

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N° ...../SNV/2018

THÈSE

Présentée par

**SOUFANE SIHEM**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: BIOCHIMIE**

THÈME

**ETUDE DE LA TOXICITÉ DES FRUITS DU  
*CITRULLUS COLOCYNTHIS***

Soutenue publiquement le 13/05/2018

DEVANT LE JURY

Président	HOUCHER BAKHOUCHE	Pr. UFA SETIF 1
Directeur	BOUZIDI ABDELOUAHAB	Pr. UFA SETIF 1
Examineurs	LAHOUEL MESBAH	Pr. UNIVERSITE DE JIJEL
	BENDERRADJI LAID	MCA. UNIVERSITÉ DE M'SILA
	BELLIK YUVA	MCA. UNIVERSITE DE BORDJ
		BOUARRERIDJ

# Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles a fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Ce travail a été réalisé sous la direction du **Professeur ABDELOUAHAB BOUZIDI**. Bien évidemment, ma sincère gratitude et mes grands remerciements à mon encadreur : A. Bouzidi. Je le remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience pendant des intenses et rationnelles discussions qui m'ont permis de réaliser ce travail. Pour tout cela et aussi pour son aide, sa confiance, son dévouement exemplaire et ses conseils constructifs, pour sa modesté, sa générosité et ses encouragements je le remercie vivement.

Je tiens aussi à remercier **Mr. BAKHOUCHE HOUCHER**, Professeur à l'université de Sétif d'avoir accepté de Présider les membres du Jury.

Mes remerciements vont également à **Mr. Mesbah Lahouel**, Professeur à l'université de Jijel, à **Mr. LAID BENDERRADJI**, Maitre de conférence classe A à l'université de M'sila et à **Mr. YUVA BELLIK** maitre de conférence classe A à l'université de Bordj BouArreridj d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements vont aussi à Mr. Rachid Benaddi Chef de laboratoire du laboratoire central du CHU de Sétif ainsi que toute son équipe, à Mr. Djamel Abdellouche, Chef de laboratoire du laboratoire d'anatomopathologie du CHU de Sétif, à M<sup>me</sup> Samira Crache ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire.

Un remerciement et une gratitude très spéciale à: Mr Mohammed Matrouh : le secrétaire général de la faculté des sciences à l'université de M'sila, Mr. N. Mekhoukh technicien du laboratoire de biochimie à l'université de BBA. J'exprime mes vifs remerciements à Mr et Mme Amira, Kada Saoussen, au Docteur Fatmi Widad et à tous mes amies et collègues pour leurs soutient moral.

Je tiens à remercier aussi tous les professeurs qui m'ont enseigné et qui par leur compétences m'ont soutenu dans la poursuite de mes études.

Merci pour tous ceux qui ont participé à la réussite de cette thèse. J'espère bien que ce modeste travail pourra servir aux générations qui viennent et rajouter quelque chose dans le domaine de la recherche.

*Sihem*

التحليل الكيميائي للمستخلص الميثانولي للفاكهة المجففة للحنضل *Citrullus colocynthis*

: قلويدات ، فلافونويدات، ستيرولات، تيربينات، صابونينات ومركبات جليكوسيدية.

(LD<sub>50</sub>) للمستخلص المعطى عن طريق الفم بحوالي

1311.45 / . / 440 انخفاض معنوي في الكتلة النسبية

:الكبد، الكلى، الرئتين، الطحال والخصيتين في عدد كريات الدم الحمراء و البيضاء وفي

مستويات الهيماتوكريت والهيموغلوبيد . كانت نشاطية الانزيمات AST ALT الفسفاز القاعدي عالية

. سجلت مستويات عالية للكرياتينين و بشكل ملحوظ لدى جميع المجموعات

المعاملة مع وجود زيادة كبيرة في مستوى اليوريا لدى المجموعة المقتولة بعد ثلاثة أيام من الحقن.

لوحظ في دراسة السمية الشبه الحادة و الشبه المزمنة، انخفاض كبير في الوزن النهائي للجسم والكتلة النسبية

(الكبد، الكلى، الرئتين والقلب) لدى الحيوان. أظهرت تحاليل الدم انخفاضا كبيرا في عدد كريات

الدم الحمراء و البيضاء وفي مستويات الهيماتوكريت والهيموغلوبين. كانت المستويات العالية في نشاطية

الانزيمات ALT AST وكذلك اليوريا ،حمض اليوريك والكرياتينين

المعالجة مصحوبة على المستوى النسيجي باحتقان دموي كبدي كبير مع وجود تليف ما بين الخلايا الكبدية

وكذلك احتقان للأوعية الدموية الكلوية مع تسجيل التهاب على مستوى الأنسجة البينية.

يمكن لنتائج كل من زيادة نفاذية الأوعية الدموية على مستوى الكبد و الكلى بيروكسيد الدهون

تفسير جزئي للتغيرات الدموية والنسجية

**مفاتيح:** *Citrullus colocynthis* LD<sub>50</sub> مستخلص الميثانول ، نفاذية الأوعية الدموية،

بيروكسيد الدهون، السمية.

## Résumé

Le screening phytochimique de l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis* et ses différentes fractions a permis de révéler la présence des: alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, stérols, terpènes, saponines et des glycosides cardiotoniques.

La DL<sub>50</sub> de l'extrait administré par voie orale est égale à 1311,45 mg/kg. L'administration orale de l'extrait avec une dose de 440 mg/kg a induit une réduction significative de la masse relative du foie, reins, poumons, rate et testicules ainsi que du nombre de globules rouges (GR), de globules blancs (GB), du taux d'hématocrite (HCT) et d'hémoglobine (HGB). Les activités de l'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) et de la phosphatase alcaline (ALP) étaient plus élevées pour les principaux groupes traités. Des niveaux de créatinine significativement élevés pour l'ensemble des groupes traités avec une augmentation significative du taux d'urée pour le groupe sacrifié après trois jours de traitement ont caractérisé le bilan de la fonction rénale. L'analyse des coupes histologiques a révélé la présence de congestion dans le parenchyme hépatique et rénal des groupes sacrifiés après un et cinq jours du traitement.

Dans les études de la toxicité subaiguë subchronique, une réduction significative du poids corporel final et de la masse relative des organes (foie, rein, poumons, cœur et testicules) est constatée. Le profil hématologique analysé a révélé une diminution significative du nombre de GR, de (GB) et du contenu en HCT et en HGB. L'élévation significative de l'activité des transaminases et de l'ALP, de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine chez les rats traités était accompagnée sur le plan histologique d'une importante congestion sanguine au niveau hépatique avec la présence de foyer de fibrose entre les hépatocytes ainsi qu'une congestion vasculaire dans le parenchyme rénal avec une inflammation discrète dans le tissu interstitiel.

L'augmentation de la perméabilité vasculaire enregistrée au niveau hépatique et rénal ainsi que du taux de peroxydation lipidique au niveau de l'hémolysat des GR, de l'homogénat du foie et des reins corroborent l'ensemble des résultats trouvés et peuvent expliquer en partie les changements hématologiques et histologiques observés.

**Mots-clés:** *Citrullus colocynthis*, DL<sub>50</sub>, l'extrait méthanolique, perméabilité vasculaire, peroxydation lipidique, toxicité.

## Abstract

The phytochemical screening of the fruits methanolic *Citrullus colocynthis* crude extract and its different fractions revealed the presence of: alkaloids, tannins, flavonoids, sterols, terpenes, saponins and cardiotoxic glycosides.

The LD<sub>50</sub> of the extract administered orally is 1311.45 mg/kg. Oral administration of the extract at a dose of 440 mg/kg induced a significant reduction in the relative weight of liver, kidneys, lungs, spleen and testes as well as the number of red blood cells (RBCs), white blood cells (WBC), hematocrit (PCV) and hemoglobin (HG). The Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) activities were higher for the most treatment groups. A significantly elevated creatinine level for all the treatment groups with a significant increase in urea level for the sacrificed group after three days of treatment has characterized the renal function balance. Analysis of histological sections revealed the presence of congestion in the hepatic and renal parenchyma of especially for the sacrificed groups after one and five days of the treatment.

In the subacute and subchronic toxicity study, a significant reduction in final body and relative organ weights (liver, kidney, lung, heart and testes) was observed. The hematological profile analyzed revealed a significant decrease in the number of RBC, WBC, the content of PCV and HG. The significant elevation of transaminases and ALP activity, urea, uric acid and creatinine in treated rats were histologically accompanied by a significant hepatic blood congestion with the presence of focal fibrosis between hepatocytes as well as vascular congestion in the renal parenchyma with discrete inflammation in the interstitial tissue.

The increase in hepatic and renal vascular permeability as well as the rate of lipid peroxidation in RBC hemolysate, liver and kidneys homogenate support the results found and could in part explain the hematological and histological changes observed.

**Keywords:** *Citrullus colocynthis*, LD<sub>50</sub>, methanolic extract, vascular permeability, lipid peroxidation, toxicity.

# SOMMAIRE

Sommaire .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des tableaux .....	III
Liste d'abréviations .....	
Introduction générale.....	1

## Chapitre I : Etude bibliographique

<b>I.1. <i>Citrullus colocynthis</i>.</b> .....	3
I.1.1. Historique.....	3
I.1.2. Famille des <i>Cucurbitaceae</i> .....	3
I.1.3. Le genre <i>Citrullus</i> .....	3
I.1.4. Position systématique.....	4
I.1.5. Caractéristiques botaniques .....	5
I.1.6. Noms vernaculaires.....	8
I.1.7. Répartition géographique.....	9
<b>I.2. Principaux métabolites secondaires de la plante</b> .....	10
1.2.1. Triterpènes.....	10
1.2.2. Alcaloïdes.....	15
1.2.3. Acides phénoliques et flavonoïdes .....	18
1.2.4. Saponines .....	20
1.2.5. Acides gras et tocophérols.....	20
1.2.6. Protéines et acides aminés.....	20
1.2.7. Minéraux et vitamines .....	21
1.2.8.- Autres composés .....	21
<b>I.3. Pharmacopée traditionnelle et connaissances indigènes</b> .....	21
1.3.1- Le fruit.....	22
1.3.2- Les graines.....	22
1.3.3- Les feuilles.....	22
1.3.4- Les racines .....	23
<b>I.4. Activités biologiques</b> .....	23
1.4.1. Activités antidiabétiques.....	23

I.4.2. Activité antilipidémique .....	27
I.4.3. L'activité antimicrobienne .....	27
I.4.4. Activité anti-inflammatoire .....	29
I.4.5. Activité anti-oxydante .....	29
I.4.6. Activité anticancéreuse .....	30
I.4.7. Activité antiallergique .....	31
I.4.8. Activité antidépressive et anticonvulsive .....	32
I.4.9. Autres propriétés pharmacologiques .....	32
<b>I.5. Toxicité du <i>Citrullus colocynthis</i> .....</b>	<b>34</b>
I.5.1- Etiologie et symptômes d'intoxication.....	34
I.5.1.1- Etiologie .....	34
I.5.1.2- Signes cliniques.....	35
I.5.1.3- Données générales humaines .....	35
I.5.1.4- Données générales animales .....	36
I.5.1.5- Traitement .....	38

<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b>
---

<b>II.1. Matériel végétal.....</b>	<b>39</b>
II.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique .....	39
II.1.2. Fractionnement de l'extrait méthanolique par extraction liquide liquide .....	40
II.1.3. Screening phytochimique de l'extrait méthanolique.....	40
II.1.3.1. Screening phytochimique par des réactions colorées.....	42
II.1.3.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	44
<b>II.2. Matériel animal .....</b>	<b>45</b>
II.2.1. Détermination de la DL <sub>50</sub> chez les rats et les souris.....	45
II.2.2. Toxicité aigue non Léthale chez les rats males .....	46
II.2.3. Toxicité sub-aigue chez les rats males .....	47
II.2.4. Toxicité chronique chez les rats males.....	47
II.2.5. Etude de quelques paramètres hématologiques et biochimiques sériques .....	48
II.2.6. Technique histologique .....	48
II.2.7. Effet de l'extrait de la pulpe des fruits du <i>Citrullus colocynthis</i> sur les érythrocytes des rats mâles ( <i>in vitro</i> ) .....	49
II.2.8. Effet de l'extrait de la pulpe des fruits du <i>Citrullus colocynthis</i> sur les érythrocytes des rats mâles ( <i>in vivo</i> ) .....	50

II.2.9. L'analyse statistique .....	51
-------------------------------------	----

## Chapitre III : Résultats expérimentaux

<b>III.1.</b> Extraction.....	52
<b>III.2.</b> Screening phytochimique de l'extrait méthanolique .....	52
III.2.1. Screening phytochimique par les réactions de précipitation en tubes .....	52
III.2.2. Screening phytochimique par La chromatographie sur couche mince .....	53
<b>III.3.</b> Paramètres toxicométriques .....	62
III.3.1. Estimation de la DL <sub>50</sub> par la méthode de Litchfield et Wilcoxon.....	62
<b>III. 3.2.</b> Etude de la toxicité aigue non léthale .....	72
III.3.2.1. Toxicité aigue chez les rats mâles .....	72
III.3.2.2. Etude des paramètres biochimiques .....	74
III.3.2.3. Etude des paramètres hématologiques .....	78
III.3.2.4. Etude histologique .....	80
<b>III.3.3.</b> Toxicité sub-aigue chez les rats mâles.....	83
III.3.3.1. Evolution du poids corporel, de la prise alimentaire et des masses relatives des organes des rats mâles .....	83
III.3.3.2. Etude de quelques paramètres hématologiques .....	85
III.3.3.3. Etude des paramètres biochimiques.....	86
III.3.3.4. Etude histologique .....	90
<b>III.3.4.</b> Toxicité subchronique chez les rats mâles.....	93
III.3.4.1. Evolution du poids corporel, de la prise alimentaire et des masses relatives des organes des rats mâles .....	93
III.3.4.2. Etude de quelques paramètres hématologiques .....	95
III.3.4.3. Etude des paramètres biochimiques.....	95
III.3.4.4. Etude histologique .....	98
<b>III.4.</b> Perméabilité vasculaire au bleu Evans au niveau du foie et des reins des rats traités par l'extrait des fruits du <i>C. colocynthis</i> .....	103
<b>III.5.</b> Taux de peroxydation lipidique au niveau de l'hémolysat des globules rouges, du foie et des reins de rats traités avec l'extrait des fruits du CCT .....	103

