectivement 3h et 6h après injection de carragénine (fig. 30).

L'injection de carragénine est à l'origine d'une réaction inflammatoire vasculo-exsudative. Il s'agit d'une vasodilatation artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte. Il en résulte au niveau local une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement du courant circulatoire. La congestion est déclenchée rapidement par un mécanisme nerveux (nerfs vasomoteurs) et l'action de médiateurs chimiques.

L'œdème inflammatoire résulte du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat constitué d'eau et de protéines plasmatiques.

Tableau 14: Effet anti-inflammatoire *in Vivo* de différentes concentrations d'extraits de polyphénols et de caroténoïdes de *Cucurbita moschata* comparé à celui du standard, le Diclofénac, sur l'épaisseur de l'œdème (mm) de la patte de rat Wistar.

Traitements par injection intrapéritonéale (IP)	Doses (mg/Kg poids vif)	Epaisseurs des œdèmes (mm) chez les rats après injection de carragénine 1 %		
		0h (état initial)	3h	6h
Extrait de polyphénols	5	3.67±0.039	5.97±0.0042	4.99±0.0062
	10	3.75±0.046	5.66±0.032	4.23±0.019
Extrait de caroténoïdes	5	3.77 ±0.104	5.84±0.016	4.50±0.008
	10	3.80±0.045	5.75±0.045	4.44±0.45
Diclofénac AINS Témoin négatif	20	3.82±0.110	5.92±0.056	3.91±0.017
Rats Normaux N		3.59±0.102	3.63±0.078	3.56±0.009
Témoin positif Carragénine		4.02±0.056	5.63±0.029	6.20±0.032

Sa traduction clinique est un gonflement des tissus. L'œdème inflammatoire est la conséquence d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation, et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques (Weill et Batteux, 2003 ; Prin et al, 2009).

Dans le cas où les extraits de *Cucurbita moschata* sont utilisés à raison de 5 mg/kg, on constate que l'épaisseur de l'œdème passe de $3,77 \pm 0,104$ mm à $5,85 \pm 0,016$ mm, 3h après injection de carragénine. Néanmoins, 6h après l'induction de l'inflammation, le lot de rats traités par l'extrait de courge présente une moyenne des épaisseurs $4,28 \pm 0,062$ mm correspondant à un pourcentage de diminution de 21%.

Si l'on considère le Diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé en intrapéritonéale chez les rats injectés de carragénine, l'épaisseur de la région centrale de l'aponévrose plantaire gauche passe de 3.82 ± 0.110 mm à 5.92 ± 0.056 mm au cours des 3h post-injection de carragénine. Cette dernière valeur est diminuée comparativement à celle du lot de rats injectés en intra péritonéale par des extraits de courge avec un pourcentage d'inhibition de 16.66%.

En outre, 6h après l'injection de carragénine, ces valeurs évoluent pour atteindre 3.91 ± 0.017 mm. Cette dernière valeur est aussi significativement diminuée par rapport à celle des rats traités par les extraits de courge, avec un pourcentage d'inhibition de 29.52%.

En définitive, les résultats de notre expérimentation montrent que l'extrait de courge présente un effet anti-inflammatoire chez les rats injectés par la carragénine à 1% comparativement au lot n'ayant reçu aucune injection. Aussi l'utilisation du Diclofénac montre un effet anti-inflammatoire plus prononcé que celui des extraits phénoliques de courge après 3h et 6h de temps post-injection de carragénine.

Le criblage de l'activité anti-inflammatoire est réalisé par le test de la carragénine. Cet agent phlogogène induit au niveau de la patte un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et un paramètre important dans l'évaluation de l'activité anti- inflammatoire de plusieurs composés. Cette technique a été sélectionnée en raison

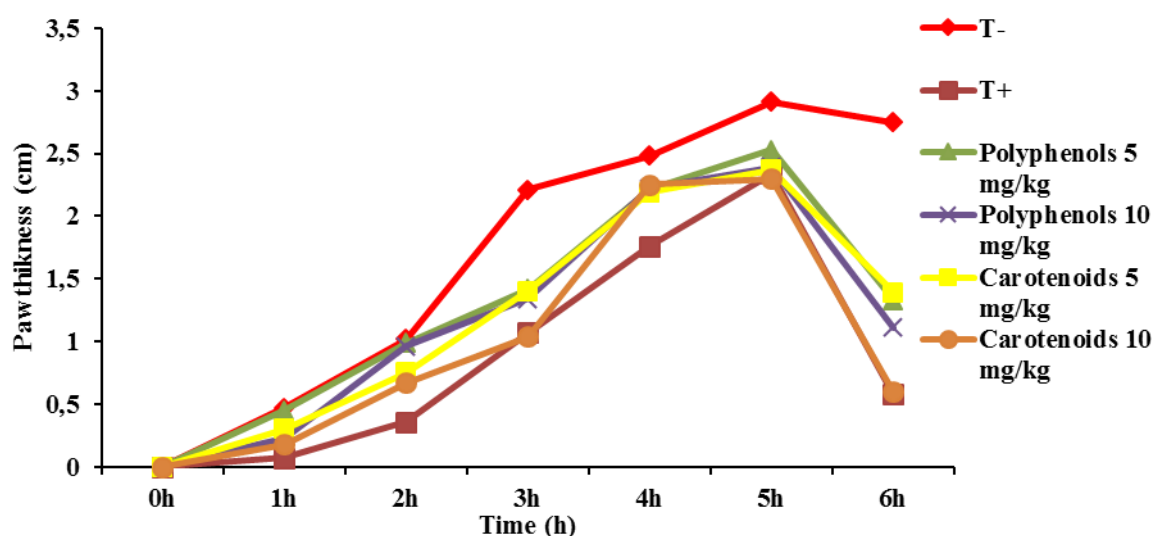


Figure 30 : Effet des concentrations de 5 et 10 mg/Kg de poids vif d'extraits de polyphénols et de caroténoïdes de courge *Cucurbita moschata* sur l'épaisseur de l'œdème (mm) de la patte de rat Wistar induit par injection de 1% de carragénine T- : rats injectés de carragénine non traités, T+ : rats injectés de carragénine traités par Diclofénac.
Les valeurs portées sur ce graphe représentent la moyenne de 3 déterminations $\pm$ l'écart type.

de sa simplicité d'exécution et en raison de sa reproductibilité. La carragénine provoque l'inflammation locale lorsqu'elle est injectée dans l'aponévrose de la plante du pied (Bhatt et al., 1977; Ossipov et al., 1995).

La cause de cette réaction inflammatoire est la lésion tissulaire. Cette lésion tissulaire induit la synthèse de l'histamine, des prostaglandines, des leucotriènes (Ammon et al., 1993), du PAF (facteur d'activation plaquettaire), des cytokines, du NO (monoxyde d'azote) et du α -TNF (facteur de nécrose tumorale) (Clarke et al., 1996).

L'évolution de l'œdème suite à l'injection de carragénine s'effectue de manière temps-dépendant et se divise en deux phases : la première phase s'étale de 0 à 3h ; la deuxième phase de 3 à 6h. Des études antérieures ont indiqué que l'effet maximal de la carragénine s'observe trois heures après son administration (Kirkova et al., 1992).

En effet, la carragénine induit une augmentation de la synthèse de cyclooxygénase de type 2 (COX-2). L'augmentation de la concentration de cette enzyme passe par un maximum 1h après l'injection de carragénine selon ces mêmes auteurs.

Cette augmentation est accompagnée par celle de la synthèse de prostaglandines, essentiellement la prostaglandine type E2 (PGE2) impliquée dans les processus de la douleur et de l'inflammation (Nantel et al., 1999 ; Posadas et al., 2004).

Ceci explique l'effet retardé des AINS comme le Diclofénac qui n'a d'effet qu'1h après son administration ; ce qui est en relation avec leur mode d'action qui passe par l'inhibition de la prostaglandine PGE2 par stimulation de la cyclooxygénase COX-2 (Vergne et al., 2000 ; Editorial , 2005). Cela explique aussi pourquoi l'effet du Diclofénac devance celui de notre extrait après 3h et 6h de période post-injection de l'agent inflammatoire, la carragénine.

III.3.3.2.2 Effet in vitro des extraits de polyphénols et des de caroténoïdes sur la protéine C-réactive (CRP)

Le dosage de la protéine C-réactive a été effectué par une technique immunoturbidimétrique automatisée qui a donné les résultats reportés au tableau 15.

Six (6) heures après l'injection de carragénine à 1%, la CRP_r subit une augmentation chez le groupe de rats non traités à l'extrait de courge (témoin positif) comparativement à l'état initial N (lot rats normaux = lot N) avec des valeurs respectivement de 48 mg/ mL vs 4 mg/ mL.

La protéine C-réactive (CRP) est une pentraxine rencontrée chez la plupart des vertébrés (souris, rats, homme) et chez les invertébrés comme la limule (*Limulus polyphemus*) (Etlinger et Coe, 1986 ; Nakanishi et al., 1991 ; Shrive et al., 1999).

La protéine C-réactive humaine (CRPh) est une protéine de la phase aiguë inflammatoire dont les concentrations plasmatiques peuvent augmenter jusqu'à 1000 fois suite à des dommages de tissus ou à des infections (Padilla et al., 2003). La CRPh se lie également à la phosphorylcholine que l'on trouve dans les phospholipides membranaires

Tableau 15: Concentrations (mg/mL) en protéine C-réactive chez les rats Wistar à l'état normal ou initial non injectés de carragénine et non traités par le Diclofénac ou par les extraits de courge (lot N), rats injectés de carragénine et non traités désignés contrôle ou témoins + (lot C), rats injectés de carragénine et traités par le Diclofénac à 20mg/Kg poids vif témoin - (lot D), rats injectés de carragénine et traités par 5 ou 10 mg/Kg d'extraits de caroténoïdes (lots 5C et 10C) ou de polyphénols (lots 5P et 10P) de courge *Cucurbita moschata*.

Lots de rats	CRP (mg/L)
Rats normaux non injectés de carragénine et non traités = lot N	4±0
Rats contrôles ou témoins (+) = lot C	48±2
Rats injectés de carragénine et traités au Diclofénac témoins (-) = lot D	6±1
5 mg/ Kg caroténoïdes = lot 5C	22±3
10 mg/ Kg caroténoïdes = lot 10C	16±1
5 mg/Kg polyphénols lot 5P	36±3
10 mg/ Kg polyphenols = lot 10P	28±2

Parmi les fonctions effectrices exercées par la CRPh lors de la liaison à des ligands, il y a l'activation *in vivo* et *in vitro* du complément (Nakanishi et *al.*, 1991; Siegel et *al.*, 1974; Wolbink et *al.*, 1996).

Chez les rats, la CRPr (celle du rat) n'est pas une protéine typique de la phase inflammatoire aiguë en comparaison avec l'haptoglobine sérique et le fibrinogène plasmatique (Giffon et *al.*, 2003). Cependant, contrairement aux humains, les rats ont des concentrations plasmatiques de CRP beaucoup plus élevées, soit environ 300-500 mg/L, ce qui est 100 fois plus élevé que la concentration chez les humains.

Contrairement à la CRPh, la CRPr est incapable d'activer le complément malgré une homologie en acide aminés de 70%. Il est aussi important de signaler que la CRPr n'active pas le complément en utilisant le polysaccharide de *Streptococcus pneumoniae* et peut par conséquent l'activer lors de sa liaison avec d'autres ligands. (Eldahshan et Azab, 2012).

Dans notre cas, la CRPr augmente et corrobore les résultats de nombreux travaux l'ayant utilisé pour suivre l'évolution de la réaction inflammatoire aiguë. En effet pour les différents lots de rats C, D, 5C, 10C, 5P, 10P ; le taux de CRPr est augmenté sensiblement par rapport au lot de rats N (normaux ou à l'état initial avec respectivement des valeurs de 48 ; 6 ; 22 ; 16 ; 36 ; 28 mg/mL vs 4 mg/mL).

Selon Giffen (2003), les taux de CRPr culminent, 25 à 40 h après l'administration d'adjuvant complet de Freund par voie intra-péritonéale, à environ 120% de ceux du contrôle (100%). Selon Dimitrov et *al.* (2014), les rats obèses présentent une élévation de la CRPr qui atteint 947.5 µg/mL par rapport à celle des témoins (649.34 µg/mL) après quatorze semaines d'expérimentation.

Dans notre cas, la quantification immunoturbidimétrique de la CRP a indiqué qu'elle culmine à 48 mg/mL chez les rats sans traitement anti-inflammatoire ; ce niveau correspond à 150% celui du témoin qui représente les 100%.

Chez le lot de rats ayant reçu l'extrait de *C. moschata*, 1h avant le traitement par la carragénine et après six heures, on assiste à une diminution du taux de CRPr chez les rats traités avec les caroténoïdes 5C (lot 5C) et 10C (lot 10C) comparativement à ceux traités avec les polyphénols 5P (lot 5P), 10P (lot 10P) avec des valeurs respectives de 22mg/mL et

16 mg/ mL vs 36 mg/ mL et 28 mg/ mL.