## **Chapitre IV : Discussion générale**

<b>Discussion générale</b> .....	105
<b>Conclusion générale</b> .....	118
<b>Références bibliographiques</b> .....	120

## LISTE DES FIGURES

<b>Fig. 1.</b>	La plante <i>Citrullus colocynthis</i> .....	06
<b>Fig. 2.</b>	Les différentes parties du <i>Citrullus colocynthis</i> .....	07
<b>Fig. 3.</b>	Carte de la distribution africaine du <i>Citrullus colocynthis</i> .....	10
<b>Fig. 4.</b>	Squelette principal des cucurbitacines (a) et structure chimique des cucurbitacines de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	16
<b>Fig. 5.</b>	Structure chimique des cucurbitacines glycosides de <i>Citrullus colocynthis</i> .....	17
<b>Fig. 6.</b>	Structure des alcaloïdes (a) et des flavonoïdes (b) isolés à partir du <i>Citrullus colocynthis</i> .....	19
<b>Fig. 7.</b>	Les étapes de la préparation et du fractionnement de l'extrait méthanolique des fruits de CCT.....	46
<b>Fig. 8.</b>	Principe du dosage du malondialdéhyde.....	57
<b>Fig. 9.</b>	Chromatogramme de la fraction hexanique en utilisant le système d'éluant (n-Hexane/acétate d'éthyle; 20: 4 (v/v) révélé sous UV et par le réactif de Liebermann-Burchard.....	60
<b>Fig. 10.</b>	Chromatogramme de la fraction hexanique en utilisant le système d'éluant (n-Hexane/acétate d'éthyle ; 20: 4 (v/v)) révélé par la vaniline-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Vanilline-HCl, le H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , le réactif de Godin, le FeCl <sub>3</sub> 10%, Dragendorff et l'AlCl <sub>3</sub> 5%.....	58
<b>Fig. 11.</b>	Chromatogrammes de la fraction chloroformique en utilisant le système d'éluant (Chloroforme/ acétate d'éthyle/ n-Hexane; 10: 10: 4 (v/v/v) révélé sous l'UV et au visible par le réactif de Godin, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Vanilline-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> et Vanilline- HCl.....	58
<b>Fig. 12.</b>	Chromatogrammes de la fraction acétate d'éthyle en utilisant les systèmes d'éluant S1 : Chloroforme/ acétate d'éthyle/ acide acétique; 12: 10: 1 (v/v/v)) et S2 : Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau/ Chloroforme; 18: 2,4: 2,1: 6 (v/v/v/v) révélé sous l'UV.....	59
<b>Fig. 13.</b>	Chromatogrammes de la fraction acétate d'éthyle en utilisant le système d'éluant S2 : Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau/ Chloroforme; 18: 2,4: 2,1: 6 (v/v v/v) révélé par la Vanilline-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , la Vanilline-HCl, le réactif de Godin et le H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	59
<b>Fig. 14.</b>	Chromatogrammes de la fraction butanolique en utilisant le système d'éluant Acétate d'éthyle/ Ethanol/ Acide formique/ Eau; 10: 1,10: 0,7 : 2,5 (v/v v/v) révélés sous l'UV.....	60
<b>Fig. 15.</b>	Chromatogrammes de la fraction butanolique en utilisant le système d'éluant Acétate d'éthyle/ Ethanol/ Acide formique/ Eau; 10: 1,10: 0,7 : 2,5 (v/v v/v) révélés par le FeCl <sub>3</sub> , Dragendorff, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Godin, Liebermann-Burchard et Vanilline-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	60
<b>Fig. 16.</b>	Chromatogrammes de la fraction aqueuse en utilisant le système d'éluant Acétate d'éthyle/ Méthanol/Eau; 7: 2,7: 0,3 (v/v/v) révélés sous l'UV et avec le réactif de Dragendorff, L.B., FeCl <sub>3</sub> 10% et l'AlCl <sub>3</sub> 5%.....	61
<b>Fig. 17.</b>	Chromatogrammes de la fraction aqueuse en utilisant le système d'éluant Acétate d'éthyle/ Méthanol/Eau; 7: 2,7: 0,3 (v/v/v) révélés avec le réactif de Godin, vanilline-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , vanilline-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> et vanilline-HCl.....	61
<b>Fig. 18.</b>	Courbe dose-effet pour la détermination de la DL <sub>50</sub> chez des rats males traités par voie orale avec l'extrait méthanolique du fruit de CCT.....	63

<b>Fig. 19.</b>	Courbe dose-effet enregistré pour la détermination de la DL <sub>50</sub> chez des rats femelles traités par voie orale avec l'extrait méthanolique du fruit de CCT.....	65
<b>Fig. 20.</b>	Courbe dose-effet enregistré pour la détermination de la DL <sub>50</sub> chez des souris males traités par voie orale avec différentes doses de l'extrait méthanolique du fruit de CCT.....	67
<b>Fig. 21.</b>	Courbe dose-effet pour la détermination de la DL <sub>50</sub> chez des souris femelles traités par voie orale avec différentes doses de l'extrait méthanolique du fruit de CCT.....	69
<b>Fig. 22.</b>	Courbe dose-effet enregistré au cours de la détermination de la DL <sub>50</sub> chez des rats males et femelles et des souris males et femelles traités par voie orale l'extrait méthanolique du fruit de CCT.....	71
<b>Fig. 23.</b>	Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur l'activité de l'AST, l'ALT et l'ALP chez des rats males.chez des rats males.	74
<b>Fig. 24.</b>	Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux des protéines totales chez des rats males.....	75
<b>Fig. 25.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux d'acide urique, d'urée et de créatinine chez des rats males.....	76
<b>Fig. 26.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux de sodium chez des rats males.....	76
<b>Fig. 27.</b>	Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux de potassium, de phosphore et de calcium chez des rats males.....	77
<b>Fig. 28.</b>	Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux de glucose chez des rats male.	77
<b>Fig. 29.</b>	Parenchyme hépatique traversé par des vaisseaux sanguins congestifs après une journée de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E (×100).....	81
<b>Fig. 30.</b>	Parenchyme rénal congestif après une journée de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E (×100).....	81
<b>Fig. 31.</b>	Coupe histologique du foie de rat males après 5 jours de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440 mg/kg) présentant un parenchyme hépatique avec une architecture discrètement congestive. H&E (×40).....	81
<b>Fig. 32.</b>	Parenchyme rénal avec une architecture discrètement congestive après 5 jours de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E (×100).....	81
<b>Fig. 33.</b>	Parenchyme hépatique sans aucune particularité après 14 jours de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E (×100).....	82
<b>Fig. 34.</b>	Parenchyme rénal normal après 14 jours de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E (×100).....	82
<b>Fig. 35.</b>	Morphologie préservée du foie des rats témoins avec absence de toute congestion. H&E (×100).	82

<b>Fig. 36.</b>	Des reins normaux sans aucune congestion chez les rats témoins. H&E (×100).....	82
<b>Fig. 37.</b>	Effet de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265 mg/kg) pendant six semaines sur le poids corporel des rats males.....	84
<b>Fig. 38.</b>	Effet de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265 mg/kg) pendant six semaines sur la consommation alimentaire chez des rats males.....	84
<b>Fig. 39.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait methanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur l'activité des enzymes ALT, AST et ALP chez des rats males.....	86
<b>Fig. 40.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait methanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur la glycémie des rats males.....	87
<b>Fig. 41.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait methanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le taux des protéines totales des rats males.....	87
<b>Fig. 42.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait methanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le taux d'urée et de créatinine des rats males.....	88
<b>Fig. 43.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait methanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le taux d'urée chez des rats males.....	88
<b>Fig. 44.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait methanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le niveau de sodium chez des rats males.....	89
<b>Fig. 45.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait methanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le taux de K <sup>+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> et Ca <sup>++</sup> chez des rats males.....	89
<b>Fig. 46.</b>	Foie congestive avec architecture préservée chez des rats males après administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines. H&E (×100).....	91
<b>Fig. 47.</b>	Reins congestifs des rats males après administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines.....	91
<b>Fig. 48.</b>	Foie présentant une légère congestion avec conservation de l'architecture chez des rats males après administration orale de l'extrait méthanolique des fruits du CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines suivie d'une semaine de récupération H&E (×100).....	91
<b>Fig. 49.</b>	Parenchyme rénal fait de tubes et de glomérules réguliers, parcouru par des vaisseaux sanguins présentant une légère congestion chez des rats males après administration orale de l'extrait méthanolique des fruits du CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines suivie d'une semaine de récupération. H&E (×100).....	91
<b>Fig. 50.</b>	Parenchyme hépatique avec une architecture préservée fait de travées radial de Remack convergeant vers la veine centrale chez les rats témoins. H&E (×100).....	92

<b>Fig. 51.</b>	Parenchyme rénal fait de tubules et glomérules réguliers chez les rats témoins. H&E (×100).....	92
<b>Fig. 52.</b>	Effet de l'administration orale l'extrait méthanolique des fruits du <i>Citrullus colocynthis</i> (131 mg/kg) pendant trois mois sur le poids corporel des rats males.....	93
<b>Fig. 53.</b>	Effet de l'administration orale l'extrait méthanolique des fruits du <i>Citrullus colocynthis</i> (131 mg/kg) pendant trois mois sur la prise alimentaire des rats males.....	94
<b>Fig. 54.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de <i>Citrullus colocynthis</i> (131 mg/kg) penadnt trois mois sur l'activité de l'ALT, l'AST et l'ALP chez des rats males.....	96
<b>Fig. 55.</b>	Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de <i>Citrullus colocynthis</i> (131 mg/kg) pendant trois mois sur le taux de glycémie des rats males.....	96
<b>Fig. 56.</b>	Taux moyen en proteinses totales chez des rats males traités par voie orale avec de l'extrait méthanolique des fruits de <i>Citrullus colocynthis</i> (131 mg/kg) pendant trois mois.....	97
<b>Fig. 57.</b>	Taux moyen d'urée, d'acide urique et de créatinine chez des rats males traotés par voie orale avec l'extrait méthanolique des fruits de <i>Citrullus colocynthis</i> (131 mg/kg) pendant trois mois.....	97
<b>Fig. 58.</b>	Taux moyen en K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> et Ca <sup>++</sup> chez des rats males après leur traitement par voie orale avec l'extrait méthanolique des fruits du <i>Citrullus colocynthis</i> (131 mg/kg) pendant trois mois.....	98
<b>Fig. 59.</b>	Aspect macroscopique du foie des rats males témoins (a) et traités (b) par voie orale (pendant 3 mois) avec de l'extrait méthanolique des fruits de <i>Citrullus colocynthis</i> (131 mg/kg).....	99
<b>Fig. 60.</b>	Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine (× 40).....	99
<b>Fig. 61.</b>	Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois.....	99
<b>Fig. 62.</b>	Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine (× 40).....	99
<b>Fig. 63.</b>	Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine (× 40).....	99
<b>Fig. 64.</b>	Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine (×100 et ×200).....	100
<b>Fig. 65.</b>	Tissu hépatique des rats males Albino Wistar témoins. Coloration à l'Hématoxyline Eosine (×100).....	100
<b>Fig. 66.</b>	Tissu rénal des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine (× 100).....	101
<b>Fig. 67.</b>	Tissu rénal des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine (× 100).....	101

<b>Fig. 68.</b>	Tissu rénal des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine (× 100).....	101
<b>Fig. 69.</b>	Tissu rénal des rats males Albino Wistar témoins. Coloration à l'Hématoxyline Eosine (× 100).....	102
<b>Fig. 70.</b>	Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT 265mg/kg par voie orale chez des rats males sur la perméabilité vasculaire du foie et des reins au bleu Evans.....	103
<b>Fig. 71.</b>	Taux de peroxydation lipidique enregistré au niveau de l'hémolysat de globules rouges de rats males traités pendant une semaine avec l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265mg/kg) par voie orale.....	104
<b>Fig. 72.</b>	Taux de peroxydation lipidique enregistré au niveau du foie de rats males traités pendant une semaine avec l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265mg/kg) par voie orale.....	104
<b>Fig. 73.</b>	Taux de peroxydation lipidique enregistré au niveau des reins de rats males traités pendant une semaine avec l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265mg/kg) par voie orale.....	104