Quand au lot de rats traités par l'anti-inflammatoire standard, le Diclofénac (lot D), il présente une valeur sensiblement plus diminuée que celle des lots traités par l'extrait de courge. En effet, le taux de CRPr chez les rats du lot D (6 mg/mL) est inférieur à celui des rats des lots 5C (22mg/mL), 10C (16 mg/ mL), 5P (36 mg/ mL) et 10P (28 mg/ mL) .

Ces résultats témoignent de l'effet anti-inflammatoire important de l'extrait de *C. moschata* comparativement au lot non traité (C) mais demeure légèrement inférieur à l'effet anti phlogogène du Diclofénac.

Ces résultats montrent aussi que le fruit de courge présente une activité anti-inflammatoire appréciable comparativement à un médicament comme le Diclofénac. Cela reflète la teneur importante en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes, en anthocyanes et en caroténoïdes totaux déterminés dans ce fruit.

Les résultats de la présente étude mettent en évidence la corrélation positive entre la teneur en caroténoïdes, en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes dans l'extrait méthanolique du fruit de courge et son activité anti-inflammatoire.

Selon la littérature, les différentes parties de la plante de courge de muscade sont couramment utilisées en médecine traditionnelle dans différentes régions du monde, principalement dans les régions subtropicales et tropicales du continent asiatique et américain mais aussi en région méditerranéenne pour soigner diverses maladies telles que les troubles digestifs, l'asthénie, les problèmes hépatiques, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections de la peau, l'anorexie, la fièvre, la pharyngite, la bronchite, l'anémie, la diarrhée, l'insomnie, et le cancer (Plastina et *al.*, 2012 ; Saif et *al.*, 2010).

III.3.3.2.3 Effet des extraits de polyphénols et de caroténoïdes sur la Formulation et la Numération Sanguine du rat (FNSr)

La FNS_r constitue le dénombrement des éléments figurés du sang. Dans cette expérience, nous nous sommes contentés de dénombrer les leucocytes afin de les corréler avec l'inflammation induite par la carragénine chez le rat et phytoremédiée par les extraits de courge.

Les résultats de la numération leucocytaire sont reportés dans le tableau 16. Ils montrent que chez les rats normaux âgés de 6 à 7 semaines et pesant 150 à 200g, le nombre de leucocytes est voisin de 3810/mm³.

D'autres auteurs (Archer, 1977; Balkwill et al., 2005; Bhatt et al., 1997) ont rapporté un nombre de leucocytes beaucoup plus élevé (4190 à 9730/ mm³ chez des rates de poids corporel comparable. Ainsi, les femelles présentent un nombre de leucocytes inférieur à celui des mâles. La littérature ne manque pas de références sur les paramètres hématologiques du rat. Cependant, il convient de signaler la grande variabilité de ce nombre de leucocytes qui peut fluctuer du simple au triple (Smith et al., 1986; Suber et Odell, 1985 ; Eccleston, 1977) selon le lieu de ponction (Descat, 2001).

D'après Smith et al. (1986), le sang prélevé à partir de l'aorte abdominale et dans un tube type Vacutainer et à partir du ventricule droit chez le rat montre un niveau bas d'érythrocytes, de leucocytes et de plaquettes comparé à celui prélevé à partir d'autres sites.

Cependant, il peut y avoir de grandes variations d'une étude à l'autre et il semblerait, à priori, difficile d'établir un hémogramme de référence pour le rat. En effet, il existe un très grand nombre de facteurs de variation parmi lesquels on peut déjà citer le sexe, l'âge, le site de ponction, la lignée, le statut médical, et bien sûr la méthode d'étude de ces paramètres sanguins, manuelle ou automatisée.

Tous ces facteurs ne peuvent pas être contrôlés à l'identique par tous les laboratoires et pour toutes les expérimentations. En définitive, et selon Ringler et Dabich (1979), il est impossible d'établir une quelconque valeur universelle pour un paramètre hématologique ou biochimique.

La réaction vasculo-exsudative se traduit cliniquement par quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aiguë : rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur ; elle comporte trois phénomènes : une congestion active, un œdème inflammatoire, une diapédèse leucocytaire.

L'œdème inflammatoire résulte du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat constitué d'eau et de protéines plasmatiques.

Tableau 16: Formule de Numération Sanguine (FNS) des rats traités et non traités avec l'anti-inflammatoire standard, le Diclofénac (lot D), et différentes concentrations (5 et 10 mg/mL) d'extraits de polyphénols (lots 5P et 10P) et de caroténoïdes (lot 5C et 10C) de courge *C. moschata* récoltée au stade mûr. $\times 10^3/\mu\text{L}$.

	N	C	D	5 mg/mL P	10 mg/mL P	5 mg/mL C	10 mg/mL C
WBC	3.81	12.5	7.81	9.81	8.59	7.00	6.08
LYM	3.09	5.21	4.82	6.64	6.24	4.55	4.37
MID	0.58	3.56	2.58	1.78	3.36	3.31	1.58
GRA	0.14	6.95	0.41	0.21	0.17	0.14	0.13

WBC : globule blancs, LYM : Lymphocytes, MID : Monocytes , GRA : Granulocytes.

Sa traduction clinique est un gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, est responsable de la douleur (également provoquée par certains médiateurs chimiques) (Russo-Marie et *al.*, 1998).

L'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques. Ces différents phénomènes témoignent de la forte multiplication leucocytaire (Bouguendora et *al.*, 2016).

Pour les lots traités par les extraits de *C. moschata* (les lots 5P, 10P, 5C et 10C,) et au diclofénac (lot D), on constate qu'après six heures, le nombre de leucocytes diminue par rapport à celui du témoin ou du contrôle (lot C).

Les rats traités par le Diclofénac, anti-inflammatoire non stéroïdien (D), présentent une diminution du nombre de leucocytes par rapport au témoin (lot C), mais de manière plus prononcée que pour les extraits de polyphénols et de caroténoïdes de courge. Cela montre que les extraits de courge présentent un effet anti-inflammatoire entraînant une variation de la formule leucocytaire mais de manière moins intense que le Diclofénac.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) bloquent la synthèse des prostaglandines. L'enzyme cible des AINS est la prostaglandine synthase ou cyclooxygénase (COX) qui convertit l'acide arachidonique en prostaglandine E₂ (PGE₂) ; du métabolisme des PGE₂ dérivent ensuite les diverses prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes.

Il existe au moins deux isoformes de COX, de même poids moléculaire et avec environ 60 % de similitude, COX-1 et COX-2. Le diclofénac est 20 à 50 fois plus actif sur COX-1 que sur COX-2 (Meade et *al.*, 1993 ; Mitchell, 1993). L'action inhibitrice du Diclofénac sur les cyclooxygénases entraîne une inhibition de la synthèse des prostaglandines et donc de la réaction inflammatoire aigüe innée et de la prolifération des globules blancs.

L'extrait de courge contient de nombreux composés identifiés par LC-MS/MS. Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques biologiquement actifs et ubiquitaires chez les fruits et les végétaux. La composition des flavonoïdes varie selon les variétés de fruits.

Dans la pulpe du fruit du jujubier, la présence de flavonoïdes comme la quercétine, le kaempférol et la myricétine, confèrent à ce produit la capacité d'inhiber l'activité des enzymes impliquées dans l'apparition de médiateurs inflammatoires.

Selon Mansour (2016), ces médiateurs sont le monoxyde d'azote (NO) ou les prostanoïdes, eicosanoïdes synthétisés par l'entremise de cyclo-oxygénase (COX) et les leucotriènes qui possèdent un rôle chimiotactique pour les leucocytes (macrophages, neutrophiles) sur les sites (fig.31-1) (Liang et *al.* 1999 ; Shen et *al.*, 2002).

La quercétine et le kaempférol inhibent aussi la cyclo-oxygénase (COX)-2 chez les macrophages de souris (Jung et Sun, 2004 ; Kim et *al.*, 2008). En définitive ces travaux corroborent nos résultats concernant l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de courge au

regard de sa composition en polyphénols tels que la quercétine le kaempférol, la myricétine la naringénine et l'hespérétine.

III.3.3.2.4 Examen Histologique de la patte de rat

Six heures après l'induction de l'inflammation, une étude histologique a été réalisée dans le tissu de la patte et qui est illustrée par la figure 31. Chez les rats du lot N (normaux), il n'y avait aucun signe d'inflammation dans le tissu de la patte (fig.31-1).

L'examen microscopique des biopsies de pattes des rats ayant reçu la carragénine mais non traités a montré une accumulation massive de cellules inflammatoires infiltrées. En revanche, les biopsies des mêmes rats mais traités avec le Diclofénac ou par les polyphénols et les caroténoïdes de la courge ont montré une réduction de la réponse inflammatoire.

Le nombre de neutrophiles était plus important dans les tissus des pattes de rats non traitées que dans ceux des pattes traitées avec l'anti-inflammatoire standard, le Diclofénac. Les deux extraits de polyphénols et de caroténoïdes de courge réduisaient les neutrophiles dans les tissus enflammés.

Selon les résultats, l'effet des deux extraits était dose-dépendant. L'extrait de caroténoïdes était capable de réduire le nombre de neutrophiles mieux que l'extrait de polyphénols (+, +++ avec la plus forte concentration).

Oliveira et al, (2013) ont étudié l'activité anti-inflammatoire aigue et chronique de *Cucurbita pepo*. L'analyse histologique du tissu de l'oreille de rat a clairement soutenu les résultats décrits ci-dessus. Les oreilles exposées à des applications de xylène ont révélé un effet cutané intense d'œdème, une congestion, une hyperplasie épidermique et un grand nombre d'infiltrations de cellules inflammatoires.

Par ailleurs, ces auteurs ont constaté que l'application répétée de l'oxazolone a provoqué un léger œdème dermique, une congestion intense, une hyperprolifération de l'épiderme et

une infiltration des leucocytes et des mastocytes dans le derme. Les résonances étaient réduites dans les tissus auriculaires des animaux traités localement avec l'extrait de *Cucurbita pepo*. Il y avait également une réduction significative du nombre de mastocytes par rapport au contrôle positif.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on note que les différents extraits de courge ont montré une activité protectrice vis-à-vis de l'inflammation induite par l'injection de la carragénine. Cette propriété biologique est sans aucun doute liée à la concentration des composés bioactifs (polyphénols et caroténoïdes) présents dans les extraits.

Certains auteurs expliquent l'effet de ces composés par la série d'actions suivantes :

- la modulation des voies de signalisation d'enzymes comme la MAPK Mitogen activated protein kinase) (Kong et *al.*, 2000; Wiseman et *al.*, 2001), et la protéine kinase B
- La régulation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B (nuclear factor κ B) (Manna et *al.*, 2000),
- L'inhibition de la production des cytokines et les chimiokines inflammatoires.
- La suppression de l'activité des enzymes iNOS (*nitric oxide synthase*) et cyclooxygénases (COX) (Donnelly et *al.*, 2004; O'Leary et *al.*, 2004).
- La diminution de la production des ROS/RNS (reactive oxygen species/ reactive nitrogen species) et de l'enzyme MAPK qui jouent un rôle crucial dans l'inflammation (Ichikawa et *al.*, 2004).
- Les radicaux libres peuvent aussi agir comme des messagers secondaires, ce qui provoque la production d'autres médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire. De plus,
- Garcia et *al.* (1996) ont montré que l'activation du métabolisme de l'acide arachidonique par les ROS produit des prostaglandines et des cytokines telles que les interleukines IL-1, IL-6 et TNF (Tumor necrosis factor).
- Les différents extraits de courge ont montré une activité antioxydante remarquable ce qui leur donne la capacité de réduire la production de radicaux libres par l'inhibition de la NADPH oxydase lors de l'inflammation. Ainsi, cette

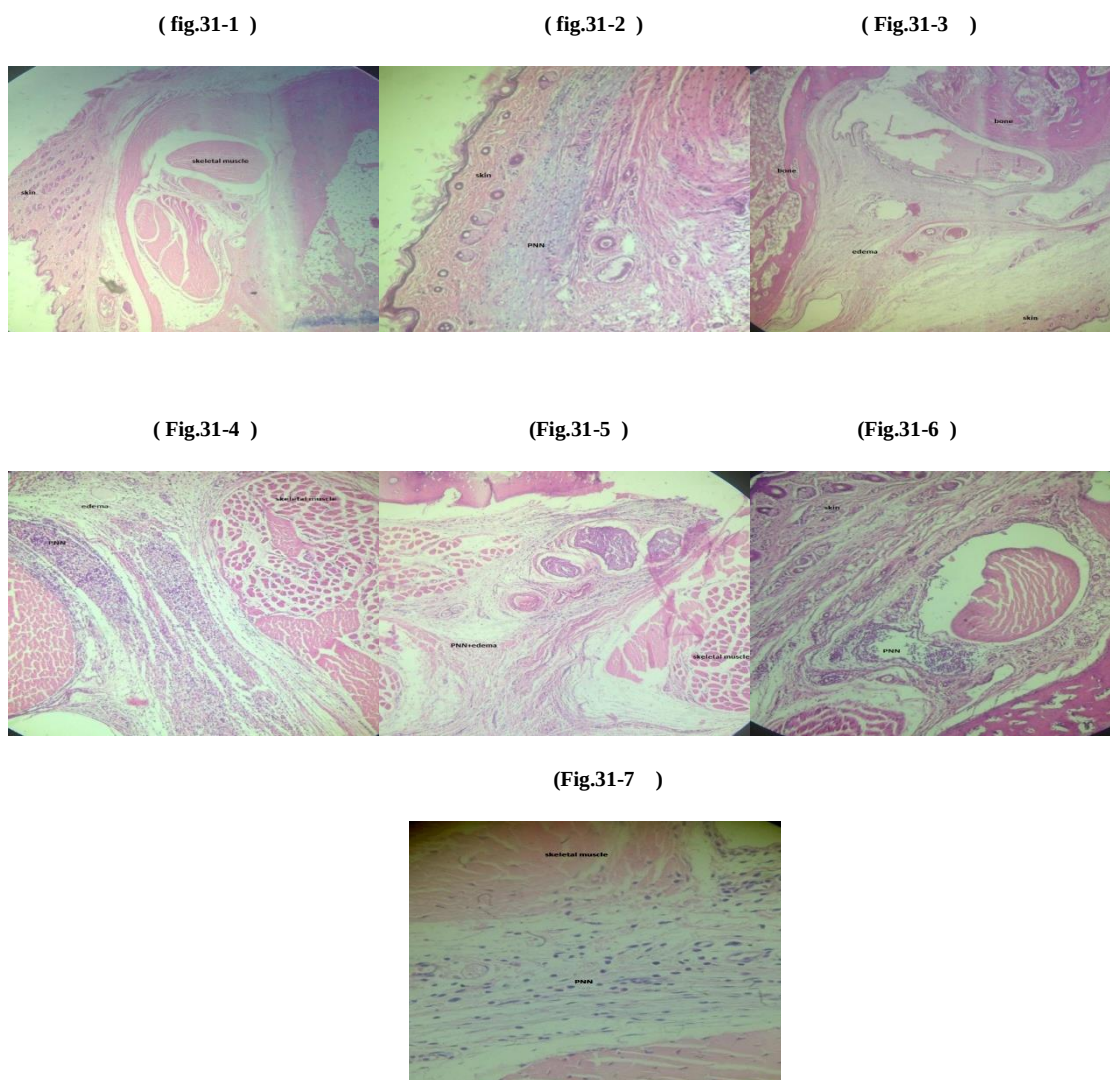


Figure 31 : Examen histologique des pattes de rats normaux (lot N) carr – et trait- (fig.31-1), de pattes de rats enflammées par la carragénine et non traitées (rats carr+ et trait- = contrôle ou témoin + = lot C, fig.31-2) ; de pattes de rats enflammées par la carragénine (carr+) et traitées (trait+) par un anti-inflammatoire standard, le Diclofénac (20mgKg/poids vif = lot D, fig.31-3) ; ou par 5mg d'extrait de polyphénols de courge/ Kg poids vif (lot 5P, fig.31-4) ; par 10mg d'extrait de polyphénols de courge/ Kg poids vif (lot 10P, fig.31-5) ; par 5mg de caroténoïdes de courge/ Kg de poids vif (lot 5C, fig.31-6) et par 10mg de caroténoïdes de courge/ Kg de poids vif (lot 10C, fig.31-7)

activité antioxydante exercée par les extraits étudiés produirait un effet thérapeutique supplémentaire qui renforce son activité anti-inflammatoire.

La présence de caroténoïdes, de flavonoïdes, de saponines et de triterpénoïdes renforce les propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes de ces extraits (Bruneton, 2009 in Ouédraogo et *al.*, 2011).

Dans leur action antioxydante et antiradicalaire, les pourraient réguler les activités cellulaires liées à l'inflammation comme celles des mastocytes, des macrophages, des lymphocytes et des neutrophiles (Middleton et *al.*, 2000).

Ces derniers auteurs ont montré que certains flavonoïdes inhibent la libération des histamines à partir des mastocytes ; alors que d'autres inhibent la prolifération des cellules T.

Par ailleurs, certains flavonoïdes modulent les activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique, de la phospholipase A2, des cyclooxygénases, de la lipoxygénase et de l'oxyde nitrique synthase (enzyme produisant de l'oxyde nitrique). Une inhibition de ces enzymes par les flavonoïdes réduit la production des prostaglandines et des leucotriènes ; ce qui représente l'un des importants mécanismes cellulaires anti-inflammatoire.

Une autre propriété anti-inflammatoire des flavonoïdes réside dans leur pouvoir d'inhiber la dégranulation des neutrophiles. Ce qui influence directement la diminution de la libération de l'acide arachidonique par les neutrophiles et d'autres cellules immunitaires (Hoult et *al.*, 1994 ; Tordera et *al.*, 1994).

Plusieurs études *in vitro* utilisant différentes lignées cellulaires ont montré que la quercétine est également capable d'inhiber les lipopolysaccharides impliqués dans la production de cytokines. À titre d'exemple, la quercétine inhibe les lipopolysaccharides qui induisent la production de TNF- α dans les macrophages (Manjeet et Ghosh, 1999), ainsi que la production des IL-8 dans les cellules pulmonaires (Geraets et *al.*, 2007).

La lutéoline est un autre flavonoïde largement répandu dans le règne végétal et connue pour son action anti-inflammatoire. Dans des études sur des cellules humaines du colon, la lutéoline atténuait efficacement la production de TNF-alpha et d'IL-8. Elle inhibait également la libération d'histamine, de leucotriènes et de prostaglandines dans des cultures de mastocytes humains sensibilisés avec des anticorps IgE (Kim et *al.*, 2005).

L'activité anti-inflammatoire exercée par les extraits de courge peut être due aussi à la présence de lutéine, un caroténoïde qui fonctionne principalement comme des astringents, car il peut se lier à l'albumine existant dans la peau et les membranes muqueuses du corps en formant ainsi une couche de protection qui est insoluble le β -carotène peut aussi réduire l'inflammation. Ceci incite à l'utilisation des plantes contenant des caroténoïdes pour le traitement des blessures, hémorroïdes, et dans les conditions inflammatoires du tube digestif (Trease et Evans, 1989 ; Ezeonwumelu et *al.*, 2012).

L'inflammation semble être également impliquée dans la progression du cancer. Plusieurs étapes inflammatoires se sont révélées capables de provoquer le cancer, telles que la maladie inflammatoire de l'intestin dans le cancer colorectal, la gastrite induite par *Helicobacter pylori* dans le cancer gastrique, ou prostatite qui peut induire le cancer de la prostate (Balkwill et *al.*, 2005).

En outre, une alimentation riche en antioxydants et en anti-inflammatoires des composés dérivés de fruits, légumes et extraits des plantes peut réduire le risque de développer des maladies neuro-dégénératives liées à l'âge, comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Joseph et *al.*, 2007).

CONCLUSION

Conclusion

Les substances phytochimiques sont des composés naturels bioactifs qui agissent comme des agents protecteurs contre le stress chez les plantes. Ces composés phytochimiques peuvent être divisés en plusieurs catégories : Composés phénoliques, caroténoïdes, alcaloïdes, stéroïdes, des terpènes, des saponines, etc. ils pourraient également présenter d'autres activités biologiques telles que des propriétés antimutagènes, anticancéreuses, antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires.

Dans ce travail, les extraits de polyphénols et de caroténoïdes du fruit de la courge de muscade *Cucurbita moschata* récolté à différents stades de maturation ont été analysés sur le plan quantitatif et qualitatif avant de faire l'objet de mise en évidence et d'évaluation de leurs principales propriétés biologiques telles que l'activité antioxydante et antimicrobienne *in vitro*, ainsi que l'activité anti-inflammatoire *in vivo* chez le rat Wistar mâle.

Les teneurs en phénols totaux et en caroténoïdes totaux sont variables selon le stade de maturation du fruit. Les teneurs les plus élevées en phénols totaux (97.43 ± 2.2 mg Eq AG/ g) et en flavonoïdes (28.66 ± 0.33 mg Eq Q/ g) ont été trouvées dans l'extrait phénolique du fruit récolté au stade vert immature. Par contre les teneurs les plus élevées en caroténoïdes totaux (0.415 ± 0.19 mg ECa/ g) ont été trouvées dans le fruit récolté au stade mûr.

L'analyse chromatographique liquide couplée à la spectrométrie de masse des différents extraits phénoliques a permis la détection de l'acide syringique qui était le composé le plus abondant et représentant 37% du total des composés phénoliques de la courge, suivi par l'acide cinnamique (11,93%), l'acide protocatéchique (11,30%), le p-comaroylhexoside (4,71%), la quercétine glucoside (4,53%) et la vanilline (4,29 %).

Le β -carotène (4.19, 6.22 et 10.79 $\mu\text{g/g}$) et la lutéine (4.19, 6.22 et 10.79 $\mu\text{g/g}$) ont été retrouvés dans les fruits de courge récoltés aux trois stades de maturation comme étant les caroténoïdes les plus abondants avec des valeurs qui augmentent au cours de la maturation du fruit.

La capacité antioxydante totale des extraits de caroténoïdes du fruit mûr de *C. moschata* la plus élevée significativement est celle ($6.49 \pm 0.005 \mu\text{M}$ trolox équivalent/g) obtenue avec la méthode de réduction du cation libre ABTS ; car celle mesurée avec la méthode de piégeage du radical DPPH ($10.61 \pm 0.005 \text{ mM}$ trolox équivalent) est légèrement plus faible.

Le pouvoir antioxydant des polyphénols de courge évolue au cours du développement de la plante car il augmente au fur et à mesure que le fruit mûrit.

L'extrait de caroténoïdes de courge de stade mûr présentait le plus haut niveau d'activité antioxydante mesurée avec le test ABTS ($6.491 \pm 0.005 \mu\text{M TE/g}$), suivi par ceux des stades jeune immature ($4.74 \pm 0.007 \mu\text{M TE/g}$) et vert jeune ($3.04 \pm 0.003 \mu\text{M TE/g}$), respectivement. La même remarque que celle faite dans le cas des extraits phénoliques peut être relevée dans ce cas d'évaluation de l'activité anti radicalaire des caroténoïdes, où le test ABTS donne des valeurs plus élevées que le test DPPH et par conséquent rend mieux compte du potentiel antioxydant que recèle la courge.

L'activité antibactérienne des extraits étudiés a montré des diamètres des zones d'inhibition allant jusqu'à $11.83 \pm 0.36 \text{ mm}$ avec les extraits phénoliques de courge de stade jeune immature et des diamètres qui ne dépassent pas $9.5 \pm 0.40 \text{ mm}$ avec le fruit mûr. Cette activité peut être due à la présence des composés phénoliques comme l'acide caféique qui est connu pour son effet antibactérien et qui est présent en quantité élevée dans ce fruit.

Les extraits testés pour leur activité anti-inflammatoire *in vitro* ont montré une capacité à inhiber la dénaturation protéique et à protéger contre la lyse membranaire et les résultats de l'expérience *in vivo* ont montré un effet dans la réduction de l'inflammation provoquée par l'injection de la carragénine. Ces activités peuvent être dues à la présence de β -carotène et des flavonoïdes y compris la quercétine.