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Position systématique du <i>Citrullus colocynthis</i> .....	04
<b>Tableau 2:</b> Noms communs de <i>Citrullus colocynthis</i> (L.) Schrad.....	08
<b>Tableau 3:</b> Liste des composés chimiques isolés des différentes parties de la plante <i>Citrullus colocynthis</i> .....	12
<b>Tableau 4:</b> Les usages médicaux des différentes parties du <i>Citrullus colocynthis</i> .....	25
<b>Tableau 5:</b> Résultats du fractionnement de l'extrait méthanolique brut des fruits du <i>Citrullus colocynthis</i> .....	52
<b>Tableau 6 :</b> Résultats des tests chimiques de détection des principes actifs de l'extrait méthanolique brut des fruits du <i>Citrullus colocynthis</i> .....	54
<b>Tableau 7 :</b> Résultats des CCM réalisées pour la détection des principes actifs de l'extrait brut des fruits du <i>Citrullus colocynthis</i> et ses différentes fractions.....	55
<b>Tableau 8 :</b> Détermination des paramètres toxicométriques après administration de l'extrait méthanolique du fruit de <i>Citrullus colocynthis</i> par voie orale chez des rats mâles par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	63
<b>Tableau 9 :</b> Détermination des paramètres toxicométriques après administration de l'extrait méthanolique du fruit de <i>Citrullus colocynthis</i> par voie orale chez des rats femelles par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	64
<b>Tableau 10:</b> Détermination des paramètres toxicométriques après administration de l'extrait méthanolique du fruit de <i>Citrullus colocynthis</i> par voie orale chez des souris mâles par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	66
<b>Tableau 11:</b> Détermination des paramètres toxicométriques après administration de l'extrait méthanolique du fruit de <i>Citrullus colocynthis</i> par voie orale chez des souris femelles par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).....	68
<b>Tableau 12 :</b> Les différents paramètres toxicométriques calculés pour les différentes espèces animales utilisées.....	69
<b>Tableau 13:</b> Masse relative des organes de rats mâles Albino Wistar traités par voie orale avec une dose de 440 mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits de CCT.....	73

**Tableau 14:** Les changements des paramètres hématologiques enregistrés chez des rats males Albino Wistar traités par voie orale avec une dose de 440 mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits du *C. colocynthis*.....79

**Tableau 15:** Masse relative des organes de rats mâles Albino Wistar traités par voie orale avec une dose de 265 mg/Kg de l'extrait méthanolique des fruits du *C. colocynthis*.....85

**Tableau 16:** Les changements hématologiques enregistrés chez des rats males Albino Wistar traités par voie orale avec une dose de 265 mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis*.....85

**Tableau 17:** Masse relative des organes de rats mâles traités par voie orale avec une dose de 131mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits de *Citrullus colocynthis* pendant trois mois.....94

**Tableau 18:** Les changements hématologiques enregistrés chez des rats males traités par voie orale avec une dose de 131mg/kg de l'extrait méthanolique du fruit de *Citrullus colocynthis* pendant trois mois.....95

## LISTE D'ABRÉVIATIONS

**ABTS** : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ALP** : Phosphatase alcaline  
**ALT** : Alanine transaminase  
**APG**: Groupe de phylogénie des angiospermes  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**AST** : Aspartate transaminase  
**Bcl-2** : Protéine 2 du lymphome des cellules B  
**BHT** : Butylhydroxytoluène  
**CAT** : Catalase  
**CCM**: Chromatographie sur couche mince  
**CCMH**: Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine  
**CCT** : *Citrillus colocynthis*  
**CDC<sub>2</sub>** : Protéine 2 du cycle de division cellulaire  
**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice 50%  
**CMI** : Concentration minimale inhibitrice  
**COX-1** : Cyclooxygénase 1  
**COX-2** : Cyclooxygénase 2  
**CYP1A** : Enzyme du groupe 1A du cytochrome P<sub>450</sub>  
**CYP2B** : Enzyme du groupe du 2B cytochrome P<sub>450</sub>  
**CYP3A** : Enzyme du groupe du 3A cytochrome P<sub>450</sub>  
**DL<sub>50</sub>**: Dose létale médiane  
**DPPH** : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl  
**E Ac** : Extraï à l'acétate d'éthyle  
**E Aq** : Extrait aqueux  
**E Ch** : Extrait chloroformique  
**E Hx** : Extrait hexanique  
**ED<sub>50</sub>** : Dose efficace médiane  
**FNS** : Formule numéraire sanguine  
**G2** : Phase Gap 2 du cycle cellulaire  
**G2/M** : Transition de la phase gap 2/ Mitose du cycle cellulaire  
**GB** : Globule blanc  
**GBM** : Glioblastome multiforme  
**GGT** : Gamma glutamyl transférase  
**GPx**: Glutathion peroxydase  
**GR** : Globule rouge  
**GSH**: Glutathion  
**HbA1c** : Hémoglobine glycosylé  
**HCOOH** : Acide formique  
**HCT** : Taux d'hématocrite  
**HDL**: Lipoprotéines de haute densité  
**HeLa** : Lignée de cellules cancéreuses  
**Hep-2** : Cellules épithéliales humaines type 2  
**HGB/HG** : Hémoglobine  
**HPLC**: Chromatographie liquide de haute performance  
**IL-10** : Interleukine 10  
**IL-6** : Interleukine 6

**IP** : Voie intrapéritoniale  
**KB** : Lignées cellulaires  
**L<sup>•</sup>** : Radical lipidique libre  
**LDH** : Lactate déshydrogénase  
**LDL** : Lipoprotéines de faible densité  
**LH** : Lipide membranaire  
**LO<sup>•</sup>** : Radical alkoxy  
**LOO<sup>•</sup>** : Radical peroxy lipidique  
**LOOH** : Hydroxyperoxyde lipidique  
**M, N** : Antigènes du groupe sanguin MNS  
**MDA** : Malondialdéhyde  
**MeOH** : Méthanol  
**MTI** : Médecine traditionnelle Iranienne  
**OMS** : Organisation mondiale de la santé  
**p34** : Protéine 34  
**PBS** : Tampon phosphate salin  
**Phase G<sub>2</sub>** : Phase gap 2 du cycle cellulaire  
**RBC** : Globules rouges  
**RC<sub>50</sub>** : Concentration qui scavenge 50% du radical DPPH  
**Rf** : Rapport frontal.  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**ROS** : Espèce réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)  
**SOD** : Superoxyde dismutase  
**STAT<sub>3</sub>** : Transducteur de Signal et activateur de la transcription 3  
**Stz** : Streptozotocine  
**TBA** : Acide thiobarbiturique  
**TBARS** : Substances réactives avec l'acide thiobarbiturique  
**TCA** : Acide trichloroacétique  
**TCMH** : Taux corpusculaire moyen en hémoglobine  
**TNF- $\alpha$**  : Facteur de nécrose tumorale  
**UV** : Radiation ultraviolet  
**VGM** : Volume globulaire moyen  
**VPM** : Volume plaquettaire moyen  
**WBC** : Globules blancs

# ***Introduction***

---

---

Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), la médecine traditionnelle se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique ou mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, transmises de génération en génération (Bourgaud *et al*, 2001). L'utilisation des plantes comme source de remèdes pour le traitement de plusieurs maladies date à la période préhistorique. Plus de 80 % de la population des pays en voie de développement ont recourt presque exclusivement à la médecine traditionnelle pour leurs besoins de santé primaire. En plus, dans le monde, près de 25% des prescriptions sont à base de plantes (Bahorun, 1997).

Les plantes, parce qu'elles sont naturelles, sont considérées à tort comme non dangereuses, et la population y a recours dans des contextes très variés et nombreux. Les produits utilisés sont souvent "un panaché" de plantes, dont la connaissance et les impératifs de préparation et de consommation ne sont pas maîtrisés. Ainsi les plantes peuvent contenir des composés chimiques puissants, responsables d'effets indésirables et de toxicité.

Une plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux et dont l'utilisation provoque des troubles variés plus ou moins graves voire mortels (Hammiche *et al.*, 2013).

L'Algérie par sa position biogéographique offre une très grande diversité écologique et floristique, estimé à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (Hanifi, 1991).

A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressés à une espèce spontanée à caractère médicinal du Sahara Algérien. Il s'agit du *Citrullus colocynthis* ou coloquinte, une plante herbacée vivace de la famille des cucurbitacées, connue depuis l'antiquité. Cette plante qui ressemble à une petite pastèque avec un goût amer est très abondante en Algérie et est populairement reconnue par Handhal, Hdaj ou Delaa El-Wad. Ses différents organes sont largement utilisés en médecine traditionnelle pour le traitement de différentes affections telles que: le diabète, l'hypertension, le rhumatisme, certaines infections urinaires, gynécologiques, gastro-intestinales et pulmonaires. En Algérie, comme dans le reste de la méditerranée, les parties de la plante les plus utilisées à des fins thérapeutiques sont les fruits et /ou les graines. Les fruits de la coloquinte se développent naturellement dans le désert, les régions sablonneuses et dans beaucoup des pays tropicaux.

D'après les recherches bibliographiques, le *Citrullus colocynthis* a fait l'objet d'un nombre important d'études phytochimiques et biologiques au cours des dernières années. La plupart des travaux antérieurs se sont intéressés à rapporter et étudier les effets thérapeutiques du *Citrullus colocynthis*.

Le choix du *Citrullus colocynthis* comme sujet général du présent travail a été guidé par les nombreuses utilisations traditionnelles qui en sont répertoriées surtout par la population de la région de M'sila, mais aussi par le fait qu'il s'agit d'une espèce relativement très peu étudiée sur le plan toxicologique, notamment en Algérie.

Les études réalisées dans ce travail consistent d'une part de faire une analyse qualitative de l'extrait issu des fruits de cette plante au moyen de tests de caractérisation chimiques et chromatographique sur couche mince. D'autre part, les propriétés toxiques de cet extrait administré par voie orale sont évaluées dans des conditions de toxicité aiguë, subaiguë et subchronique chez le rat male. Enfin, la recherche des mécanismes derrière l'action toxique de l'extrait préparé a concerné ses effets sur : la perméabilité vasculaire et la peroxydation lipidique.

***CHAPITRE I :***  
***Etude bibliographique***

---

---

## ***I.1. Citrullus colocynthis***

### **I.1.1. Historique**

Le *Citrullus colocynthis* est un ancien purgatif, qui a été mentionné depuis 1500 ans av. J.C dans le papyrus Ebers (l'un des plus anciens traités médicaux rédigé au XVI<sup>e</sup> siècle avant notre époque, pendant le règne d'Amenhotep I<sup>er</sup>), dans la bible (II Kings 4 : 38-41) et dans les manuscrits du médecin, pharmacologue et botaniste grec Pedanius Dioscoride. Les médecins Egyptiens utilisaient cette plante comme un puissant purgatif. De sa part, un écrivain arabe, Mesue, a cité l'utilisation de deux préparations à base du *Citrullus colocynthis* nommées: trochisci alhandal et electuairum majus hamech dans la *Pharmacopoeae Augustana* de 1581 (Lloyd et Cincinnati, 1898).

Dans les années 1800, la plante a été inscrite dans chaque numéro de la pharmacopée américaine (*US pharmacopeia*). La toxicité de la plante a été également bien connue aux médecins médiévaux, qui ont constatés la présence d'ulcères hémorragiques dans les intestins suite à l'ingestion des graines de coloquinte (Lloyd et Cincinnati, 1898).

### **I.1.2. Famille des *Cucurbitaceae***

La famille des cucurbitacées englobe deux sous familles bien reconnues : Cucurbitoidae et Zanonioidae, 18 tribus, 130 genres et 900 espèces (Robinson et Decker-Walters, 1997 ; Jarret et Newman, 2000 ; Hammiche *et al.*, 2013). Une grande diversité génétique est remarquée au sein des espèces caractérisant cette famille. La totalité des ces espèces sont des herbes sarmenteuses dont les tiges grimpent souvent au moyen des vrilles naissant à côté des feuilles (Yamaguchi, 1983).

Les genres les plus importants de cette famille sont : *Cucurbita*, *Cucumis*, *Ecballium*, *Citrullus*, *Luffa*, *Bryonia*, *Momordica* et *Trichosanthes* distribués à travers le monde entier. Plusieurs des ces genres sont comestibles tandis que d'autres sont des plantes médicinales ou ornementales (Jeffery, 2001).

Différentes espèces constituent un apport alimentaire riche et varié : courge, concombre, melon, pastèque ; d'autres, à graine oléagineuse fournissent de l'huile ; certaines fournissent des éponges végétales (« Loofah ») très apprécié pour les soins corporels ; d'autres constituent des récipients (gourdes). Enfin, d'autres espèces donnent lieu à des intoxications sévères : Bryone, coloquinte, concombre d'âne (Hammiche *et al.*, 2013).

### **I.1.3. Le genre *Citrullus***

Le terme *Citrullus* est inventé pour la première fois par Forskal en l'an 1775. Le terme de coloquinte est issu du grec *kolokunthis* qui est le nom de la plante. Toutefois, Schrader fut

le premier à pouvoir classer systématiquement ce genre. Cette classification a été par la suite adoptée par le 8<sup>ème</sup> Congrès International de Botanique en 1954 pour être incluse dans la *Nomina Conservanda* (Fursa, 1972).

Le genre *Citrullus* contient quatre espèces : *C. colocynthis*, *C. ecirrhosus*, *C. lanatus*, *C. fistulosus* et *C. naudinianus* (Gurudeeban, 2007).

#### I.1.4. Position systématique

*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. ou coloquinte est une plante vivace appartenant à la famille des Cucurbitaceae, sous famille des Cucurbitaceae, tribu des Benincaseae, sous tribu des Benincasinae (Robinson et Decker-Walters, 1997; Zyyat *et al.*, 1997) (**Tableau. 1**).

**Tableau 1.** Position systématique du *Citrullus colocynthis* (Cronquist, 1988; APG, 1998; 2003).

	<i>Plantae, Tracheobionta</i> (Plantes vasculaires)
<b>Super division</b>	<i>Spermatophytae</i> (Plantes à graines)
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta (Angiospermae)</i> (Plantes à fleurs)
<b>Classe</b>	<i>Magnolipsida</i> (Dicotylédones)
<b>Sous classe</b>	<i>Dialypétales</i>
<b>Ordre</b>	<i>Cucurbitales</i>
<b>Famille</b>	<i>Cucurbitaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Citrullus</i>
<b>Espèce</b>	<i>colocynthis</i>

Selon les classifications botaniques classiques pré-moléculaires, les *Cucurbitaceae* sont des dicotylédones appartenant à l'ordre des *Cucurbitales*. Parmi les classifications basées essentiellement sur des critères morphologiques et anatomiques, celle de Cronquist est la plus utilisée (Cronquist, 1988). Le développement de la systématique moléculaire basée sur l'analyse des séquences de gènes, ont bouleversé les classifications usuelles et ont donné naissance en 1998 à une nouvelle classification ordinaire des plantes à fleurs « classification APG : the "Angiosperm Phylogeny Group » (APG, 1998). Cette classification a été révisée à deux reprises «APG II» en 2003 et «APG III» en 2009.