Si la chair du fruit de la courge renferme des composés bioactifs d'intérêt santé comme nous venons de le démontrer dans ce travail, les graines sont également réputées riches en substances bioactives bénéfiques et en particulier dans le traitement des problèmes de prostate. C'est pourquoi, en perspectives, ce travail sur la courge devrait être poursuivi pour la mise en évidence de toutes les vertus de ce fruit. Les actions à mener seraient :

- de caractériser plus précisément les différents constituants bioactifs et d'étudier leur effet synergique et leur mécanisme d'action.
- de déterminer les doses d'utilisation préventive et thérapeutique de ces composés bioactifs en étudiant leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamique.
- de chercher à élaborer des extraits concentrés de fruit de courge de longue durée de conservation pour une éventuelle utilisation comme conservateurs dans le secteur de l'agro- alimentaire et de la diététique.
- de procéder à des investigations sur la nature et les propriétés biologiques des constituants de la graine de courge.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

-A-

- Abd EI-Aziz A. B. and Abd EI-Kalek H. H. (2011).** Antimicrobial proteins and oil seeds from pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Nat. Sci.* 9 : 105-119.
- Adams, M.J., Ahuja, K.D., Geraghty, D.P. (2009).** Effect of capsaicin and dihydrocapsaicin on in vitro blood coagulation and platelet aggregation. *Thromb. Res*, 124:721–723.
- Ajila, C., Brar, S. (2012).** Role of dietary antioxidants in cancer. In S. Shankar & R. K. Srivastava (Eds.), *Nut. diet and cancer*, 377–412.
- Ahmad L, Beg AZ. (2001).** Antibacterial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 74: 113-123.
- Aktas Eda Toprak, Hasan Yildiz (2011).** Effects of electroporation treatment on chlorophyll and carotenoid extraction yield from spinach and tomato. *J. Food Eng.* 106 : 339–346.
- Alam K, Pathak D, Ansari. S.H. (2011).** Evaluation of Anti-inflammatory Activity of *Ammorium subulatum* Fruit Extract. *Int. J. Pharmaceutical Sci. and Drug Res.*, 3: 35-37.
- Alonso-Castro, A.J., Domínguez, F., García-Carrancá, A. (2013).** Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. *Arch. Med. Res.*, 44: 364- 351.
- Ammon H.P.T., Safayhi H., Mack T., Sabieraj J. (1993).** Mechanism of anti-inflammatory actions of curcumin and bismellitic acids. *J. Ethnopharmacol.* 38:113-119.
- Anthoni, J. (2007).** Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes. Thèse à l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Ansari, S.H., Ali, M., Quadry, J.S., (1993).** Three new tetracyclic triterpenoids from *Pistacia integerrima* galls. *Pharm.* 49: 356-357.
- Archer R. K. (1977).** Technical methods in: Comparative Clinical Hematology. Black well scientific. 14: 537-609.
- Archibald L, Phillips L, Monnet D, Mac Govan J.E, Tenover Jr.F et R. Gaynes b. (1997).** Antimicrobial resistance in isolates from in patients and outpatients in the United States. Increasing importance of the intensive care unit. *Clinic. Infect. Dis*, 24: 211-215.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P. (1994).** Standardization d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants, *J. Pharm. Belg.*, 49 :462- 468.
- Auger, C., Schini-Kerth, V.B. (2014).** Potentiel des polyphénols à améliorer la protection vasculaire en stimulant la fonction endothéliale. *Cah. Nutr. Diet*, 49(4) : 160–172.
- Antunes de Araújo A., Lira Soares L.A., Ferreira M.R.A., De Souza Neto M.A., Ribeiro da Silva G., Raimundo Fernandes de Araújo Jr., Bernardo Guerra G.C., Nunes de Melo M.C. (2014).** Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-

inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *J. Ethnopharmacol.* 156: 88–96.

Ayala-Zavala Fernando J., Wang C.Y., González-Aguilar G.A. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT – Food Sci. Technol.* 37 : 687- 695.

Cristiane H., Rodriguez-Amaya D.B. (2007). Qualitative and Quantitative Differences in Carotenoid Composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. *J. Agric. Food Chem.* 55 : 4027–4033.

Azizah, A. H., Wee, K. C., Azizah, O. and Azizah, M. (2009). Effect of boiling and stir frying on total phenolics, carotenoids and radical scavenging activity of pumpkin (*Cucurbita moschato*). *Int. Food Res. J.* 16: 45-51.

-B-

Badr Sherif E.A., Mohamed Shaaban, Yehya M. Elkholy , Maher H. Helal , Akila S. Hamza , Mohamed S. Masoud , Mounir M. El Safty (2013). Chemical composition and biological activity of ripe pumpkin fruits (*Cucurbita pepo* L.) cultivated in Egyptian habitats. *Nat. Prod. Res.: Formerly Nat. Prod. Letters.* 25:16, 1524-1539.

Balkwill F, Charles K.A et Mantovani A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 7: 211–217.

Barbosa, J., Bergés, R ., Sanz-Nebot, V. (2012). Retention behaviour of quinolone derivatives in highperformance liquid chromatography: Effect of pH and evaluation of ionization constants. *J Chromatogra A*, 823, Issues 1–2: 411–422.

Barreiros A.L.B.S, David J.M, David J.P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova.* 29: 113-123.

Batlouni.M. (2010). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. *Arq. Bras. Cardiol.* 94(4): 522–563.

Basli A, Chibane M, Madani K, Oukil N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d’une plante médicinale de la flore d’Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothér.* 10: 2-9.

Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, Soukri A. (2010). Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *Afric. J. Biotech.* 9: 4251-4258.

Benalia M. (2016). Etude de la fraction lipidique de quelques graines de Cucurbitacées. Thèse de l’université de Kasdi Merbah Ouergla.

Benavente-García, O., Castillo, J., Del Baño, M.J., Lorente, J. (2001). Improved Water Solubility of Neohesperidin Dihydrochalcone in Sweetener Blends. *J. Agric. Food Chem.* 49:189 - 191.

Bennetau-Pelissero,C. (2014). Polyphénols et voies de signalisation, données récentes. *Cah. Nutr. Diet*, 49 : 151-159.

Bhandari Shiva Ram and Lee Jun Gu (2016). Ripening-Dependent Changes in Antioxidants, Color Attributes, and Antioxidant Activity of Seven Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Cultivars. *J. Anal. Metho. Chem.* Volume 2016: 13 pages.

Bhatt K.R., Mehta R.K., Shrivastana P.N. (1997). A simple method of recording anti-inflammatory effects on rat paw oedema. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 21: 399-400.

Billerbeck V. G, Roques C, Vanière P, Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *J. Hyg.* 3: 248-251.

Bloor S.J. (2001). Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Meth. Enzymol.* 335 :3-14.

Borys, J.M., Ghafari, Y., Alizier, B., Mayer, J., Mercier, A. (2012). Épices et contrôle du poids. *Phytothér.* 10:105–108.

Bouayed J, Bohn T. (2016). Dietary derived antioxidants: implications on health. In: Bouayed J, Bohn T, editors. *Nutrition, Well-Being and Health. Croatia: InTech.* P: 1–22.

Boufadi Yasmina Mokhtaria, Soubhye Jalal, Neve Jean, Van Antwerpen Pierre, Riazi Ali (2016). Atimicrobial of in Algerian propolis extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* doi:10.1111/ijfs.13247.

Bougandoura Amina, Brigida D'Abrosca, Souad Ameddah, Monica Scognamiglio, Ratiba Mekkiou, Antonio Fiorentino, Samir Benayache, Fadila Benayache (2016). Chemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. *Fitoterapia.* doi: 10.1016/j.fitote.2016.01.010.

Bouvier F., Claude S., Mutterer J., Camara B. (2003). Oxidative Remodeling of Chromoplast Carotenoids: Identification of the Carotenoid Dioxygenase CsCCD and CsZCD Genes Involved in *Crocus* Secondary Metabolite Biogenesis. *plant cell.* V 15: 47-62.

Brantner A.Z, MalesS, Pepeljnjak et Antolic A. (1996). Antimicrobial activity of *Paliurus spinachristi* mill. *J. Ethnopharmacol.* 52:119–122.

Britton L.N. (1989). Permeation and diffusion of environmental pollutants through flexible polymers. *J. appl. Polym. Sci.* V38: 227-236.

Britton G. (2004). carotenoids handbook. Basel ; Boston : Birkhäuser Verlag, Springer Nature Book Archives Millennium

Britton, G. (2008). Functions of intact carotenoids. *Carotenoids.* Volume 4.

Britton, G. and F. Khachik (2009). Distribution of carotenoids in vegetables and fruits. Carotenoids: Volume 5: Nutrition and health. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander and Synnove. Basel Switzerland, Birkhauser Verlag AG: 45-66.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales (3 éd). Tec et Doc (Ed), Paris, 1120p.

Buenger, J., Ackermann, H., Jentzsch, A., Mehling, A., Pfitzner, I., Reiffen, KA., Schroeder, KR., Wollenweber, U. (2006). An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. *Int. J. Cosm. Sci.* 28 : 135-146.

Bunea Andrea , Mirjana Andjelkovic, Carmen Socaciu, Otilia Bobis, Madalina Neacsu, Roland Verhé, John VanCamp (2008). Total and individual carotenoids and phenolic acids

content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food chem.* 108: 649-656.

Butler, M.S., (2004). The roles of natural chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67 : 2141-2153.

Buzzini P. (2009). Basidiomycetous yeasts for production of carotenoids. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology*: 56-68.

-C-

Calo P. Velazquez J. B., Sieiro C., Blanco P., Longo E., Villa T. G. (1995). Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. *J. Agric. Food Chem.* 43, 5: 1396-1399.

Carvalho de Lucia Maria Jaeger, Patrícia Barros Gomes, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, Sidney Pacheco, Pedro Henrique Fernandes do Monte, José Luiz Viana de Carvalho, Marília Regini Nutti, Ana Cristina Lima Neves (2012) . Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Res. Int.* 47 : 337–340.

Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry.* 92:491–497.

Chen, A.Y., Chen, Y.C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food. Chem.* 138:2099–2107.

Choi Y.M, Noh D.O, Cho S.Y, Suh H.J, Kim K.M, Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 39: 756-761.

Chun S.S, Vatter D.A, Lin Y.T, Shetty K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process. Biochem.*, 40: 809-816.

Clarke J.M., Sabrena M.B., Edward C., Jo Rae. W. (1996). Surfactant protein A protects growing cells and reduced TNF- α activity from LPS-stimulated macrophages. *Am. J. Physiol.* 271: 310-319.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M100–S18. (2008). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne.

Cordell, G.A., Colvard, M.D., (2005). Some Thoughts on the Future of Ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 100: 5-14.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu J.P, Cimanga K, et al., (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61: 71-76.

Cotelle N. (2000). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top Med. Chem.* 1: 569-590.

Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564–582.

Cristiane H. Azevedo-Meleiro and Delia B. Rodriguez-Amaya (2007). Qualitative and Quantitative Differences in Carotenoid Composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4027-4033.

Cronquist A. (1981). The Evolution and Classification of flowering plants. Second edition. 159-261.

Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Martinez-Alvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A., Lopez Rivas C., Requena T. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.* 16: 372–382.

Cutting, S. M. (2008). Colorsore: new sources of naturel, gastric stable, food additives, colorants and novel functional foods. Small collaborative project. *Technical Annex: proposal n°207948:1-84.*

-D-

Daels-rakotoarison D. (1999). Extraits polyphénoliques d'aubepine, de cola et d'eglantier. *Thèse de doctorat.* Université de Lille II. France. 172 (64).

Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 23:174–181.

Dangles, O., Fargeix, G., Dufour, C. (1999). One-electron oxidation of quercetin and quercétine derivatives in protic and non protic media. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1387-1395.

Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Nijima, A., Matsuo, H., Kangawa, K., Nakazato, M. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterol.* 123: 1120-8.

Davies B. H., Taylor R.F. (1976). Carotenoids biosynthesis - the early steps. *Main Lectures Presented at the Fourth International Symposium on Carotenoids, Berne, Switzerland.* 211-221.

Del Carmen Recio Maria, Salvador Máñez, Salvador Máñez, Inés Gil, Cristina Gómez, Rosa-Maria Giner, Peter G. Waterman, and José-Luis Ríos (1999). A Glycosyl Analogue of Diacylglycerol and Other Antiinflammatory Constituents from *Inula viscose*. *J. Nat. Prod.* 62 : 601–604.

Delia B. Rodriguez-Amaya (2010). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food Carotenoids. *J. Food Comp. Anal.* 23 : 726–740.

Deng Gui-Fang , Chen Shen, Xiang-Rong Xu, Ru-Dan Kuang , Ya-Jun Guo, Li-Shan Zeng, Li-Li Gao, Xi Lin , Jie-Feng Xie , En-Qin Xia , Sha Li , Shan Wu , Feng Chen , Wen-Hua Ling and Hua-Bin Li (2012). Potential of Fruit Wastes as Natural Resources of Bioactive Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 13 : 8308-8323.

Deng Gui-Fang, Xi Lin, Xiang-Rong Xu, Li-Li Gao, Jie-Feng Xie, Hua-Bin Li (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *J. fonct. foods.* 5 : 260 –266.

Descat F. (2001). Hématologie du rat: hémmogramme et myélogramme. Thèse d'exercice, Ecole Nationale de Toulouse-ENVT. 110p.

De Silva V, El-Metwally A, Ernst E, Lewith G, Macfarlane GJ; Arthritis Research Campaign working group on complementary and alternative medicines. (2011). Evidence for the efficacy

of complementary and alternative medicines in the management of fibromyalgia: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*, 50(5):911-20.

Dewick P.M. (2002). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach.* 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd. England : 1-515.

Di Mascio, P., Sundquist, A.R., Devasagayam, T.P.A., Sies, H. (1992). Assay of lycopene and other carotenoids as singlet oxygen quencher. *Methods Enzymol.* 213 : 429-32.

Dimitrov I., Kamenov V., Angelova P., Petrov M. (2014). Cocentration of C-reactive protein in white adipose tissue, liver and blood serum of male Wistar rats. *Trakia J. sci.* 12: 29-33.

Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. (2007). Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, Part 2. *Chem. Pharm. Bulletin.* 55: 689–728.

Donnelly L.E, Newton R, Kennedy G.E, Fenwick P.S, Leung R.H, Ito K, Russell R.E et Barnes P.J. (2004). Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 287: 774-783.

Dragovic Verica-Uzelac, Karmela Delonga, Branka Levaj, Senka Djakovic and Jasna Pospisil (2005). Phenolic Profiles of Raw Apricots, Pumpkins, and Their Purees in the Evaluation of Apricot Nectar and Jam Authenticity. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 4836–4842.

Dufosse, L. (2006). Microbial and microalgal carotenoids as colourants and supplements Carotenoids, V 5: *Nutr. health.* AG: 83-98.

Dugo, P., Herrero,M., Giuffrida,D., Ragonese,C., Dugo,G., Mondello,L. (2008). Analysis of native carotenoid composition in orange juice using C30 columns in tandem. *J. Sep. Sci.* 31: 2151 – 2160.

Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M.(2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* 13(1):79–106.

-E-

Eccleston E. (1977). Normal hematological Values in rats, mice and marmosets. *Comparative Clinical Hematology- Blacwell Scientific- Chap* 15. 611-617.

Editorial (2005). Dual inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase: a novel therapeutic approach to inflammation? *Revue de Rhumatisme.* 72: 379-382.

Eldahshan O.A., Azab S.S. (2012). Anti-inflammatory Effect of Apigenin-7-neohesperidoside (Rhoifolin) in Carrageenin-Induced Rat Oedema Model, *J. Appl. Pharm. Sci.* 02 : 74-79.

El Kadi F.Z., Bénali A.I., Bénali M. and Belbraouet S. (2014). Effect of Sodium Metabisulphite on Blood Metabolic Statuts of Wistar Rats. *Food Nutr.Sci.* 5: 1529-1537.

Elqaj M, Ahami A. et Belghyti D. (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

Escalada de Marina F. Pla, Carmen A. Campos, Lía N. Gerschenson, Ana M. Rojas (2009). Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poirer) mesocarp tissue as a food matrix for supplying iron in a food product. *Journal of Food Engineering* 92 : 361–369.

Essawi T. et Srour M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharm.* 70 : 343-349.

Etlinger H.M., Coe J.E. (1986). Complement Activation by female protein, the hamster homologue of human C-reactive protein. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 81:189-191.

Everett, S.A., Dennis, M.F., Patel, K.B., Maddix, S., Kundu, S.C., Willson, R.L. (1996). Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free-radicals by the nutritional antioxidant beta carotene. *J. Biol. Chem.* 271 : 3988-94.

Ezeonwumelu J.O.C, Omar A.N, Ajayi A.M, Okoruwa A.G, Tanayen J.K, Kiplagat D.M, Okpanachi O.A, Abba S, Ezekiel I, Onchweri A.N, Okonkwo C.O, Byarugaba F.(2012). Phytochemical screening, acute toxicity, anti-inflammatory and antipyretic studies of aqueous extract of the root of *Flueggea virosa* (Roxb. ex Willd.) in rats. *Int. J. Pharm. Biomed. Sci.* 3 : 128-135.

-F-

Famsworth, N.R.; Arkerle, O.; Bingel, A.S.; Soejarto, D.D.; Guo, Z., (1985). Bull. WHO 63, 965-981.

FAO. (2016). Organisation des nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).

Farombi E.O. (2003). African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *J. biotech.* 2(12): 662-671.

Faure H, Fayol V, Galabert C, Grolier, P., Le Moël, G., Steghens, J.P., Nabet, F. (1999). Les caroténoïdes : 2. Pathologies et études de supplémentation. *Ann. Biol. Clin.* 57 : 273-82.

Ferrazzano, G.F., Roberto, L., Amato, I., Cantile, T., Sangianantoni, G., Ingenito, A. (2011). Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: An *in vivo* study. *J. Med. Food*, 14:907-11.

Fissore Eliana N., Nora M. Ponce, Eva A. Wider, Carlos A. Stortz, Lía N. Gerschenson, Ana M. Rojas (2009). Commercial cell wall hydrolytic enzymes for producing pectin-enriched products from butternut (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret). *J. Food Eng.* 93 : 293-301.

Fleurentin, J.; Pelt, J.-M., (1990). Les plantes médicinales. *La Recherche* 21, 811-818.

Fontana José D., Madalena Baron, Manoel F. Guimaraes, Marcelo Maraschin, Jose A. Florêncio, Tania M. B. Bonfim, Miriam B. Chocial, Cirano Ulhoa (1997). Astaxanthinogenesis in the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Fuel Chem.* 305-314.

Fraenkel L., Bogardus Jr. S.T., Concato J., Wittink D.R. (2004). Treatment options in knee osteoarthritis: the patient's perspective. *Arch. Intern. Med.* 164: 1299-1304.

Frigaard, N-U. (2008). Carotenoid biosynthesis, function, and evolution. University of Copenhagen.

Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin.Nutr*, 61: 549-554.

-G-

Garcia-Lafuente, A., Guillamon, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martínez, J.A. (2009).Flavonoids as antiinflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* 58:537-552.

Garcia P.F, Marin E, Catiigueral S, Adzet T. (1996). Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis*: Involvement of an antioxidant mechanism. *Life Sci.* 59: 2033-2040.

Garcia-Perez, M.E. (2008). Caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune: Etude de leur capacité antioxydante. Université Laval.

Gaziano J.M et Gibson C.M. (2006). Potential for drug-drug interactions in patients taking analgesics for mild-to-moderate pain and low-dose aspirin for cardioprotection. *Am. J. Cardiol.* 97: 23-9.

Genevois C. Flores S., M. de Escalada pla (2014). Effect of iron and ascorbic acid addition on dry infusion process and final color of pumpkin tissue. *LWT- Food sci. technol.* V 58: 563-570.

Geraets L, Moonen H.J, Brauers K, Wouters E.F, Bast A et Hageman G.J. (2007). Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *J. Nutr.* 137: 2190-2195.

Gerster, H.G. (1997). The potential role of lycopene for human health. *J. Am .Coll .Nutr*, 16 : 109-26.

Giffen P.S., Turton J., Andrews C.M., Barrett P., Clarke C.J., Fung K.W., Munday M.R., Roman I.F., Smyth R., Walshe K., York M.J. (2003). Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch. Toxicol.* 77: 392-402.

Giovanelli G, Buratti S. (2009). Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chem.* 112: 903-908.

Gliemmo M.F., Latorre M.E., Gerschenson L.N., Campos C.A. (2009). Color stability of pumpkin (*Cucurbita moschata*, *Duchesne ex Poiret*) puree during storage at room temperature: Effect of pH, potassium sorbate, ascorbic acid and packaging material. *LWT - Food Sci. Technol.* 42 : 196–201.

Gloria N. F., Soares N., Brand C., Oliveira F. L., Borojevic R., Teodoro A. J. (2014). Lycopene and beta-carotene induce cellcycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines. *Anticanc. Res.* 34: 1377–1386.

Gonzalez E, Begoña de Ancos and M. Pilar Cano (2000). Effect of High-Pressure Treatment on the Carotenoid Composition and the Radical Scavenging Activity of Persimmon Fruit Purees. *J. Agric. Food Chem.* 48 : 3542–3548.

Gonzalez Eva., Montenegro M. A., Nazareno M. A., Lopez-de-Mishima B. (2001). Carotenoid composition and vitamin A value of an Argentinian squash (*Cucurbita moschata*) *Arch. Latinoam. Nutr.* 51: 395-404.

Gonzalez-Gallego J.M., Garia Mediavilla V., Sanchez-Campos S., Tunon M.J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British J. Nutr.* 104: S15-S27.

Grigoras C.G. (2012). Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie detransformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Thèse à l'Université d'Orléans.

Guignard J.L. (1996). Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris, 160 p.

Gundogdu Ali, Celal Duran H., Basri Senturk, Mustafa Soylak, Mustafa Imamoglu, Yunus Onal (2013). Physicochemical characteristics of a novel activated carbon produced from tea industry waste. *J. Anal. App. Pyrolysis.* 104 : 249-259.

Gupta R.K, Nand P, Drabu S. (2012). *In vitro* antibacterial and antioxidant potential of medicinal plants used in the treatment of acne. *Int. J. Pharm. Sci.* 4: 185-190.

Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in Olive Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 966-968.

Gu Z., Chen D., Han Y., Chen Z., Gu F. (2007). Optimization of Carotenoids extraction from rhodobacter sphaeroids. *LWT- Food sci. technol.* V 41: 1082-1088.

-H-

Haddad, N. F., Teodoro, A. J., Leite de Oliveira, F. L., Soares, N., de Mattos, R. M., Hecht, F., Dezone, R. S., Vairo, L., Goldenberg, R. C., Gomes, F. C. A., de Carvalho, D. P., Gadelha, M. R., Nasciutti, L. E., & Miranda-Alves, L. (2013). Lycopene and β -carotene induce growth inhibition and proapoptotic effects on ACTH-secreting pituitary adenoma cells. *PLoS ONE*, 8, 62773.

Hagiwara Teruhiko, Tetsuko Yasuno, Keiichi Funayama, Sukeji Suzuki (1998). Determination of lycopene, a-carotene and b-carotene in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring. *J. Chromatogra. B.* 708 : 67-73.

Halliwel, B. (2006). Polyphenols: antioxidant treats for healthy living or covert toxins. *J. Food Agric.* 86: 1992-1995.

Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 845-850.

Harada, N., Okajima, K. (2009). Effects of capsaicin and isoflavone on blood pressure and serum levels of insulin-like growth factor-I in normotensive and hypertensive volunteers with alopecia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 1456-1459.

Harborne, Jeffrey B., Marby, Helga, Marby, T. J. (2009). The flavonoides. *Springer Link J.* 1: 1204.

Harborne J.B., Williams C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* V 55: 481-504.

Herrmann, K. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28: 315-347.

Hoult J.R, Moroney M.A, Paya M. (1994). Actions of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. *Methods Enzymol.* 234: 443–54.

-I-

Ichikawa D, Matsui A, Imai M, Sonoda Y et Kasahara T. (2004). Effect of various catechins on the IL-12 production by murine peritoneal macrophages and a macrophage cell line. *Biol. Pharm. Bull.* 27 : 1353-1358.

Ingle Pravin V. , Patel Devang M. (2011). C- Reactive Protein in various disease condition. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 4 : 9-13.

Iswaldi Ihsan, Ana María Gómez-Caravaca, Jesús Lozano-Sánchez, David Arráez-Román, Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernández-Gutiérrez (2013). Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Res. Int.* 50 : 77–84.

-J-

Jacobo-Valenzuela Noelia, José de Jesús Zazueta-Morales, José Alberto Gallegos-Infante, Floridelia Aguilar-Gutierrez, Irma Leticia Camacho-Hernandez, Nuria Elizabeth Rocha-Guzman, Rubén Francisco Gonzalez-Laredo (2011). Chemical and Physicochemical Characterization of Winter Squash (*Cucurbita moschata* D.). *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 39:34-40.

Jako C, Coutu C, Roewer I, Reed DW, Pelcher LE, Covello PS (2002). Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. *J. Plant. Sci.* 163:141–145.

Jankovic, B., Loblaw D.A., Nam.R. (2010). Capsaicin may slow PSA doubling time: case report and literature review. *Canad. Uro. Asso. J.* 4, Issue 1.

Jan SH, Lim JW, Kim H. (2009). Beta-carotene inhibits Helicobacter pylori-induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in human gastric epithelial AGS cells. *J. Physiol. Pharmacol.* 60:131–7.

Jin, J., Lin, G., Huang, H., Xu, D., Yu, H., Ma, X., Zhu, L., Ma, D., Jiang, H. (2014). Capsaicin mediates cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells via stabilizing and activating p53. *Int. J. Biol. Sci.* 10: 285–295.

Joo, J.I., Kim, D.H., Choi, J.W., Yun, J.W. (2010). Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. *J. Proteome Res.* 9: 2977–2987.

Joseph J.A, Shukitt-Hale B et Lau, F.C. (2007). Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence. *In Annals of the New York Academy of Sciences.* 1100: 470–485.

Jung, M.Y, Kang, H.J, Moon, A. (2001). Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Canc. Lett.* 165 :139–145.

Jung W.J., Sung M. (2004). Effects of major dietary antioxidants on inflammatory markers of RAW 264•7 macrophages. *Biofactors.* 21: 131-137.

Junxin Wua, Zhijian Changa, Qingshan Wub, Haixian Zhanc, Shulian Xiea (2011). Molecular diversity of Chinese *Cucurbita moschata* germplasm collections detected by AFLP markers. *Sci. Hortic.* 128 :7–13.

Justino C.G, Santosa M.R, Canarioa S, Borgesa C, Florencio M.H, Miraa L. (2004). Plasma quercetin metabolites: structure-antioxidant activity relationships. *Arch. Biochem. Biophys.* 432: 109-121.

-K-

Kamarudin El Zawane, Qamar Uddin Ahmed, Abul Bashar Mohammed Helaluddin, Zuvairea Nazren Mohd Sirajudin, Ahmad Jalal Khan Chowdhury (2014). Studies on bactericidal efficacy of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne) peel. *J. Coastal Life Med.* 2014: 146-153.

Kang Baoshan, Wen-en Zhao, Yaobing Hou, Peng Tian (2010). Expression of carotenogenic genes during the development and ripening of watermelon fruit. *Sci. Hortic.* 124 : 368–375.

Kapinga R., Ndunguru J., Mulokozi G., Tumwegamire S. (2009). Impact of common sweetpotato viruses on total carotenoids and root yields of an orange-fleshed sweetpotato in Tanzania. *Sci. Hortic.* 122 : 1–5.