### I.1. 5. Caractéristiques botaniques

La coloquinte est une plante herbacée, hispide mais à poiles non piquantes et annuelle (**Fig. 1**) (Khare, 2004). Elle présente :

- **Des tiges** munies de vrilles, ramifiées, anguleuses, rudes, rampantes et étalées radialement pouvant atteindre plus de 5 m, desséchées après fructification (Yaniv *et al.*, 1999) (**Fig. 2 A**).
- **Des feuilles** alternes, longues de 5 à 10 cm, avec un limbe découpé en 5 à 7 lobes séparés par des sinus larges, le lobe central est parfois ovale. Elles sont rugueuses, composées-palmées ou digitées avec absence de stipules. Elles sont ordinairement glanduleuses et fétides quant on les froisse (Spichiger *et al.*, 2004) (**Fig. 2 B**).
- **Des fleurs** solitaires à la base des feuilles, de couleur jaune pale et de sexes séparés sur la même plante (monoïque) apparaissant pendant la période de floraison, vers le mois d'avril-mai, à l'aisselle des feuilles. La corolle de couleur jaune comporte cinq lobes. Ces fleurs sont gamopétales, monoïques ou dioïques, rarement polygames; 5 étamines soudées en 3 phalanges (2-2-1) ; anthères extrorses à connectif flexueux, stylet court; 3 à 5 stigmates bilobées, ovaire infère primitivement triloculaire (Daniel, 2006) (**Fig. 2 C**).
- **Des fruits** sphériques charnus de 5 à 10 cm de diamètre. Ils ont une couleur verte panachée de jaune clair qui devient complètement jaune à maturité (de Septembre à Novembre) (**Fig. 2 D**). Ils sont revêtus d'une écorce mince autour d'une chaire (pulpe) légère, spongieuse, de couleur jaune orangé, très amère et toxique (Robinson et Decker-Walters, 1997) (**Fig. 2 E**).
- Les **graines** sont ovoïdes et aplaties, de couleur variant de l'orange au brun noirâtre. Leur nombre peut atteindre 200 à 300 graines par fruit (Sawaya *et al.*, 1988) (**Fig. 2 F**).
- **Des racines** sous forme de rhizome tubéreux, charnue, épaisse et riche en eau (Spichiger *et al.*, 2004) (**Fig. 2 G**).



Fig. 1. La plante *Citrullus colocynthis* (Khare, 2004).



**Tiges**  
**A**



**Feuilles**  
**B**



**Fleurs**  
**C**



**Fruits à l'état frais**  
**D**



**Fruits à l'état sec**  
**E**



**Graines**  
**F**



**Racines**  
**G**

**Fig. 2** : Les différentes parties du *Citrullus colocynthis* (EL Fennouni, 1985).

### I.1.6. Noms vernaculaires

La plante porte plusieurs nominations communes à travers les différents pays du monde : coloquinte, colocynth, pomme amère (bitter apple), concombre amer, concombre d'avidité, pomme de diable. Les divers noms communs de la plante sont représentés selon les régions dans le **tableau 2**.

**Tableau 2:** Noms communs de *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad.

Nom commun	Pays	Références
<b>Arabes:</b> Hadag, Hidej, Handhal, Tator Says, Alqam, Mararet essahra. Dellaa El-Wed	Algérie, Maroc, Tunisie, Mauritanie, Lybie	(Baba Aissa., 1999)  (Marzouk <i>et al.</i> , 2010) (Meziane <i>et al.</i> , 2012)
<b>Berbères :</b> Tifersit, Taferzizt, Alkat, Tadjellet, Ubruzi, Tabarka, Tijjeltl		
Bitter apple Bitter gourd Bitter cucumber, colocynth, Vine of Sodom, Wild gourd	Grande Bretagne	(Patrick <i>et al.</i> , 1960) (Sincich , 2002). (Al-Snafi, 2016)
Bitterapfel, Bitterzitrulle Koloquinte, bitter melone	Allemagne	(Sincich, 2002).
Lubenica	Serbia	(Milovanović et Jovanović, 2007)
Coloquintida, Popone amaro	Italie	(Sincich, 2002).
Alhandal, Coloquintida	Espagne	(Al-Snafi, 2016)
Kolovint	Suède	(Al-Snafi, 2016)
Colocintida	Portugal	(Al-Snafi, 2016)
Chicotin, Coqueret Coloquinte, colocynth	France	(Sincich , 2002)
Tumba Pei kumatti	Inde	(Sain <i>et al.</i> , 2004) (Mathew et Jhon Britto, 1981)
Handhal Hindal, Sherry	Emirate Arabie Saoudite	(Alghaithi <i>et al.</i> , 2004) (Al-Yahia <i>et al.</i> , 2000)
Agushi	Nord du Niger	(Ambi <i>et al.</i> , 2007)
Abujahl Watermelon,	Iran (Persian)	(Shafaei <i>et al.</i> , 2012)

hendavaneyeaboojahl		(Zamani <i>et al.</i> , 2007)
Kabast, Sharang, Khiar Talkh, Kharboze talkhak, Kharboze roubah, Hanzal, Hindavane Aboujahl, Algham, Kousht		(Rahimi <i>et al.</i> , 2012)

### I.1.7. Répartition géographique

La coloquinte est adaptée aux régions tropicales et sub-tropicales, les régions désertiques arides et les régions tempérées (Timothy, 1993). Sa capacité de liaison au sol sec est importante (Yaniv *et al.*, 1999; Sain *et al.*, 2004 ; Spichiger *et al.*, 2004). Elle peut tolérer des températures annuelles situées entre 14.8 et 27.8 C° et des pH allant de 5 à 7.8 (Duke, 1983). D'après Ozenda (1991), la coloquinte pousse dans tout le Sahara, au niveau des terrains sablonneux et sablo-argileux, des lits d'oued et des dépressions.

C'est une espèce résistante à la sécheresse, qui peut survivre dans les environnements arides en maintenant son contenu hydrique sans flétrissement des feuilles ou dessiccation, même dans des conditions de stress sévères (Dane *et al.*, 2007).

*Citrullus colocynthis* (L.) Schrader, a un habitat si étendu, de l'Inde à l'Afrique tropicale, qui peut inclure la Méditerranée (Zohary et Hopf, 2000). C'est une espèce subspontanée originaire des régions désertiques sablonneuses d'Afrique, comme les autres espèces de *Citrullus*, notamment : le Maroc, la Tunisie, la Lybie, l'Égypte, le Soudan et l'Algérie (Sen Gupta et Chakrabarty, 1963; Ziyat *et al.*, 1997) (**Fig. 3**). En Algérie, le *Citrullus colocynthis* est rencontré au niveau de plusieurs régions depuis le nord jusqu'au sud (Meziane *et al.*, 2012).

La coloquinte est aussi répandue dans les régions sèches de l'Asie telles que : l'Iran, l'Iraq, la Jordanie, le Pakistan et surtout l'Inde (Sain *et al.*, 2004). Elle est prévalente au Najd, au Hijaz et les régions de l'Arabie Saoudite (Ageel *et al.*, 1987).

En Europe, elle est cultivée en France, en Grèce, en Italie, en Allemagne, au Chypre, en Espagne, en Australie et dans d'autres pays du sud de l'Europe pour des buts ornementaux (DeSmet *et al.*, 1997).

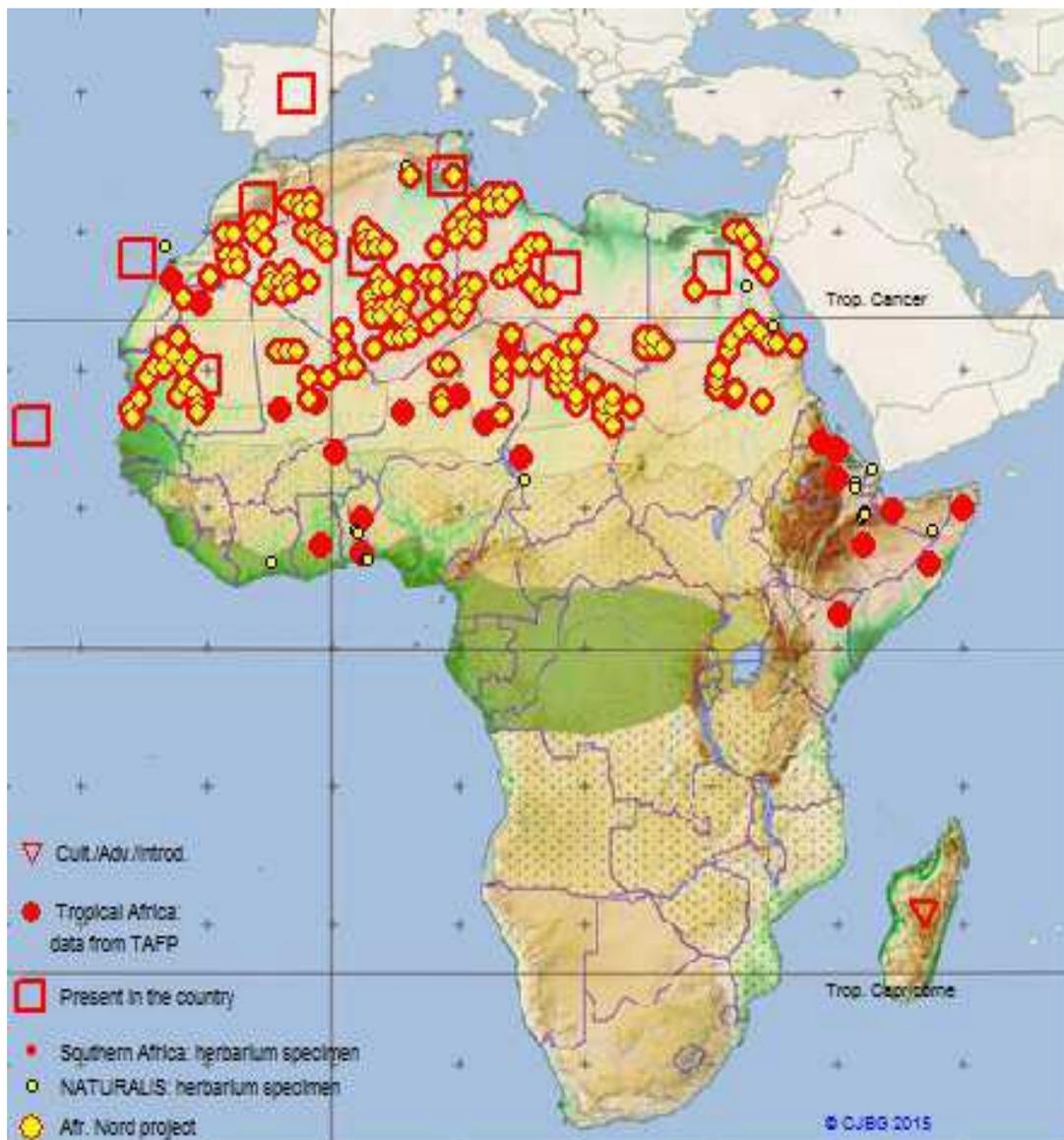


Fig. 3. Carte de la distribution africaine du *Citrullus colocynthis* (Stevens, 2001).

## I.2. Principaux métabolites secondaires de la plante

Divers composés chimiques actifs incluant : alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, tanins, carbohydrates, glycosides, acides gras et huiles ont été mis en évidence dans les différentes parties anatomiques du *C. colocynthis* (Jayaraman *et al.*, 2009; Najafi *et al.*, 2010; Salama, 2012). Les cucurbitacines semblent être les principaux composants des fruits du *Citrullus colocynthis*. Le tableau 3 regroupe les différents composés chimiques de la plante.

### I.2.1. Triterpènes

Les triterpènes caractérisant la coloquinte sont des triterpènes tétracycliques. Ils sont dits des cucurbitacines et sont issus du squelette [19-(10-9)-abeo-10-lanost-5-en] du cucurbitane. Ce sont des substances amères, insaturées et hautement oxygénées (jusqu'à 9

---

---

atomes d'oxygène différemment positionnés). Ils ne peuvent être considérés comme des stéroïdes vu le groupe méthyle du carbone 10 transféré au carbone 9 (**Fig. 4**). Suivant les caractéristiques structurales, ils sont regroupés en 12 catégories, qui ne sont pas tous présentes dans le *Citrullus colocynthis* (Chen *et al.*, 2005). Ces cucurbitacines existent le plus souvent à l'état d'hétérosides et sont caractéristiques de plusieurs genres de la famille des cucurbitacées (Bruneton, 1999; Gry *et al.*, 2006).

Plusieurs travaux expérimentaux ont révélé que les différentes parties de la coloquinte renferment diverses classes de cucurbitacines sous une forme aglycone (cucurbitacine A, B, C, D, E, I, J, K, L et T) (Gry *et al.*, 2006; Benariba *et al.*, 2013) (**Fig. 4, Tableau 3**) ou glycosylés (Seger *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2007) (**Fig. 5**).

Darwish-Sayed *et al.* (1974) ont rapporté la présence de cucurbitacines B, E, I et L et leurs glycosides dans la pulpe et l'écorce des fruits, dans les graines, au niveau des tiges et des feuilles ainsi que la présence de cucurbitacine E glycoside ( -elatérine glycoside) dans la pulpe des fruits (0,21%) et au niveau des racines (0,05%). Muller et Auterhoff (1968), en étudiant les graines avant et après maturité ont rapporté des concentrations en cucurbitacines de 2,2% et 9,1% respectivement. Ceci suggère que le contenu en cucurbitacines du fruit variera dépendamment du degré de maturité.

**Tableau 3:** Liste des composés chimiques isolés des différentes parties du *Citrullus colocynthis* .

Composés	Partie de la plante	Référence
<b><u>Cucurbitacines :</u></b>		
Cucurbitacine E	Fruit complet	(Chen <i>et al.</i> , 2005; Tannin Spitz <i>et al.</i> , 2007 b; Torkey <i>et al.</i> , 2009; Ali <i>et al.</i> , 2013)
Curcubitacine B	Fruit complet	(Tannin-Spitz <i>et al.</i> , 2007b; Ali <i>et al.</i> , 2013)
Curcubitacine I	Fruit complet	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 2007; Ali <i>et al.</i> , 2013)
Curcubitacine A , Curcubitacine B	Fruit	(Adam <i>et al.</i> , 2001; Yoshikawa <i>et al.</i> , 2007)
Curcubitacine C, Curcubitacine D	Fruit	(Adam <i>et al.</i> , 2001)
Curcubitacine J, Curcubitacine K , Curcubitacine L, Colocynthosides A	Fruit	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 2007)
Colocynthosides B	Fruit	
<b><u>Glycosides, flavonoïdes et acides phénoliques</u></b>		
2-O- -D-glucopyranosyl-Cucurbitacine I, 2-O- -D-glucopyranosyl-Cucurbitacine L	Fruit	(Delazar <i>et al.</i> , 2006)
Isosaponarine, Isovitexine, Isoorientine 3-o-méthylether	Fruit, graines	(Delazar <i>et al.</i> , 2006; Gurudeeban <i>et al.</i> , 2010)
Catéchine, Myricétine,	Pulpe des Fruits	(Hussain <i>et al.</i> , 2013)
Quercétine	Fruits	(Meena and Patni, 2008; Hussain <i>et al.</i> , 2013)
Kaempferol	Pulpe des Fruits	(Hussain <i>et al.</i> , 2013)
Acide gallique, acide p-Hydroxybenzoïque, acide chlorogénique, acide caféique , acide vanillique , acide p-coumarique, acide sinapique, acide ferulique	Pulpe des Fruits	(Hussain <i>et al.</i> , 2013)

<p>Acide vanillique, acide hydrocinnamique, acide Benzoïque, acide p-hydroxyphenylacétique, acide hydrocinnamique, acide protocatechuique, acide p-coumarique, acide hexadecanoïque, acide ferulique, acide caffeique</p> <p>Colocynthix ou Citrulene (Glycoside formé d'un alcaloïde et d'un alcool cristallisable « le citrullol »</p>	<p>Racines</p>	<p>(BenHsouna et Alayed, 2012)</p> <p>(Power et Moor, 1910)</p>
<p><b><u>Alcaloïdes</u></b></p> <p>Choline</p> <p>Dérivés de la pyridine: C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> et C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>NO</p>	<p>Fruit complet, pulpe</p> <p>Pulpe des Fruits</p> <p>Fruits</p>	<p>(Najafi <i>et al.</i>, 2010; Mukherjee et Patil, 2012; Ali <i>et al.</i>, 2013)</p> <p>(Sayed <i>et al.</i>, 1973)</p> <p>(Sayed <i>et al.</i>, 1973)</p>
<p><b><u>Volatiles/Terpenoïdes</u></b></p> <p><b>Alcools:</b> 4-(1-méthyl)éthoxy-1-butanol; 5-méthoxy,2-méthyl,2-pentanol; 1-cyclopentyl, 2-propène-1-ol ; 2-furanméthanol,tétrahydro-5-méthyl- (isomères cis et trans);</p> <p>Heptacosane-1-ol, n-octacosanol, 1, 26 hexacosane-diol</p> <p>Citrullol</p> <p><b>Cétones:</b> 3,4-diméthyl,2-hexanone; 2- méthyl,4-heptanone ; 3-Méthyl,2-heptanone;</p> <p><b>Composés epoxy :</b> 1-propoxy-pentane ; 2,3-époxy-méthyl propionate</p> <p><b>Hydrocarbones :</b> hentriacontane, tridecane, tétradecane, pentadecane et hexadecane.</p> <p><b>Deux autres composés:</b> Triméthylsilylméthanol et le 1,2-</p>	<p>Pulpe des Fruits</p> <p>Fruits</p> <p>Fruits</p>	<p>(Gurudeeban <i>et al.</i>, 2011)</p> <p>(Hatam <i>et al.</i>, 1990)</p> <p>(Power et Moor, 1910)</p>

benzenedicarboxylicacid, diisooctylester.		
<b><u>Acides gras</u></b>		(Sawaya <i>et al.</i> , 1983; Sadou <i>et al.</i> , 2007;
Acide palmitique, acide stéarique, acide linoléique, acide oléique	Huile des graines	Sebbagh <i>et al.</i> , 2009)
Acides myristique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linoléique	Graines	(Gurudeeban <i>et al.</i> , 2010)
<b><u>Tocophérols et Carotènes:</u></b> -tocophérol, -tocophérol, -carotène	Huile des graines	(Kalhoro <i>et al.</i> , 2002)

La colocynthoside A et la colocynthoside B, sont isolés à partir de l'extrait méthanolique des fruits poussant en Egypt. Les autres cucurbitacines isolées de la fraction butanolique étaient la cucurbitacine I 2-O- -D glucopyranoside, la cucurbitacine L 2-O- -D glucopyranoside , la cucurbitacine J 2-O- -Dglucopyranoside, la cucurbitacine K 2-O- -D glucopyranoside, l'hexanocucurbitacine I 2- O- -D glucopyranoside, et le khekadaengoside E (Dahmén et Leander, 1976; Hatam *et al.*, 1990; Yoshikawa *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009) (**Fig. 5**). Torkey *et al.* (2009) ont rapporté que le 2-O- -D-glucopyranosyl cucurbitacine E constitue la cucurbitacine majeure des fruits de *Citrullus colocynthis*.

Ces métabolites secondaires agissent comme des allomones ayant un rôle défensif des cucurbitacées vis-à-vis des attaques exercées par une variété de vertébrés et d'invertébrés (Metcalf, 1985).

Ces cucurbitacines possèdent des effets pharmacodynamiques variés et font l'objet de nombreux travaux de recherche. Leurs propriétés communes sont l'action purgative drastique et la cytotoxicité. Depuis l'Antiquité, plusieurs Cucurbitacées ont constitué des remèdes populaires contre diverses tumeurs (Hartwell, 1969).

Dans la littérature, on retrouve les effets gastro-intestinaux (action purgative et stimulante) bien décrits pour la cucurbitacine E, hepatoprotecteurs rapportés aux cucurbitacines B et E, antitumoraux dont seraient responsables les cucurbitacines B, D, E, I, L. Des effets diurétiques, cardiovasculaires, anti-inflammatoires, anovulatoires sont également rapportés. Les activités antifongiques relèveraient des cucurbitacines I et D et des activités insecticides sont attribuées aux cucurbitacines E et I (Miro, 1995).

### **I.2.2. Alcaloïdes**

Plusieurs études ont rapporté la présence d'alcaloïdes dans les fruits de *Citrullus colocynthis* (Sayed *et al.*, 1973; Najafi *et al.*, 2010; Mukherjee et Patil, 2012; Ali *et al.*, 2013). Sayed *et al.*, (1973) ont isolé une choline et deux alcaloïdes non identifiés de la pulpe des fruits de cette plante. Un screening phytochimique de l'extrait aqueux de l'écorce des fruits du *Citrullus colocynthis* a révélé la présence d'alcaloïdes tertiaires et quaternaires (Abdel-Hassan *et al.*, 2000). Afifi *et al.* (1973) de leur part, ont rapporté la présence de trois alcaloïdes ( $C_{10}H_{15}NO_3$ ,  $C_{20}H_{32}NO$  et  $C_{16}H_{24}NO_7$ ) dans la plante complète.

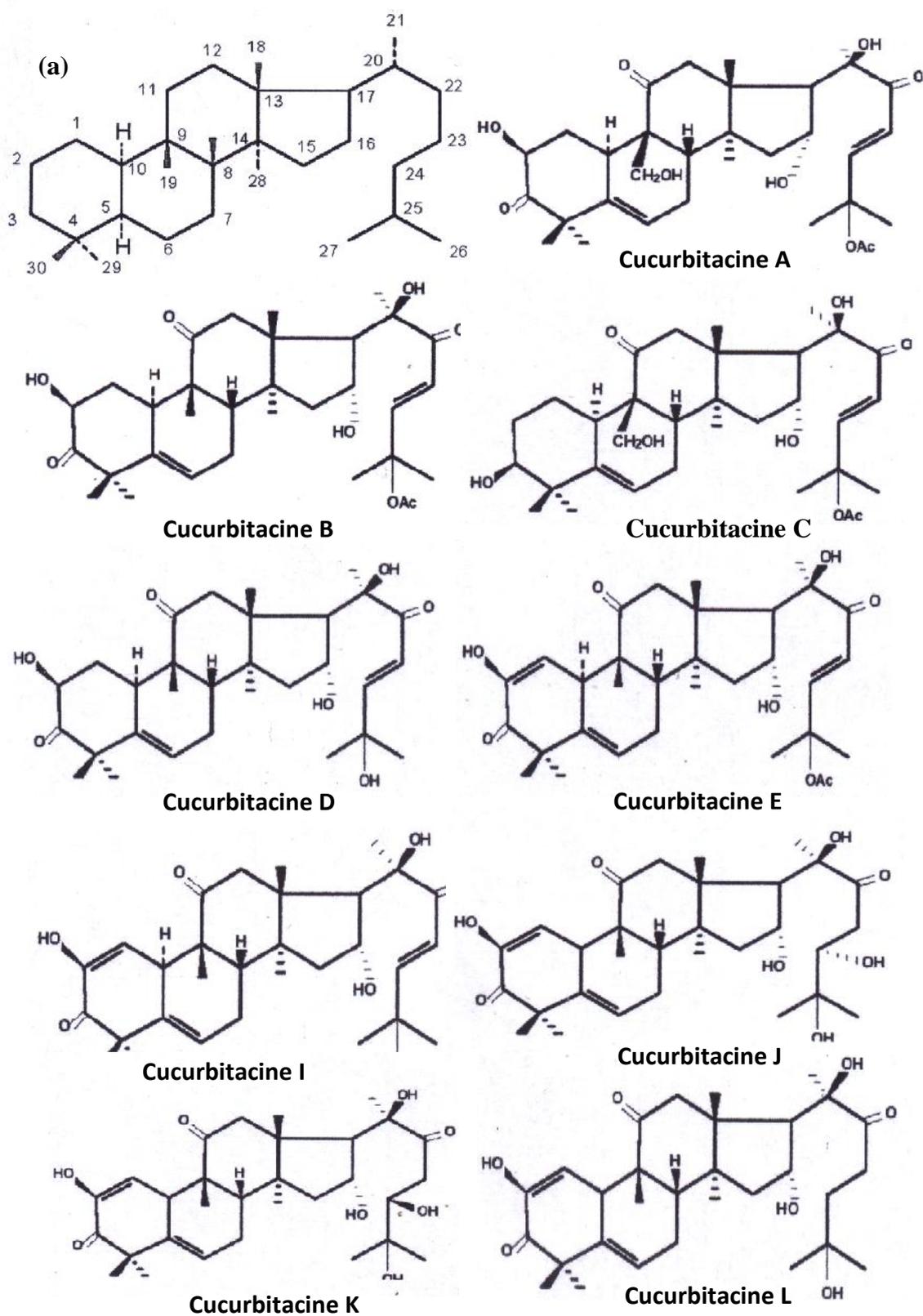
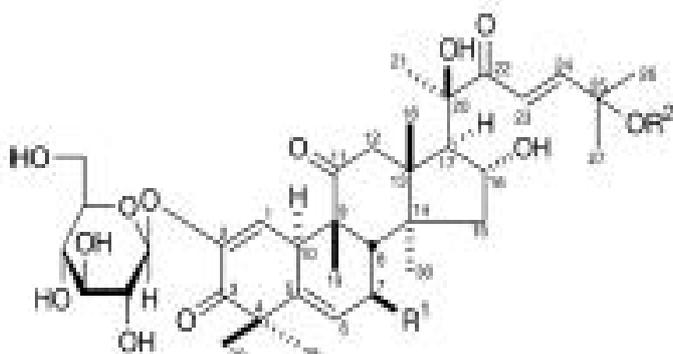


Fig. 4. Squelette principal des cucurbitacines (a) et structure chimique des cucurbitacines du *Citrullus colocynthis* (Gry et al., 2006).