Karthikeyan A, Shanthi V, Nagasathaya A. (2009). Preliminary phytochemical and antibacterial screening of crude extract of the leaf of *Adhatoda vasica*. L. *Int.J. Green Pharm.* 3: 78-79.

Kaulmann Anouk, Torsten Bohn (2014). Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr. res.* 2-23.

Khabbal Y, Ait El Cadi M, Alaoui K, Faouzi Mg.A, Cherrah Y. (2006). Activité anti-inflammatoire de *Zygophyllum goetulum*. *Phytothér.* 5: 227-229.

Khachik F., Beecher G. R. (1988). Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography I. Quantification of Carotenoids and related esters by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 36: 929-937.

Ki Hyun Kim, Eunjung Moon, Sang Un Choi, Sun Yeou Kim, Kang Ro Lee (2013). Polyphenols from the bark of *Rhus verniciflua* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Phytochem.* 92 : 113–121.

Kim H.P, Son K.H, Chang H.W et Kang S.S. (2004). Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96: 229 – 245.

Kim J.A, Kim D.K, Kang O.H, Choi Y.A, Park H.J et al., (2005). Inhibitory effect of luteolin on TNF-alpha-induced IL-8 production in human colon epithelial cells. *Int. Immunopharmacol.* 5:209–17.

Kim J.Y, Park S., Yun K.J. (2008). Isoliquiritigenin Isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264•7 macrophages. *Eur. J. pharmacol.* 584: 175-184.

Kim, T.Y., Yeo, S.H., Choi, H.S., Kim, J.S. (2011). Polyphenols from the bark of *Rhus verniciflua* and their biological evaluation on antitumor and anti-inflammatory activities. *Phytochem.* 92 : 113–121.

Kimura H, Sawada T, Oshima S, Kozawa K, Ishioka T, Kato M. (2005). Toxicity and Roles of Reactive Oxygen Species. *Current Drug Targets – Inflamm. Allergy*, 4: 489-495.

Kimura M., Kobori C. N., Rodriguez-Amaya D. B., Nestel, P. (2007). Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chem.* 100: 1734-1746.

Kirkova M., Kassabova T., Russanov E. (1992). Activity of antioxydant enzymes and lipid peroxidation Gen. *Pharmacol.* 23:503-507.

Knotkova, H., Pappagallo ,M., Szallasi, A. (2008). Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief: farewell or revival. *Clin. J. Pain.* 24:142–154.

Kohlmeier L, Hastings S.B. (1995). Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1370-6.

Kong A.N, Yu R, Chen C, Mandlekar S et Primiano T. (2000). Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch. Pharm. Res.* 23: 1-16.

Kortei, N.K., Odamtten, G.T., Obodai, M., Appiah, V., Akuamoa, F., Adu-Bobi, A.K., Annan, S.N.Y., Armah, J.N.O., Acquah, S.A. (2014). Evaluating the Effect of Gamma Radiation on the Total Phenolic Content, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Dried *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex. Fr) Kummer) Stored in Packaging Materials. *Adv.Pharm.* 1.

Kraus A.L. (1980). Reserach methodology in: The Laboratory rats. Vol 2. *Academic Press*. Chap 1 : 5-19.

Krinsky, N. I., Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.* 26(6): 459-516.

Kurz Christina, Reinhold Carle, Andreas Schieber (2008). Characterisation of cell wall polysaccharide profiles of apricots (*Prunus armeniaca* L.), peaches (*Prunus persica* L.), and pumpkins (*Cucurbita* sp.) for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chem.* 106 : 421–430.

Kusdiyantini Endang, Philippe Gaudin, Gérard Goma, Philippe J. Blanc (1998). Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol. lett.* 20: 929-934

-L-

Landolfi R., Richard L. M., Manfred S. (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: Structure-activity relations. *Biochem. pharmacol.* 33: 1525-1530.

Laroche M.J., Rousselet F. (1990). Les animaux de laboratoire. Ethiques et bonnes pratiques. *Masson*. Chap 7 : 167-187.

Larson, R. A. (1988). The antioxidant of higher plants. *Phytochem.* 27: 969–978.

Lau, J.K., Brown, K.C., Dom, A.M., Witte, T.R., Thornhill, B.A., Crabtree, C.M., Perry, H.E., Brown, J.M., Ball, J.G, Creel, R.G., Damron, C.L., Rollyson, W.D., Stevenson, C.D., Hardman, W.E., Valentovic, M.A., Carpenter, A.B., Dasgupta, P.(2014). Carotenoids induces apoptosis in human small cell lung cancer via the TRPV6 receptor and the calpain pathway. *Apoptosis*, 19:1190–1201.

Lee C. Y., Smith N. L., Robinson R. W. (1984). Carotenoids and vitamin A value of fresh and canned winter squashes. *Nutr. Rep. Int.* 29:129-133.

Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Su Q., Donin N.M., Pastorino S., Purow B.W., Christopher N., Zhang W., Park J.K., Fine H.A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer.cell.*, 9 : 391–403.

Lee K.H. J., (2004). Current development in the discovery and design of new drug candidates from. Plant natural product leads. *J. Nat. Prod.* 67, 273-283.

Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wines. *J. Agric Food Chem.* 51:7292–5.

Leelaprakash G., Mohan Dass S. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ennicostema Axillare*. *Int. J. Drug Develop. & Res.* 3: 189-196.

Lee Y., Howard L. R., Villalon B. (1995). Flavonoid and ascorbic acid content and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. IFT Abstract, 55, 79.

Leiro José M., Monica Varela, M. Carla Piazzon, Juan A. Arranza, Manuel Noya, Jesus Lamas (2010). The anti-inflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor- α (TNF- α) pre-mRNA splicing. *Mol. Immunol.* 47 : 1114–1120.

Liang Y.C., Huang Y.T., tsai S.H. (1999). Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apegenin and related flavonoides in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 20: 1945-1952.

Lijima K., Yoshizumi M., Hashimoto M., Kim S., Eto M., Ako J., Liang Q.Y., Sudoh N., Hosoda, K., Nakahara K., Toba K., Ouchi Y. (2000). Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation*, 101:805–811.

Li Q. and Fu C. Huan S. (2005). A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods Hum. Nutr.* 61: 73–80.

Limasset B., Christian le D., Jean christophe D., Tiiu O., Marcelle D., Andres crastes De P. (1993). Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils: Multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR). *Biochem. pharmacol.* 46: 1257-1271.

Lock O., Vivanco I., (2003). Analysis of flavonoids in plants. *Curr.Med. Chem.* 20: 6-11.

Luciano-Montalvo Claribel, Isabelle Boulogne and Jannette Gavillán-Suárez (2013). A screening for antimicrobial activities of Caribbean herbal remedies. *Complement. Altern. Med.* 13:126, 2-9.

Luqman S, Rizvi S I. (2006). Protection of lipid peroxidation and carbonyl formation in proteins by capsaicin in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Phytother. Res.* 20: 303-6.

Luo, X.J., Peng, J., Li, Y.J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 650 1–7.

-M-

Macheix, J.J., Fleuriet, A. (1998). Phenolic acids in fruits. In: Rice-Evans CA, Packer L, eds. *Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker, 35-59.

Maiani, G., Caston, M. J. P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodon, I. G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Bohm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res*, 53: S194-S218.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79(5): 727 – 747.

Manjeet K.R et Ghosh B. (1999). Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumornecrosis factor-alpha production in murine macrophages. *Int. J. Immunopharm*. 21: 435-443.

Manna S.K, Mukhopadhyay A et Aggarwal B.B. (2000). Resveratrol suppresses TNF induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J. Immunol*, 164 : 6509-6519.

Mansour Insaf Fatima Zohra (2016). Détermination des principes nutritionnels et fonctionnels de la pulpe du fruit du jujubier. Etude de son potentiel antioxydant et anti-inflammatoire. Thèse de doctorat, université de Sidi Bel Abbés.

Marchand L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids. *Biomed. Pharmacother*. 56: 296-301.

Marrack J.R., Richards C.B. (1971). Light scattering studies of the formation aggregates in mixture of antigen and antibody. *J. immunol*. 20: 1019-1040.

Marina F. de Escalada Pla, Carmen A. Campos, Lía N. Gerschenson, Ana M. Rojas (2009). Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poirlet) mesocarp tissue as a food matrix for supplying iron in a food product. *J. Food Eng*. 92 : 361–369.

Marin A., Ferreres F., Tomas-Barberan F. A., Gil M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of pumpkin (*Cucurbita maxima* L.). *J.Agric. Food Chem.*, 52: 3861–3869.

Mata-Gómez L.C., Montañez J.C, Méndez-Zavala A., Aguilar C.N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microb. Cell Fact*. 13:12.

Materska M. (2014). Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *J. Funct. Foods*, 7: 269–277.

Materska M., Perucka I. (2005). Antioxidant Activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem*. 53: 1750-1756.

Matsuno T., Tani Y., Maoka T., Matsuo K., Komori T. (1986). Isolation and structural elucidation of cucurbitaxanthin A and B from pumpkin *Cucurbita maxima*. *Phytochem*. 25: 2837-2840.

Meade E.A., Smith W.L., DeWeitt D.L. (1993). Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J.Biol. Chem*. 268: 661-664.

Meirinhos J, Silva B, Valentão P, Seabra R.M, Pereira J.A, Dias A, Andrade P.B, Ferreres F. (2005). Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars. *Nat. Prod. Res.* 19: 189-195.

Mia-Isabelle, Bee Lan Lee, Meng Thiam Lim, Woon-Puay Koh, Dejian Huang, Choon Nam Ong (2010). Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chem.* 120 : 993–1003.

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52: 673– 751.

Miranda C. L., Steven J. F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M. L., & Buhler D. R. (2000). Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3876–3884.

Mirzoeva O.K, Grishanin R.N, Calder P.C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* 152: 239–46.

Mitchell J.A., Akarasereenont P., Theimermann C., Flower R.J., Vane J.R. (1993). Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 11693-11697.

Mokhtar M., Jan S., Paola D., Francesco C., Paola D., Riazi A., Pavel J., Mondello L.(2014). Determination of the polyphenol content of a *Capsicum annuum* L. extract by liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection and evaluation of its biological activity. *J. Sep.Sci.* 2015, 38: 171–178.

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 : 211-219.

Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochem.* 26: 2231–4.

Mortensen, A., Skibsted, L.H., Evans, C., Everett, S.A. (1997). Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett*, 418 : 91-7.

Moss, G.P. (2000). Nomenclature of lignans and neolignans. *Pure Appl. Chem.* 72, 1493-1523.

Muanda, F.N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de l'Université Paul Verlaine-Metz.

Mulla A.W. (2010). Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract of roots *Adhatodavastica* Linn. *Int. J. Pharm. Tech. Research*, 2:1364-1368.

Mun J.M., Ok H.M., Kwon O. (2014). Corn gluten hydrolysate and capsaicin have complementary actions on body weight reduction and lipid-related genes in diet-induced obese rats. *Nutr. Res.* 34(5):458-65.

Murillo E., Antonio J. M.M., Falcón P. (2010). Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. *Food Chem.* 122 : 167–172.

Murkovic M., Mulleder U., Neunteufl H. (2002). Carotenoid content in different varieties of pumpkins. *J. Food Compos. Anal.* 15: 633-638.

Muruganantham N., Solomon S., Senthamilselvi M.M. (2016). Antimicrobial activity of *Cucurbita maxima* flowers (Pumpkin). *J. Pharma. Phytochem.* 5: 15-18.

-N-

Nakanishi Y., Kodama H., Murai T., Mikami T., Izawa H. (1991). Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *Am. J. Vet. Res.* 52: 397-401.

Nantel F, denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters K.M, Chan C.C. (1999). Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 128: 853–859.

Nawirska-Olszanska A., Anita B., Anna S.L., Alicja Z. K. (2014). Characteristics of organic acids in the fruit of different pumpkin species. *Food Chem.* 148 : 415–419.

Ndhlala A.R, Moyo M, Van Staden J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules. *Molecules*, 15: 6905-6930.

Ndip R.N, Tarkang A.E.M, Mbullah S.M, Luma H.N, Malongue A, Ndip L.M, Nyongbela K,

Wirmum C, Efange S.M.N. (2007). In vitro anti-Helicobacter pylori activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J. Ethinopharmacol*, 114: 452-457.

Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *J. Microbial. Mol. Biol.* 67: 593-656.

Nkhili E. (2009). Polyphénols de l’Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de l’Université Cadi Ayyad, Mrrakach.

Njoh Ellong Emy, Corinne Billard, Sandra Adenet, Katia Rochefort (2015). Polyphenols, Carotenoids, Vitamin C Content in Tropical Fruits and Vegetables and Impact of Processing Methods. *Food Nutr. Sci.* 6: 299-313.

Noelia Jacobo-Valenzuela, Maróstica-Junior Mario Roberto, Zazueta-Morales José de Jesús, Gallegos-Infante José Alberto (2011). Physicochemical, technological properties, and health-benefits of *Cucurbita moschata* Duchense vs. Cehualca. *Food Res. Int.* 44 : 2587–2593.