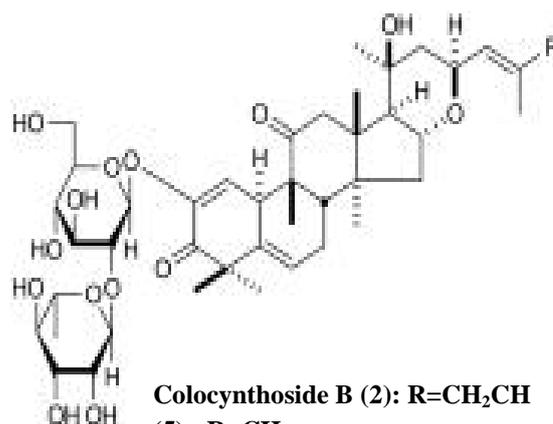
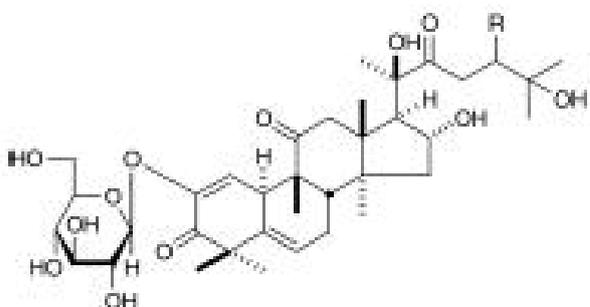
Colocynthoside A (1):

 $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{Ac}$ 

Cucurbitacine E 2-O- -D-glucopyranoside (3) :

 $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{Ac}$ 

Cucurbitacine I 2-O- -D-glucopyranoside (4) :

 $R^1 = R^2 = \text{H}$ Colocynthoside B (2):  $R = \text{CH}_2\text{CH}$ (5):  $R = \text{CH}_3$ 

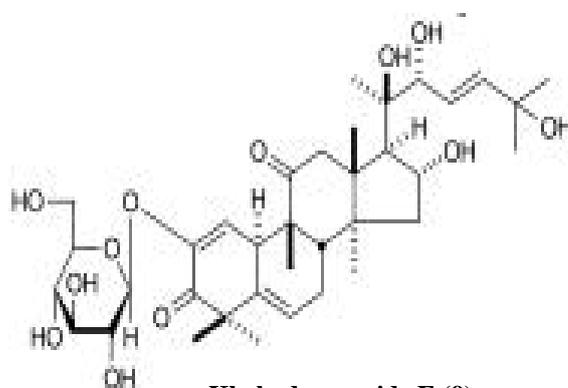
Cucurbitacine J 2-O- -D-glucopyranoside (6) :

 $R = -\text{OH}$ 

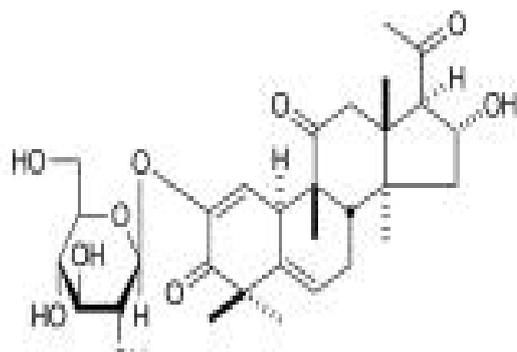
Cucurbitacine K 2-O- -D-glucopyranoside (7) :

 $R = -\text{OH}$ 

Cucurbitacine L 2-- -D-glucopyranoside (6) :

 $R = \text{H}$ 

Khekadaengoside E (9)



{22-27}-Hexanorcucurbitacine I 2-O- -D-glucopyranoside (10)

**Fig. 5.** Structure chimique des cucurbitacines glycosides du *Citrullus colocynthis* (Yoshikawa *et al.*, 2007).

Salama (2012) a pu isoler à partir des parties aériennes de la plante deux nouveaux alcaloïdes : le 2-(nonan-8-one)-(1H)-4 quinolone :  $C_{18}H_{23}NO_2$  et le nonan-8-one-(1H)-4-quinolone :  $C_{19}H_{25}NO_2$  (**Fig. 6a**). Selon Asyaz *et al.* (2010), le contenu en alcaloïdes totaux de la plante complète était estimée à  $1.64 \pm 0.02$  mg/100g.

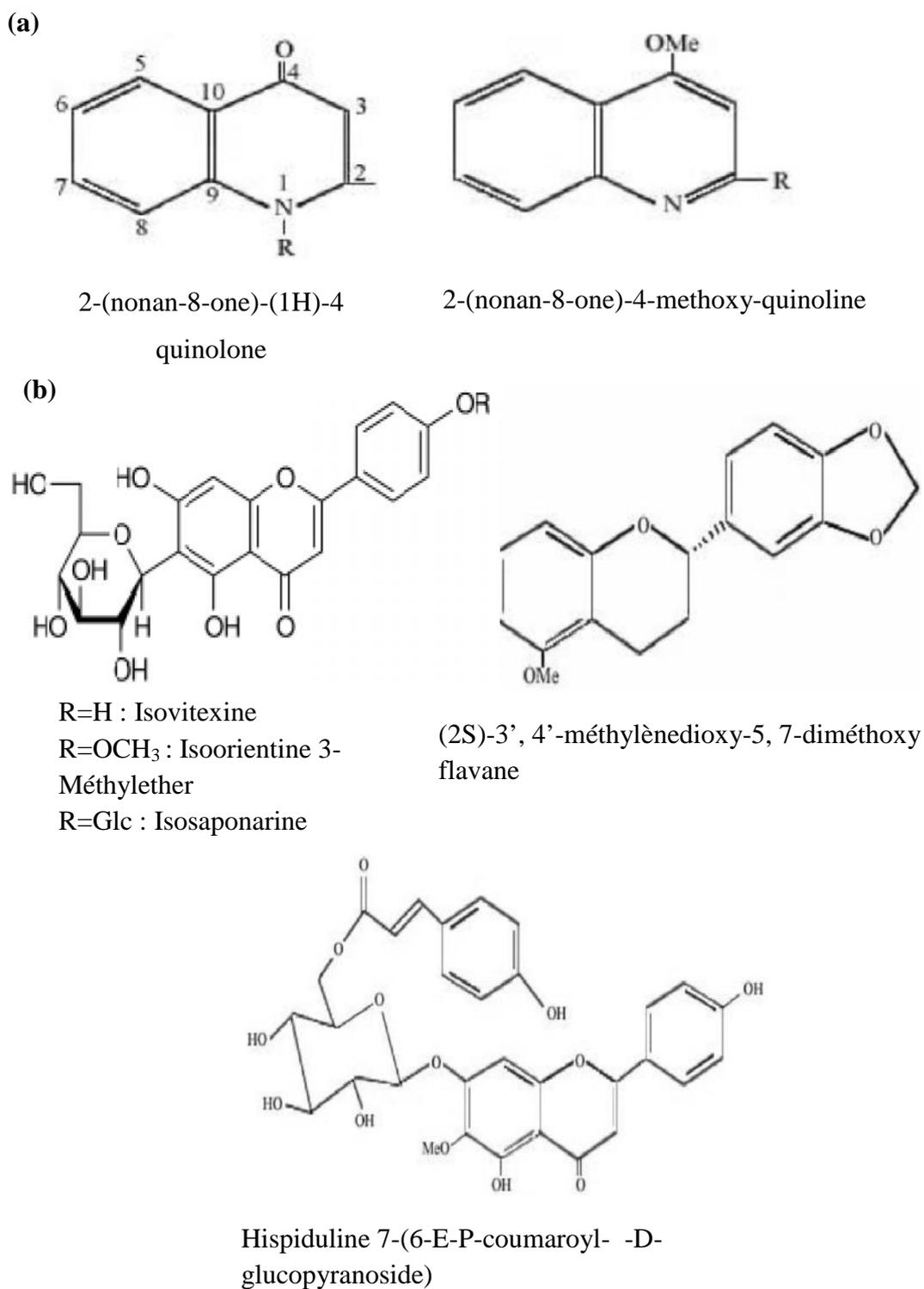
### I.2.3. Acides phénoliques et flavonoïdes

Un criblage phytochimique des fruits de *Citrullus colocynthis* a montré la présence des phénols et des flavonoïdes. Leur quantification a montré un taux en phénols totaux de 3.07mg/g de matière sèche (exprimés en équivalents d'acide gallique) et un taux en flavonoïdes totaux (exprimés en équivalents de catéchine) de 0.51mg/g de matière sèche (Hussain *et al.*, 2013). Cependant, une autre étude a rapporté un contenu de la plante complète en composés phénoliques de  $1.22 \pm 0.12$  mg/100g et en flavonoïdes de 1.39 mg/100g (Asyaz *et al.*, 2010).

Huit acides phénoliques: acide gallique, acide chlorogénique, acide p-hydroxybenzoïque, acide caféique, acide vanillique, acide p-coumarique, acide sinapique et acide ferulique sont trouvés dans l'extrait éthanolique des fruits de *Citrillus colocynthis* (Hussain *et al.*, 2013).

Une analyse par HPLC en phase inverse de la fraction butanolique issue de l'extrait hydrométhanolique des fruits du *Citrillus colocynthis* a montré la présence de trois flavonoïdes C-glycosylés : isosaponarine, isovitexine, iso-orientine et iso-orientine 3'-O-méthyl ether. Tandis que, les feuilles et les tiges contiennent d'autres flavonoïdes tels que les dérivés du C-p-hydroxybenzyl, 8-C-p-hydroxybenzoylisovitexine, 6-C-p-hydroxybenzoylvitexine, 8-C-p-hydroxybenzoyl isovitexine-4'-O-glucoside (Maatooq *et al.*, 1997; Delazar *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2007) (**Fig. 6b**).

Des analyses de chromatographie sur couche mince et sur colonne ont révélé la présence de quercétine et de myricétine dans l'extrait hydro-méthanolique des graines de la plante récoltée de Mechria et d'Aïn sefra, en Algérie. La présence de catéchine a été mise en évidence dans l'extrait hydrométhanolique et aqueux des graines (Benariba *et al.*, 2013). Les fleurs et les feuilles contiennent la quercétine et du Kaempferol (Harsh, 1989).



**Fig. 6.** Structure des alcaloïdes (a) et des flavonoïdes (b) isolés à partir du *Citrullus colocynthis* (Yoshikawa *et al.*, 2007; Salama, 2012).

Deux autres nouveaux flavonoïdes ont pu être isolés à partir des parties aériennes de la plante : le (2S)-3, 4-methylenedioxy-5, 7-dimethoxy flavane (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>) et l'hispiduline 7-(6-E-P-coumaroyl- -D-glucopyranoside) (C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>O<sub>13</sub>, **Fig. 6b**) (Salama, 2012).

#### I.2.4. Saponines

La présence des saponines a été mise en évidence dans la fraction butanolique obtenue à partir de l'extrait méthanolique des écorces de fruits de *C. colocynthis* (Diwan *et al.*, 2000, Abd el-Hassan *et al.*, 2000). Un contenu en saponines de 0.52±0.2 mg/100g au niveau de la plante entière est rapporté par Asyaz *et al.* (2010).

#### I.2.5. Acides gras et tocophérols

L'étude réalisée par Benariba *et al.* (2013) a permis d'obtenir un contenu lipidique de 18 à 21% par délipidation des graines de la plante à l'hexane. Une étude chimique effectuée sur 28 échantillons de graines de coloquinte collectée en Palestine, a révélé la richesse de ces dernières en huiles (17 à 19.5%). Ces huiles renferment l'acide linoléique avec un taux élevé (67.0% à 73%) par rapport aux acides gras totaux. Le deuxième acide gras majoritaire semble être l'acide oléique (11.7% à 15%) (Yaniv *et al.*, 1999). Les acides palmitique (8.1–17.3%) et stéarique (6.1–10.5%) constituent de leur part deux autres acides gras présents dans cette huile (Sawaya *et al.*, 1983; Sadou *et al.*, 2007; Sebbagh *et al.*, 2009). Bireche *et al.* (2017) ont rapporté que l'huile des graines de la coloquinte renferme neuf acides gras : l'acide margarique, palmitique, linoléique, oléique, stéarique, arachidique, behénique, myristique et palmitoléique. Les acides gras insaturés représentent 77.96% des acides gras totaux avec une abondance de l'acide linoléique (68.49%). Les acides gras saturés représentent 19.51% et le plus important est l'acide palmitique (10.22%).

Une autre étude a révélé que l'huile des graines constitue une bonne source en antioxydants naturels tels que : -tocophérol, -tocophérol et -carotène avec une composition respective de 45.1, 435 mg/kg et 0.18mg/kg (Kalhor *et al.*, 2002) (**Tableau 3**). Une étude menée par Talabani et Tofiq (2012) a révélé la présence de -sitosterol (16.92%) au niveau des graines de la plante.

#### I.2.6. Protéines et acides aminés

Le *Citrullus colocynthis* constitue une excellente source des différents acides aminés tels que: l'arginine, la méthionine et le tryptophane. Sur le plan nutritionnel, les acides aminés limitants semblent être la lysine et la thréonine. Selon Sawaya *et al.* (1988), l'acide glutamique et l'arginine étaient les principaux acides aminés identifiés (19.8 et 15.9 g d'acides aminés/100g de protéines respectivement) au niveau des protéines de la plante. Les

autres acides aminés majeurs (45 g d'acides aminés/100 g de protéines) trouvés sont: acide aspartique, serine, glycine, alanine, leucine et phénylalanine. Il semble aussi que les protéines des graines (13.5 %) de la coloquinte soient très riches en méthionine et cystéine (5.5 g/100 g de protéines) (Sawaya *et al.*, 1988).

### I.2.7. Minéraux et vitamines

Les fruits et les graines du *Citrullus colocynthis* contiennent plusieurs micronutriments (vitamines et minéraux). Le potassium et le calcium sont les principaux minéraux présents dans les graines, avec des concentrations de 569 mg et 465mg/100g de graines, respectivement. La graine renferme aussi le magnésium et de phosphore (Sadou *et al.*, 2007; Zaini *et al.*, 2011 ). L'analyse élémentaire de la plante a permis de révéler une forte teneur en sodium (78.34 ppm) suivi de magnésium (33.35 ppm), du cuivre (5.22 ppm), du fer (3.88ppm) et du chrome (3.72ppm). Cependant, le *Citrullus colocynthis* renferme aussi du manganèse, du soufre, du zinc, du plomb, du cadmium et du sélénium mais à l'état de trace (Asyaz *et al.*, 2010).

La plante semble être riche en vitamines notamment : riboflavine (0.61±0.1mg/100g), thiamine (0.26±0.18 mg/100g) et acide ascorbique (30.12±0.22mg/100g)

### I.2.8. Autres composés

Cependant, la plante contient d'autres composés tels que l'acide citrullique (Baba Aissa, 1999; Daniel, 2006). La pulpe des fruits contient une colocynthine glycoside (C<sub>56</sub>H<sub>34</sub>O<sub>23</sub> principe actif amer jusqu'à 14%) (Felter, 1922), une résine nommée colocynthéine, une pectine et une gomme. Les substances donnant la saveur extrêmement amère, sont la colocynthine et la colocynthétine (une substance cristalline). La colocynthine, sous l'influence d'une hydrolyse acide, produit une substance amorphe, la colocynthéine. Les fruits immatures renferment le p-hydroxy benzyl methyl ester (Hussain *et al.*, 1992). Les graines renferment des albuminoïdes (6%) (Gurudeeban *et al.*, 2010; Yoshikawa *et al.*, 2007; Nayab *et al.*, 2006). Les racines contiennent l'hentriacontane (Hussain *et al.*, 1992).

## I.3- Pharmacopée traditionnelle et connaissances indigènes

La coloquinte est une plante médicinale connue depuis l'antiquité. Ces utilisations médicinales ont été signalées parmi les médicaments indigènes dans différents pays notamment au Pakistan, en Inde, en Chine, en Afrique et en Asie. Elle est largement utilisée pour le traitement de nombreuses maladies à savoir : troubles intestinaux, diabète, hypertension, lèpre, rhume, toux, bronchites, asthme, jaunice, douleurs articulaires, maux de dents, blessures et cancer (Perveen *et al.*, 2007; Asyaz *et al.*, 2010; Qureshi *et al.*, 2010; Amamou *et al.*, 2011; Gurudeeban *et al.*, 2011) (**Tableau 4**).

### **I.3.1. Le fruit**

En Arabie saoudite, les fruits de *Citrullus colocynthis* sont utilisés comme purgatif, antirhumatismal, vermifuge, carminatives et comme remède pour les infections de la peau et des maux de gorge (Adam *et al.*, 2001). Au Pakistan et en Inde, le fruit est utilisé pour le traitement des : désordres gastro-intestinaux (tels que l'indigestion, les ulcères, la dysentérie, la gastro-entérite, les constipations et les douleurs coliques), infections bactériennes, diabète et le cancer chez l'être humain (Sharma, 1998; Perveen *et al.*, 2007; Asyaz *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010).

Le fruit et, en particulier, la pulpe est bien connu pour son effet cathartique naturel qui semble être le résultat de la présence de cucurbitacines (Berrut *et al.*, 1987). D'autres usages médicaux ont été rapportés : traitement des crises d'épilepsie, la syphilis et les infections parasitaires, les problèmes dermatologiques, bronchites, asthme, tuberculose, dysfonctionnements urinaires, inflammation, certaines infections gynécologiques, fièvre et anémies (Goldfain *et al.*, 1989; Wasfi *et al.*, 1995; Barceloux, 2008; Marzouk *et al.*, 2009; Marzouk *et al.*, 2010).

### **I.3.2. Les graines**

Les graines du *Citrullus colocynthis* sont utilisées pour le traitement du diabète. Elles constituent aussi une source possible d'huile comestible et de protéines (Sawaya *et al.*, 1986 ; Schafferman *et al.*, 1998). Elles sont fortement consommées par la population de certains pays africains. En effet, ils sont très populaires en Egypte comme substituts grillés et comestibles à la place des noix (Soliman *et al.*, 1985). Au Nigeria, les graines sont traditionnellement utilisées comme une base pour les soupes et les ragoûts, auquel il confère un effet épaississant, émulsifiant, liant les graisses et aromatisants (King et Onuora, 1984). Les nomades du Sahel emploient le goudron préparé à partir des graines de coloquinte pour donner une saveur à l'eau potable, comme conservateur, et comme médicament traditionnel à application topique pour les chameaux et l'homme (Habs *et al.*, 1984).

### **I.3.3. Les feuilles**

Les feuilles sont diurétiques et utilisées pour le traitement de l'asthme et la jaunisse (Qureshi *et al.*, 2010). Elles sont purgatives, utilisées pour le traitement de la mélancholie et les crises d'épilepsie (Heravi, 1992; Tonkaboni, 2007). En application externe, ces feuilles sont utilisées pour traiter l'inflammation et le saignement (IbnSina, 2005; Tonkaboni, 2007).

### I.3.4. Les racines

Dans les pratiques ethnobotaniques, les racines de la plante ont servi au traitement des cas d'inflammation du sein, des aménorrhées, des rhumatismes et des douleurs d'articulation (Al-Faraj, 1995). En application externe, ils sont utilisés pour soulager les douleurs ophtalmiques et utériques (Duke, 1983; Baba Aissa, 1999). Pour soigner les rhumatismes, la population des zones rurales préconise de faire chauffer la coloquinte coupée en deux sous la cendre, l'envelopper avec un linge et s'allonger dessous, ou l'attacher sur la partie douloureuse. Cela dégage une bonne chaleur qui soulage les douleurs (Al-Faraj, 1995). En plus, les racines constituent un antidote efficace contre les morsures des scorpions et de serpents (Razi, 2000).

## I.4- Activités biologiques

Les applications médicinales traditionnelles du *Citrullus colocynthis* ont inspiré de nombreuses enquêtes pharmacologiques. Plusieurs extraits et composés isolés de la plante ont été évalués pour leurs activités biologiques, en particulier leurs activités anticancéreuses, antimicrobiennes et antidiabétiques.

### I.4.1. Activités antidiabétiques

Le diabète sucré est l'une des maladies métaboliques à croissance très rapide. Le traitement est symptomatique et nécessite l'utilisation de substances chimiques à l'origine d'effets secondaires (troubles digestifs, nausées, vomissement, diarrhée, hyponatrémie, acidoses lactiques). D'où la nécessité de recherche de nouvelles molécules qui pourraient agir directement sur les médiateurs et présentant moins d'effets secondaires. L'emploi massif des fruits et des graines de coloquinte en médecine populaire pour ses effets antidiabétiques ont incité les chercheurs à lancer plusieurs travaux expérimentaux pour révéler, comprendre et fournir une plateforme scientifique à cette action pharmacologique (Al-Ghathithi *et al.*, 2004).

Abdel-Hassan et collaborateurs (2000) ont testé l'effet hypoglycémiant des extraits aqueux, de glycosides, d'alcaloïdes et de saponines préparés à partir de l'écorce de fruit de *C. colocynthis* chez des lapins ayant une glycémie normale. Tandis que des lapins diabétiques ont été utilisés pour élaborer les effets hypoglycémiants de l'extrait des saponines. Les résultats obtenus ont révélé que l'administration de l'extrait aqueux par voie orale aux lapins normaux provoque une réduction significative du taux du glucose plasmatique après 1 heure. Cette réduction pourrait être attribués à la présence d'alcaloïdes tertiaires et quaternaires, des glycosides et des saponines (Abdel-Hassan *et al.*, 2000). Un effet hypoglycémiant de même amplitude a été obtenue après 2 heures de l'administration de l'extrait glycosidique.

L'administration orale de l'extrait alcaloïdique à des lapins ayant une glycémie normale a provoqué un effet hypoglycémiant non significatif après 6 heures. L'extrait aux saponines administré aux lapins rendus diabétiques, a exercé un effet hypoglycémiant plus important après une heure. Ces résultats suggèrent que l'extrait aqueux de l'écorce de coloquinte possède un effet hypoglycémiant qui pourrait être attribué essentiellement à son contenu en saponines et en composés glycosidiques (Abdel-Hassan *et al.*, 2000).

Au royaume d'Emirates Arabes, le *Citrullus colocynthis* est également utilisé comme remède antidiabétique. Al-Ghaithi et collaborateurs (2004) ont testé l'effet de l'extrait aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* (L) sur certains paramètres biochimiques chez des rats normaux et d'autres diabétiques. Après apparition du diabète, une augmentation significative des taux plasmatiques de: l'alanine aminotransférase (ALT), la phosphatase alcaline (ALP), l'aspartate aminotransférase (AST), la gamma glutamyl transférase de (GGT) et la lactate déshydrogénase (LDH) a été constatée. L'administration orale de l'extrait pendant 2 semaines a pu réduire significativement le taux plasmatique de l'AST et du LDH mais il n'a pas pu diminuer les taux de GGT et de l'ALP chez les rats diabétiques. On a conclu que l'administration par voie orale de l'extrait aqueux de coloquinte peut améliorer certains effets toxiques de la streptozotocine (Al-Ghaithi *et al.*, 2004).

Le fruit du *Citrullus colocynthis* est largement utilisé par les herboristes pour le traitement du diabète en Iran. Un essai clinique utilisant les fruits *Citrullus colocynthis* pendant 2 mois a été mené afin de déterminer son efficacité chez 50 patients souffrant de diabète de type II. Deux groupes de 25 individus chacun soumis à une thérapie anti-diabétique, ont reçu des capsules de fruits de *Citrullus colocynthis*. Après chaque mois, l'hémoglobine glycosylée (HbA1c), la glycémie à jeun, le cholestérol total, lipoprotéines de basse densité (LDL), lipoprotéine de haute densité (HDL), triglycérides, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase, phosphatase alcaline, les niveaux d'urée et de créatinine ont été déterminés au début et après deux mois de traitement. Les résultats ont montré une diminution significative de l'HbA1c sanguin et de la glycémie à jeun chez les patients traités par le *Citrullus colocynthis*. Les niveaux des autres paramètres sérologiques des deux groupes n'ont pas changé de manière significative. Aucun effet secondaire gastro-intestinal notable n'a été observée chez les deux groupes (Huseini *et al.*, 2009).

**Tableau 4:** Les usages médicaux des différentes parties du *Citrullus colocynthis*.

Partie de la plante	Mode d'utilisation	Utilisation	Référence
<b>Graines</b>	Huile des graines	Douleurs intestinales	(Nadkarni, 1954)
	Huile des graines	Epilepsie	(Dey, 1980)
	Huile des graines	Fins culinaires	(Badifu et Ogunsua, 1991)
	Poudre des graines	Soupe épaississant et agent aromatisant	(Joshi, 2000)
	Huile des graines	Utile pour la croissance des cheveux et les maintenir noir	(Pawan <i>et al.</i> , 2004)
	L'huile des graines appliquée sur les cheveux	Noircir les cheveux gris	(Ali <i>et al.</i> , 2004)
	Pâtes des graines	Paludisme	
<b>Fruits</b>	Petits fruits collectés au cours de la saison des pluies, farcies avec du sel et ajwain ( <i>Trachyspermum ammi</i> , famille des <u>Apiaceae</u> )	Douleur aigue de l'estomac	(Singh et Pandey, 1983)
	Extrait de pulpe		(Singh <i>et al.</i> , 1996)
<b>Fruits</b>	Jus de fruit mélangé au sucre	Antibactérien	(Nadkarni, 1998)
<b>Fruits</b>	Jus préparé des fruits frais. Un coton trempé dans le jus est placé sur le col de l'utérus.	Faciliter et accélérer l'accouchement	(Sharma, 2002)
<b>Fruits</b>	Décoction		(Dafni et Lev, 2002)

<b>Fruits</b>	Fruits à faibles doses	Hépatites	(Mitaliya et Bhatt, 2003)
<b>Fruits</b>	La pulpe du fruit séché mis en poudre et pris oralement	Urticaire, constipation	(Nargas et Trivedi, 2004)
<b>Fruit et racine</b>	Patte à base de fruit et racine avec l'eau	Provoque l'avortement	(Kirtikar et Basu, 2001)
<b>Fruit et racine</b>	Fruits et racines antidote	Furoncles et les boutons	(Tiwari <i>et al.</i> , 2003)
<b>Fruit et graines</b>	Confiture prépare à partir de pulpe de fruits et de graines	(b) Venin de serpent Efficace pour guérir les affections hépatiques chez les animaux	(Shah, 2005)
<b>Racine</b>	Un cataplasme de racines Poudre de racines mélangées avec le gingembre Des parts égales de racine et de poivre sont données sous forme de pilule Une pâte de la racine appliquée à l'abdomen élargie des enfants Pate de racine Racine mélangé avec du lait de vache est appliqué sur le bas-ventre	Inflammation des seins Inflammation des articulations, Rhumatisme  Abdomen élargie (a) L'ascite, la jaunisse, les maladies urinaires et rhumatisme. Facilliter l'accouchement	(Nadkarni, 1998) (Joshi, 2000)  (Kirtikar et Basu, 2001)  (Tiwari <i>et al.</i> , 2003) (Yadav <i>et al.</i> , 2006)
<b>Plante complète</b>	Extrait glycosidique (50 mg / kg)	Hypoglycémiant	(Bharate et Olier, 2006)

#### I.4.2. Activité antilipidémique

L'effet du *Citrullus colocynthis* sur la diminution du taux des lipides a été étudié en utilisant le modèle de l'hyperlipidémie provoqué chez l'animal et chez des sujets humains hyperlipidémiques. L'extrait éthanolique de la plante administré à des lapins hyperlipidémiques a pu ramener le taux de cholestérol sérique à la valeur normale (Daradka *et al.*, 2007). Chez des rats diabétiques présentant une hyperlipidémie induite par l'alloxane, l'extrait hydro-éthanolique de la pulpe du *Citrullus colocynthis* a provoqué une réduction significative des niveaux de: cholestérol total, triglycérides, acides gras libres et phospholipides dans le sérum et le foie en comparaison aux rats diabétiques non traités (Dallak, 2011).

L'étude effectuée chez les patients non-diabétiques, a révélé qu'un apport quotidien de poudre de graines de *Citrullus colocynthis* a pu réduire la concentration de triglycérides et de cholestérol (Rahbar and Nabipour, 2010).