-O-

Oh, S.H., Kim, Y.S., Lim, S.C., Hou, Y.F., Chang, I.Y., You, H.J. (2008). Dihydrocapsaicin (DHC), a saturated structural analog of capsaicin, induces autophagy in human cancer cells in a catalase-regulated manner. *Autophagy*, 4: 1009–1019.

O'Leary K.A, Pascual-Tereasa S., Needs P.W, Bao Y.P, O'Brien N.M et Williamson G. (2004). Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat. Res.* 551: 245-254.

Olinski R., Gackowski D., Foksinski M., Rozalski R., Roszkowski K., Jaruga P. (2002). Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic. Bio. Med.* 33: 192-200.

Oliveira M. L. M., Diana C. S. N. P., Belise M. Ol. B., Luana Ol. L., Adriana R. T. & Virginia C. C. G. (2013). Topical Anti-inflammatory Potential of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Oil on Acute and Chronic Skin Inflammation in Mice. *Acta Sci. Veter.* 41: 1-9.

Oliver, J., Mou, A. (2009). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 543 – 555.

Omayma A. Eldahshan¹ and Abdel Nasser B. Singab¹ (2013). Carotenoids. *J. pharm. pharmacochem.* 2: 225-234.

O.M.S. (2002). Promoting the Role of Traditional Medicine in Health Systems: a Strategy for the African Region 2001–2010. Harare, (référence document AFR/RC50/Doc.9/R).

Orallo F., Alvarez E., Camina M., Leiro J.M., Gómez E., Fernández P. (2001). The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.* 61:294–302.

Ossipov M.H., Kovelowski C.J., Porreca F. (1995). The increase in morphine antinociceptive potency produced by carrageenan-induced hindpaw inflammation is blocked by naltrexone, a selective delta-opioid antagonist. *Neurosci. Lett.* 184: 173-176.

Ouédraogo N, Tibiri A, Sawadogo R.W, Lompo M, Hay A.E, Koudou J, Dijoux M.G et Guissou I.P. (2011). Antioxidant anti-inflammatory and analgesic activities of aqueous extract from stem bark of *Pterocarpus erinaceus* Poir.(Fabaceae). *J. Med. Plants Res.* 5: 2047-2053.

Oussou K.R, Yolou S.F, Tue Bi B, Kanko C, Boti J.B, Ahibo C et Casanova J. (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *Europ. J. Sci. Res.* 40(1): 50 -59.

Ozenda P., (1977). Flore du Sahara, Ed. CNRS. PARIS, France, 250-259.

-P-

Padilla J, Leung E, Phipps RP. (2003). Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR-gamma and are killed by PPAR-gamma agonists. *Clin. Immunol.* 103:22–33.

Palozza P., Serini S.(1996). Modulation of intracellular signalling pathways by carotenoids. *Carotenoids, Nutr.health.* 5: 211-234.

Palozza P., Torelli C., Boninsegna A., Simone R., Catalano A., Mele M.C., Picci N. (2012). Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 283: 108–117.

Pandey K.B., Rizvi S.I. (2003). Current Understanding of Dietary Polyphenols and their Role in Health and Disease. *Curr. Nutr. Food Sci.* 5:249-63.

Pandey K.B, Rizvi S.I. (2009). Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to *in vitro* oxidative insult. *Phytother. Res.* 24 : 11-14.

Pan H.C, Jiang Q., Yu Y., Mei J.P., Cui Y.K., Zhao W.J. (2015). Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. *Neurochem. Int.* 80:60–71.

Parry J., Hao Z., Luther M., Su L., Zhou K. and Yu L. (2006) Characterization of Cold Pressed Onion, Parsley, Cardamom, Mullein, Roasted Pumpkin, and Milk Thistle Seed Oils. *J. Am. Oil Chemists' Society*. 83: 847-854.

Parry J.W., Cheng Z., Moore J. and Yu L. (2008) Fatty Acid Composition, Antioxidant Properties, and Antiproliferative Capacity of Selected Cold-Pressed Seed Flours. *J. Am. Oil Chemists' Society*. 85: 457-464.

Patwardhan B., (2005). Ethnopharmacology and drug discovery. *J. Ethnopharmacol.* 100 : 50-52.

Pavan B., Capuzzo A., Forlani G. (2015). Quercetin and quercetin-3-O-glucoside interact with different components of the cAMP signaling cascade in human retinal pigment epithelial cells. *Life. Sci.* 121: 166–173.

Peng J., Li Y.J. (2010). The vanilloid receptor TRPV1: role in cardiovascular and gastrointestinal protection. *Eur. J. Pharmacol.* 627: 1–7.

Pepe Giacomo, Eduardo Sommella, Michele Manfra, Mauro De Nisco, Gian Carlo Tenore, Antonio Scopa, Adriano Sofo, Stefania Marzocco, Simona Adesso, Tiziana Novellino, Pietro Campiglia (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity and fast UHPLC–DAD–IT–TOF profiling of polyphenolic compounds extracted from green lettuce (*Lactuca sativa* L.; var. Maravilla de Verano). *Food Chem.* 167 : 153–161.

Perez-Vizcaino F., Duarte J., Andriantsitohaina R. (2006). Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radical Res.* 40: 1054–65.

Petigny L., Périno S., Minuti M., Visinoni F., Wajsman J., Chemat F. (2014). Simultaneous Microwave Extraction and Separation of Volatile and Non-Volatile Organic Compounds of Boldo Leaves. From Lab to Industrial Scale. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 7183-7198.

Petkova Zh. V. and Antova G.A. (2015). Changes in the composition of pumpkin seeds (*Cucurbita moschata*) during development and maturation. *Grasas y Aceites Int. J. of Fats and Oils.* Vol 66, No 1.

Petti S., Crispian S. (2009). Polyphenols, oral health and disease. *J. Dentistry.* 37: 413-423.

Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 530–6.

Plastina P., Bonofiglio D., Vizza D., Fazio A., Rovito D., Giordano C., Barone I., Catalano S., Gabriele B. (2012). Identification of bioactive constituents of *Ziziphus jujube* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *J. of Ethnopharmacology.* 140: 325-332.

Porter J.W., Lincoln R.E. (1950). Lycopersicon selections contain-ing a high content of carotenes and colorless polyenes II. The mechanism of carotene biosynthesis. *Arch. Biochem.* Vol.27 pp.390-403.

Posadas I., Bucci M., Roviezzo F., Rossi A., Parente L., Sautebin L., Cirino G. (2004). Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependant and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British J. pharmacol.* 142: 331-338.

Prakash Maran J., Mekala V., Manikandan S. (2013). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*. *Carbohydr. Polym.* 92 : 2018– 2026.

Prin L., Hachulla E., Hennache B., Bonnotte B., Dubusquoi S., Abbal M., Faure G., Bouletreau P. (2009). Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Immunol.* 13 :1392-8.

Priyanka Dash, Goutam Ghosh (2016). Proteolytic and antioxidant activity of protein fractions of seeds of *Cucurbita moschata*. *Food Biosci.* Accepted Manuscript.

-Q-

Qian Z.G. (2013) Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Cucurbita moschata* and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.* 30:432–434.

Qian Z.G. (2014). Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Cucurbita moschata* and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.* 101 : 432– 434.

Qiao S., Li W., Tsubouchi R., Haneda M., Murakami K., Yoshino M. (2005). Involvement of peroxynitrite in capsaicin-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Neurosci. Res.* 51:175–183.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Edit.* 50: 586–621.

-R-

Ratheesh M., Shyni G.L., Sindhu G. and Helen A. (2009). Protective Effects of Isolated Polyphenolic and Alkaloid Fractions of *Ruta graveolens* L. on Acute and Chronic Models of Inflammation. *Inflamm.* Vol. 33 : 18- 24.

Reynaud E. (2009). Synthèse organique d'apo-lycopénoïdes : étude des propriétés antioxydantes et complexantes. Thèse de l' Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.

Rice-Evans C. A., and Miller N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Trans. Biochem. Soc.* 24: 790–795.

Rigano D, Formisano C, Basile A, Lavitola A, Senatore F, Rosselli S, Bruno M. (2006). Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. *Phytother. Res.* 21: 395 – 397.

Ringler D.H., Dabich L. (1979). Hematology and biochemistry. *The laboratory rat. V 1.* Academic press. Chap 5: 105-121.

Ritchie R.F. (1967). A simple direct and sensitive technique of the measurement of scientific proteins in cerebrospinal fluid. *J. lab. Clin. Med.* 70: 512-517.

Robards K., Prenzler P.D., Tucke G., Swatsitang P., Glover W. (1995). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66: 401–436.

Rocha Bruno A.M., Claudener S. Teixeiraa, José C. Silva-Filho, Raphael B. Nóbreg, Daniel B. Alencard, Kyria S. Nascimento, Valder N. Freire, Carmem J.S. Gottfried, Celso S. Nagano, Alexandre H. Sampaio, Silvana S. Sampaio, Benildo S. Cavada, Plínio Delatorre (2014). Structural basis of ConM binding with resveratrol, an anti-inflammatory and antioxidant polyphenol. *Int. J. Biol. Macromol.* 5 : 1-7.

Rodriguez-Amaya D.B., Arima H.K. (1990). Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and a pumpkin from northeastern Brazil. *Archivos Latino americanos de Nutricion*, 40:284-292.

Rodriguez-Amaya D. B., Mieko K., Helena T. G., Hana K. A. (1988). Assessment of Provitamin A Determination by Open Column Chromatography/Visible Absorption Spectrophotometry. *J. Chrom. Sci.* V 26 : 624–629.

Rodriguez-Amaya D. B. (2010). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids. *J. Food Compo. Anal.* 23 : 726–740.

Rodriguez V., M.J, Aredes F., P.A., Manca N., M.C., Strasser S., A.M. (2010). Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *J. Agric. Food Chem.* 58:6048-6052.

Roura S.I., Del Valle C.E., Agüero L. and Davidovich L.A.(2007). Changes in apparent viscosity and vitamin C retention during thermal treatment of Butternut squash (*Cucurbita moschata* Duch.) pulp: effect on ripening stage. *J. Food Quality*. 30 : 538–551.

Russo-Marie F., Peltier A., Polla B. (1998). L'inflammation. *John Libbey Eurotext. Paris*.

-S-

Saadabi A.M.A, Moglad E.H. (2011). Experimental Evaluation of Certain Sudanese Plants used in Folkloric Medicine for Their Antibacterial Activity (*In- Vitro* Tests). *J. Appl. Sci. Res.* 7: 253-256.

Saif M.W., Lansigan F., Ruta S., Lamb L., Mezes M., Elligers K., Grant N., Jiang Z.L., Liu S.H., Cheng Y.C. (2010). Phase I study of the botanical formulation PHY 906 with capecitabine in advanced pancreatic and other gastrointestinal malignancies. *Phytomed.* 17: 161-169.

Sakagami H., Hashimoto K., Suzuki F., Ogiwara T., Satoh K., Ito H., Hatano T., Takashi Y., Fujisawa S. (2005). Molecular requirements of lignin–carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochem.* 66: 2108 - 2120.

Sakat S., Juvekar A.R., Gambhire M.N. (2010). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int. J. Pharmacol. Sci.* 2:146-155.

Salvatore M.J, King A.B, Graham A.C et al., (1998). Antibacterial activity of *Lonchocarpol* Am. *J Nat. Prod.* 61: 640–2.

Sánchez A.M., Malagarie-Cazenave S., Olea N., Vara D., Chiloeches A., Díaz-Laviada I. (2007). Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. *Apoptosis*, 12: 2013-2024.

Sanchez-Moreno C. (2002). Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8:121-137.

Sandmann G., Manuela A., Georg S., Oliver K., Peter B., (1999). The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnol.* 17: 233-237.

- Santos A.C., Uyemura S.A., Lopes J.L., Bazon J.N., Mingatto F.E., Cutti C. (1998).** Effects of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 1455-61.
- Santos Michel D. D., Maria C. A., Norberto P. L., and Glória E.P.S. (2006).** Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 2236-2240.
- Saravanan Sh., Karuppusamy A., Thangaraj P. (2014).** Antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of polyphenols from *Passiflora subpeltata* leaves – A promising species of *Passiflora*. *Ind. Crop. Prod.* 54 : 272–280.
- Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 30: 3875–3883.
- Scalbert A., Williamson G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130: 2073- 2085.
- Schroeter M., Sebastian J. (2005).** T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. *Neur. mol. Med.* 7: 183-195.
- Serrano J., Isabel G., Fulgencio S.C. (2005).** Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Res. Int.* Vol. 40: 15-21.
- Sharma U.S, Sharma U.K, Sutar N, Singh A et Shukla D.K. (2010). Anti-inflammatory activity of *Cordia dichotoma* forst f. seeds extracts. *Int. J. Pharm. Anal.* 2: 01-04.
- Shenoy S, Shwetha K, Prabhu K, Maradi R, Bairy KL, Shanbhag T. (2010).** Evaluation of anti-inflammatory activity of *Tephrosia purpurea* in rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 3: 193-5.
- Shen S.C., Lee W.R., Lin H.Y. (2002).** In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin and quercétine on lipopolysaccharide induced nitric oxide and prostaglandin E (2) production. *Eur. J. Pharmacol.* 446: 187-194.
- Shibutani S., Samejima M., Doi S. (2004).** Effects of stilbenes from bark of *Picea glehnii* (Sieb. et Zucc) and their related compounds against feeding behaviour of *Reticulitermes speratus* (Kolbe). *J. Wood Sci.* 50: 439–444.
- Shrive A.K. Metcalfe A.M., Cartwright J.R., Greenhough T.J. (1999).** C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in *Limulus polyphemus* haemolymph: crystal structure of *Limulus* SAP. *J. Mol. Biol.* 290: 997- 1008.
- Siegle J., Rent R., Gewurz H. (1974).** Interaction of C-reactive protein with the complement system. I. Protamin-induced consumption of complement in acute phase sera. *J. Exp. Med.* 140: 631-647.
- Simirgiotis M.J., Schmeda-Hirschmann G. (2010).** Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217, 443–449.
- Simone R.E., Russo M., Catalano A., Monego G., Froehlich K., Boehm V. (2011).** Lycopene inhibits NF- κ B-mediated IL-8 expression and changes redox and PPAR γ signaling in cigarette smoke-stimulated macrophages. *PLoS One.* 6: 19652.
- Siracusa L., Saija A., Cristani M., Cimino F., D'Arrigo M., Trombetta D., Rao F., Ruberto G. (2011).** Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves — Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*, 82: 546–556.

Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G.J.E. (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157: H7. *Ital. J. Food Sci.* 13: 65–75.

Smith V.V., Halpern B.P. (1986). Selective suppression of judged sweetness by ziziphins. *Physiol. Behav.* 30: 867-874.

Soares R., Azevedo I. (2006). Apigenin: is it a pro- or anti-inflammatory agent?, *Am. J. Pathol.* 1762- 1763.

Solanki H. K., Dushyant A. S., Pankaj M. M., Chirag A. P. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats. *Int. J. Biol. Macromol.* 72 : 1277–1282.

Soobrattee M.A, Neergheen V.S, Luximon-Ramma A, Aruoma O.I, Bahorun T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res.* 579: 200-213.

Stahl W., Sies H. (1996). Perspective in biochemistry and biophysics. Lycopene : a biologically important carotenoid for human ? *Arch. Biochem. Biophys.* 336 : 1-9.

Stevanovic T., Perrin D. (2009). Chimie du bois. Nancy, 241 p: Presses polytechniques et universitaires romandes.

Stoclet J.C., Schini-Kerth V.B. (2011). Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. *Annales Pharmaceutiques Françaises, Elsevier Masson*, 69 :78-90.

Surh Y.J. (2002). More than spice: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *J. Natl. Cancer Inst.* 94:1263–1265.

Suzuki K., Takashi I., Shuji H., Junichi O., Yasuhiro K., Yoshinori I., Nobuyuki H. (2010). Association of serum carotenoids with high molecular weight adiponectin and inflammation markers among Japanese subjects. *Clinica. Chimica. Acta.* 411 :1330–1334.

Sy C. (2011). Nouveaux caroténoïdes issus de bactéries marines : étude de leur stabilité, de leur pouvoir antioxydant et de leur biodisponibilité à l'aide de modèles chimiques et biologiques. Comparaison avec les propriétés fonctionnelles de caroténoïdes de référence. Thèse de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse.

-T-

Tabaczar S., Domeradзка K., Czepas J., Piasecka-Zelga J., Stetkiewicz J., Gwozdziński K., Koceva-Chyla A. (2014). Anti-tumor potential of nitroxyl derivative Pirolin in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model: A comparison with quercétine. *PHAREP*, 256: 1–8.

Talcott S.T., Howard L.R. (1999). Chemical and sensory quality of processed carrot puree as influenced by stress-induced phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47(4):1362-6.

Tao W., Jiehong Z., Yafeng Z., Jiashu C. (2008). Characterization and inheritance of a bush-type in tropical pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne). *Sci. Horticult.* 114 : 1–4.

Thangavel P.,Vaiyapuri M. (2013). Antiproliferative and apoptotic effects of naringin on diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats. *Biomed.Aging.Path.* 3:59–64.

Thoennissen N.H., O'Kelly J., Lu D., Iwanski G.B., La D.T., Abbassi S., Leiter A., Karlan B., Mehta R., Koeffler H.P. (2010). Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and - negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene*, 29: 285–296.

Tocchini L. S., Mercadante A. Z. (2001). Extraction and determination of bixin and norbixin in annatto spice. *Food sci. technol.* 21: 310–313.

Tordera M, Ferrandiz M.L, Alcaraz M.J. (1994). Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. *Z Naturforsch [C]*. 49: 235–40.

Torres Gama Juliana Julian, Antonio Carlos Tadiotti, Célia Maria de Sylos (2006). Comparison of Carotenoids content in Tomato, Tomato pulp and Ketchup by Liquid Chromatography. *Alim. Nutr.* v.17, n.4, p.353-358.

Quasim D. C., MC Millan, D.Talwar, N. Sattar, D.ST. J. O'reilly, J. Kinsella (2005). Lower concentrations of carotenoids in the critically-ill patient are related to a systemic inflammatory response and increased lipid peroxidation. *Clinic. Nutr.* 22(5): 459–462.

Trease G.E, Evans W.C. (1989). Textbook of Pharmacognosy.13th Edn. Balliere Tindall, London.
Tsou M.F., Lu H.F., Chen S.C., Wu L.T., Chen Y.S., Kuo H.M., Lin S.S., Chung J.G. (2006). Involvement of Bax, Bcl-2, Ca²⁺ and caspase-3 in capsaicin-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. *Anticancer. Res.* 26: 1965–1971.

Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M et al., (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 50: 27–34.

Tundis R., Loizzo M.R., Menichini F., Statti G.A., Menichini F. (2008). Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. *Mini Rev. Med. Chem.* 8 : 399-420.

Tuoya B. N., Shimoishi Y., Murata Y., Tada M., Koseki M., Takahata K. (2006). Apoptosis induction by dohevanil, a DHA substitutive analog of capsaicin, in MCF-7 cells. *Life Sci*, 78: 515–519.

Tyler V.E., (1999). Phytomedicines: back to the future. *J. Nat. Prod.* 62: 1589-1592.

-U-

Umapathy E., Ndebia E.J., Meeme A., Adam B., Menziwa P., Nkeh-Chungag B.N., Iputo J.E. (2010). An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation, *J. Med. Plant. Res.* 4 : 789-795.

-V-

Vadivu R. and Lakshmi K.S. (2008). *In vitro* and *In vivo* anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp laurina. *Bangladesh J. Pharmacol.* 3: 121-124.

Valenzuela G. M., Ariadna S. S., Alicia L. T., Mabel R. G., Alicia L. C., María C. G., Andrea W. (2016). Evaluation Polyphenol Content and Antioxidant Activity in Extracts of *Cucurbita spp.* *Open Access Library Journal.* 1: 1-6.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D, Mazur M., Telser J. (2007).Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biology*. 39: 44–84.

Van Acker S.A., Koymans L.M., Bast A. (1993). Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.* 15: 311.

Van Acker S.A, Van den Berg D.J, Tromp M.N, Griffioen D.H, van Bennekom W.P, van der Vijgh W.J et al., (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 20: 331-42.

Vauzour D. (2014). Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *J. Sci. Food Agric.* 94: 1042- 56.

Venskutonis P.K., T.A.van Beek (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* V 85 : 231-237.

Vergne P., Bertin P., Trèves R. (2000). Aspirine, douleurs et inflammation. *Rev. Méd. Interne.* 21 : 89-96.

Visioli F., Bellomo G., Galli C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 : 60-64.

-W-

Wahyuni y., Ana-Rosa B., Enny S., Raoul J.B., Arnaud G.B., (2011). Metabolite biodiversity in pumpkin (*Cucurbita sp.*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. [*Phytochem.* 72 : 1358- 1370.](#)

Wahyuni Y., Ballester A.R., Tikunov Y., de Vos R., Pelgrom K., Maharijaya A., Sudarmonowati E., Bino R., Bovy A. (2013). Metabolomics and molecular marker analysis to explore pumpkin (*cucurbita sp.*) biodiversity. *Metabolomics*, 9 :130–144.

Wallace M., Staats P.S. (2004). Pain medicine and management: just the facts. *Mc Graw Hill (New York)*, p48.

Wangcharoen W et Morasuk W. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of chilies. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 41: 561–569.

Wang W., Wu N., Zu Y.G. et Fu Y.J. (2001). Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds. *Food chem.* 108 : 1019-1022

Wan Y. J., Liu X. J., Zhao L. C., Zhou A. M., and Liu, X. (2012). The inhibitory effect on α -amylase and antibiotic activity from pumpkin polysaccharide. *Food Sci. Technol.* 37: 44–47.

Ward J.F. (1994). The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int. J. radiat. biology.* 66: 427- 432.

Weill B., Batteux F., Dhainaut J. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. *Eds, de Boeck Université (Paris)*. pp : 12-23.

Weiss, E. A. (2002). Spice Crops, *CABI Publishing International, New York*, pp. 411.

Wen, D., Chenchen, L., Hao, D., Yiping, L., Liu, H. (2005). A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines. *J. Agric. Food Chem*, 53: 6624-6629.

Westerterp-Plantenga, M.S., Smeets, A., Lejeune, M.P.G. (2005). Sensory and gastrointestinal satiety effects of pumpkin on food intake. *Int. J. Obes. (Lond)* : 29 :682-8.

Wiseman S, Mulder T et Rietveld A. (2001). Tea flavonoids: bioavailability *in vivo* and effects on cell signaling pathways *in vitro*. *Antioxid .Redox. Signal.* 3: 1009-1021.

Wolbink G.J., Brouwer M.C., Buysmann S., Ten Berge I.J., Hack C.E. (1996). CRP-mediated activation of complement *in vivo*; assessment by measuring circulating complement –C- reactive protein complexes. *J. Immunol.* 157: 473-479.

Woodall A.A., Lee S.W.M., Weesie R.J., Jackson M.J., Britton G. (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals : relationships between structure and reactivity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1336 : 33-42.

Wood L. G. (2013). Lycopene Modulation of Inflammation: Role in Disease Pathology. *Bioact. Food Diet.Interv. Arthritis Related Inflamm. Diseas..* 22: 306- 318.

Wu Hao, Junxiang Zhu, Wenchao Diao, Chengrong Wang (2006). Ultrasound-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Carbohydr. Polym.* 113 : 314–324.

-Y-

Yamaguchi M., Weitzmann M.N. (2001). Quercetin, a potent suppressor of NF-κB and Smad activation in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med*, 28: 521–525.

Yang D.J., Jau-T I. L., Yi-Chen C., Shih-Chuan L., Fung-J O. L., Tien-Jy E. C., Meilin W., Hui-W E. L., Yuan-Y E. C. (2013). Suppressive effect of carotenoid extract of *Dunaliella salina* alga on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells via NF-κB and JNK inactivation. *J. func. foods.* 5 : 607 –615.

Yang Z.H., Wang X.H., Wang H.P., Hu L.Q., Zheng X.M., Li S.W. (2010). Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization. *Urology*, 75: 735–741.

Yi J., M. L. Andersen (2009). Interactions between tocopherols, tocotrienol and Carotenoids during autoxidation of mixed palm olein and fish oil. *Food chem.*

Yoganandam G. Prakash, K.Ilango, Sucharita De (2010). Evaluation of Anti-inflammatory and Membrane Stabilizing Properties of various extracts of *Punica granatum* L.(Lythraceae). *Int.J. PharmTech. Research.* 2: 1060- 1063.

-Z-

Zachariah T.J., Gobinath P. (2008). Paprika and chilli. In: “Chemistry of Spices” (V.A. Parthasarathy, B. Chempakam and T. J. Zachariah, eds), 260-286. CAB International, Wallingford, UK.

Zainol M. K., Abd-Hamid A., Yusof S., and Muse R. (2003). Antioxidant activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) urban. *Food Chem.* 81: 575–591.

Zdunić Gordana M., Nebojša R. Menković, Milka B. Jadranin, Miroslav M. Novaković, Katarina P. Šavikin, Jelena Č. Živković (2016). Phenolic compounds and carotenoids in pumpkin fruit and related traditional products. *Hem. Ind.* 70 : 429–433.

Zhao Y., Yu W., Hu W., Yuan Y. (2005). Anti-inflammatory and anticoagulant activities of lycopene in mice. *Nutr. Res.* 23 : 1591–1595.

Zielinski H., and Kozłowska H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2008–2016.

Zis P., Apsokardos A., Isaia C., Sykioti P., Vadalouca A. (2014). Posttraumatic and Postsurgical Neuropathic Pain Responsive to Treatment with Topical pumpkin Patch. *Pain Physician.* 17:213-218.

Zvara A., Bencsik P., Fodor G., Csont T., Hackler Jr. L., Dux M., Furst S., Jancso G., Puskas L.G., Ferdinandy P., (2006). Carotenoids-sensitive sensory neurons regulate myocardial function and gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *FASEB J.* 20: 160 – 162.