L'effet des alcaloïdes totaux des graines de la coloquinte sur les désordres métaboliques induits par une diète hyperlipidique a été analysé chez des rats males Wistar. Après quatre mois de régime hyperlipidique, les animaux ont reçu une injection intrapéritoniale unique de l'extrait des alcaloïdes totaux de coloquinte pendant 5 semaines. Chez les animaux traités à la coloquinte, une réduction de la triglycéridémie, de la cholestérolémie et des lipoprotéines de faible densité (LDL) est notée. L'activité enzymatique de l'AST, l'ALT et la PAL a aussi enregistré une réduction (Tabani *et al.*, 2015).

Après huit semaines de la consommation d'une ration enrichie en l'huile de tournesol et en l'huile des graines mures de coloquinte, la progéniture de rats femelles obèses ont présenté une diminution du taux sanguins de triglycérides et de cholestérol (Meziane *et al.*, 2012). Les extraits hydrométhanoliques des graines et de la pulpe des fruits de CCT ont démontré des effets anti-hyperlipimiant chez des lapins mâles résultant d'une diminution des taux de cholestérol et de triglycérides (Zamani *et al.*, 2007).

#### I.4.3. L'activité antimicrobienne

Les résultats des différentes études ont démontré des activités antimicrobiennes des extraits du *Citrullus colocynthis* sur les deux souches de bacilles à Gram<sup>+</sup> (*E. coli*, *P. aeruginosa*) et les cocci à Gram<sup>-</sup> (*S. aureus* et *Enterococcus faecalis*) et anticandidoses (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. kreusei* et *C. parapsilosis*) (Marzouk *et al.*, 2009, 2010b). Ces effets semblent être variables suivant le germe étudié (Marzouk *et al.*, 2009). Des études menées au Pakistan ont trouvé que les extraits éthanoliques bruts des fruits, des feuilles, des

tiges et des racines de la coloquinte étaient actifs sur les bacilles à Gram<sup>+</sup>: *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. L'activité à l'égard des bactéries à Gram<sup>-</sup> (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) était faible (Memon *et al.*, 2003).

L'activité antibactérienne de extraits du *Citrullus colocynthis* préparés dans divers solvants a été étudiée sur certaines bactéries pathogènes à savoir *Bacillus cents*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* et *Staphylococcus epidermidis*. La plupart des extraits présentaient une concentration minimale inhibitrice (CMI) modérée dans la gamme de 20 à 100 µg/ml contre tous les agents bactériens pathogènes. Une autre étude menée en Iran a révélé que les effets inhibiteurs des extraits aqueux et éthanolique des fruits de *Citrullus colocynthis* sur les souches Standard (ATCC25923) et les souches de *Staphylococcus aureus* isolées à l'hôpital à partir des patients étaient comparables à celle de l'antibiotique standard, la novobiocine (Sharma *et al.*, 2010).

L'activité antifongique des extraits méthanoliques et aqueux des graines de CCT collecté en Algérie a été évaluée in vitro sur des souches d'Aaspergillus, des champignons plantes pathogènes. Les résultats ont révélé que l'extrait méthanolique présente un effet antifongique plus important par rapport à l'extrait aqueux. L'extrait méthanolique a inhibé la croissance des souches : *A. ochraceus*, *A. fumigatus* et *A. niger* mais *Aspergillus flavus* était plus résistant et a nécessité une concentration d'extrait plus importante (Gacem *et al.*, 2013).

L'extrait des alcaloïdes totaux des fruits de coloquinte a présenté des effets antibactériens sur *E. coli*, *S. aureus*, *Sreptococcus sp.* et *Klebsiella. sp* (Al-hejjaj *et al.*, 2010). L'extrait éthanolique des fruits et des parties aériennes de la plante a montré une forte activité antibactérienne sur les bactéries : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, et *Salmonella typhi* et un effet de moindre importance sur *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae* et aucun effet sur *Proteus vulgaris* et *Vibrio cholrae*. Une activité antifongique est enregistrée avec l'extrait éthanolique appliqué sur les champignons : *Aspergillus flavus* et *A. fumigatus*, de moindre importance chez *Mucor sp.* avec absence totale sur *C. albicans* et *Penicillium sp* (Gurudeeban *et al.*, 2011).

Bnyan *et al.* (2013) ont montré que l'extrait éthanolique de la pulpe des fruits de CCT exerce une inhibition maximale sur *E. coli*, suivi de *Proteus mirabilis* et de *Staphylococcus aureus*. Un effet plus faible est noté sur *Streptococcus agalactica* avec un effet très faible jusqu'à nul sur *S. pneumoniae* et *K. pneumoniae*. L'extrait aqueux n'a présenté aucun effet sur les bactéries testées.

#### I.4.4. Activité anti-inflammatoire

Le *Citrullus colocynthis* est l'une des plantes utilisées dans la médecine populaire en raison de ses propriétés anti-inflammatoires. L'extrait aqueux des différentes parties de la plante (fruits et graines à différents stades de maturité, feuilles, tiges et racines) injecté par voie intrapéritoniale a été testé pour ses activités anti-inflammatoires en induisant l'inflammation par injection de la carrhagénine au niveau de la voûte plantaire de la patte postérieure droite du rat (Marzouk *et al.*, 2010a). Tous les extraits ont produit une réduction dose dépendante de l'œdème de la patte le long de la période d'observation. Une réduction plus significative de l'activité anti-inflammatoire est remarquée avec les extraits de graines et des fruits immatures (Marzouk *et al.*, 2010a).

Dans une autre étude, l'activité anti-inflammatoire des différents types d'extraits (d'éther de pétrole, chloroformique, d'éthyl acétate, aqueux et méthanolique) des graines et des fruits de *Citrullus colocynthis* a été évaluée en utilisant le même modèle. L'étude a révélé que tous les extraits étaient capables de baisser l'œdème de la patte le long de la période d'observation (Marzouk *et al.*, 2011).

Le travail réalisé par Rajamanickam *et al.* (2010) a permis d'étudier l'effet du traitement des rats males avec de l'extrait méthanolique des feuilles de CCT par voie orale 1 heure avant l'induction de l'inflammation aigue par l'agent phlogogène (carrhagénine) en présence de médiateurs chimiques: sérotonines et prostaglandines E. L'extrait des feuilles a baissé significativement l'œdème induit au niveau de la patte par la carrhagénine comparativement à la sérotonine et aux prostaglandines E.

L'effet de l'extrait hydrométhanolique de la pulpe des fruits de CCT administré par gavage pendant 42 jours sur le taux de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- ) et de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) a été étudié chez des souris BALB/c normaux et d'autres rendues obèses. Les résultats ont montré une augmentation dans les niveaux de sécrétion de l'IL-10, l'IL-6 et le TNF- chez les souris obèses. L'administration de l'extrait de CCT a permis de réduire la sécrétion de l'IL-6 et du TNF- chez les souris obèses. De même, cet extrait a diminué l'expression du TNF- et de l'IL-6 chez les souris normales (Sanagdol *et al.*, 2011).

#### I.4.5. Activité anti-oxydante

Les extraits du *Citrullus colocynthis* sont riches en antioxydants (Sebbagh *et al.*, 2009). Des études réalisées in vitro sur des extraits de fruits de la plante ont révélé son excellent potentiel antioxydant (Kumar *et al.*, 2008). L'effet scavenger de l'extrait des fruits augmente avec l'augmentation de la concentration (Kumar *et al.*, 2008). L'activité antioxydante des

trois flavonoïdes (isosaponarine, isovitexine et isoorientin3-O-méthyléther), isolés à partir de *Citrullus colocynthis* a été déterminée par l'essai au 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et les valeurs de  $RC_{50}$  (concentration qui scavenge 50% de DPPH de radicaux) ont été trouvés dans la plage de  $5,62 \times 10^{-4}$  à  $7,13 \times 10^{-2}$  mg/ml. Tandis que, la valeur de  $RC_{50}$  du contrôle positif, la quercétine, était de  $2,78 \times 10^{-5}$  mg/ml dans cette étude (Kumar *et al.*, 2008).

Marzouk *et al.* (2010b) ont rapporté que l'activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* était très importante. Les cucurbitacines glycosides du *Citrullus colocynthis* ont présenté des propriétés de piégeage des radicaux de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) dits ABTS, probablement grâce à l'implication d'un effet de piégeage direct sur plusieurs radicaux libres (Tanin-Spitz *et al.*, 2007a).

Une diminution significative du taux de peroxydation lipidique a été remarquée chez des rats rendus diabétiques par l'injection de l'alloxane puis traités par voie intrapéritoniale avec l'extrait aqueux des graines de la coloquinte. De même, une diminution significative des activités enzymatiques des enzymes antioxydants clés tels que: le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), le glutathion (GSH) et le glutathion peroxydase (GPx) a été notée chez ces animaux (Jeyanthi *et al.*, 2011).

#### **I.4.6. Activité anticancéreuse**

Nombreux sont les travaux qui se sont intéressés à l'étude de l'activité anti-proliférative et antitumorale des extraits du *Citrullus colocynthis* et ses composés isolés notamment les cucurbitacines (Chen *et al.*, 2005; Tanin-Spitz *et al.*, 2007a; Liu *et al.*, 2008a, Yin *et al.*, 2008). En effet, les cucurbitacines I et Q se sont révélés capables d'inhiber spécifiquement la phosphorylation du STAT<sub>3</sub> (signal transducer and activator of transcription 3), une protéine qui contribue à la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses (Blaskovich *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005). D'autre part, il a été rapporté que le cucurbitacine E peut inhiber la prolifération des cellules du cancer de la prostate et entraîner une désorganisation de la structure des protéines du cytosquelette (actine et vimentine) (Duncan *et al.*, 1996; 1997). Les cucurbitacines B, D, E et I, peuvent inhiber la croissance de plusieurs lignées de cellules cancéreuses ainsi que l'activité du cyclooxygénase2 (COX-2) mais non celle du cyclooxygénase 1 (COX-1) (Jayaprakasam *et al.*, 2003).

Tannin-Spitz et ses collaborateurs (2007) ont trouvé que cucurbitacines glycosides B et E extraits à partir des feuilles du *C. colocynthis* sont capables d'inhiber la croissance de lignées de cellules du cancer du sein chez l'être humain.

---

---

L'étude de l'effet de la cucurbitacine B sur une lignée cellulaire du cancer du larynx humain (Hep-2) a révélé une inhibition de la prolifération cellulaire (Liu *et al.*, 2008b). L'analyse par cytométrie de flux a montré que le traitement avec les cucurbitacines a entraîné une accumulation des cellules dans la phase G<sub>2</sub>/M du cycle cellulaire et a induit l'apoptose des cellules. Les cellules traitées ont révélé une réduction rapide du niveau du complexe protéique clé nécessaire au passage de la phase G<sub>2</sub> et l'initiation de la mitose, nommé p34 CDC<sub>2</sub> / Cycline B<sub>1</sub>. Le traitement par les cucurbitacines a provoqué aussi le changement de la morphologie cellulaire de la forme allongée à la forme arrondie ce qui indique une désorganisation des filaments d'actine. Ces changements morphologiques profonds peuvent influencer de leur part les signaux intracellulaires via certaines molécules, entraînant une inhibition de la transmission du signal de la survie. De plus, le traitement par ces cucurbitacines glycosides semble être à l'origine du phénomène d'apoptose traduit par : la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire et les corps apoptotiques qui ont été clairement observées par la coloration au Hoechst 33258 (Tannin-Spitz *et al.*, 2007).

L'analyse par Western blot a montré que l'expression de p-STAT3, la cycline B1 et des protéines Bcl-2 a été supprimée de manière significative. La cucurbitacine B a inhibé la prolifération cellulaire et a induit l'apoptose dans les cellules Hep-2 par suppression de la voie de signalisation STAT<sub>3</sub> et via une down régulation de l'expression de cycline B1 et des protéines Bcl-2 (Liu *et al.*, 2008b).

#### **I.4.7. Activité antiallergique**

Cet effet, comparativement à l'ensemble des activités biologiques de la plante, semble être très peu exploré. Ceci pourrait être probablement dû à une difficulté de la mise en œuvre d'un modèle expérimental adéquat d'allergie.

Pour évaluer les actions antiallergiques du colocynth, Yoshikawa *et al.* (2007) ont mis au point un modèle d'allergie de type I. Dans ce modèle, une réaction d'anaphylaxie cutanée et passive est induite au niveau des oreilles de souris et ceci en injectant des IgE préparés dans un tampon phosphate (PBS) par voie intradermique. Les effets de l'extrait méthanolique et du cucurbitacine E 2-O-β-D-glucopyranoside isolé de cet extrait sont testés par leur administration orale après 47 heures de l'injection de l'IgE.

L'extrait méthanolique a éprouvé un effet inhibiteur des réactions d'anaphylaxie cutanées. De son côté, le cucurbitacine E 2-O-β-D-glucopyranoside, a montré une activité antiallergique intéressante (Yoshikawa *et al.*, 2007).

#### I.4.8. Activité antidépressive et anticonvulsive

L'administration intrapéritoniale des extraits aqueux et éthanoliques des fruits de colocynth à des souris BALB/c a permis de réduire le temps d'agitation et d'augmenter significativement la durée d'immobilisation de ces animaux. Cette étude a suggéré que les extraits de CCT possèdent des effets antidépressif et sédatifs qui peuvent être d'un intérêt thérapeutique chez les patients présentant des désordres dépressifs (Nafisi *et al.*, 2016).

L'activité anticonvulsive de l'extrait hydroalcoolique de la pulpe des fruits de CCT administré par voie IP est étudié chez quatre groupes des souris males. Après 30 min, les différents groupes reçoivent une dose d'un agent chemoconvulsant : le pentylenetetrazole par voie IP. Les résultats ont montré que l'extrait de CCT a prolongé significativement la période de latence des crises et a réduit leur durée en comparaison au groupe contrôle traité avec une solution saline normale. De même, l'effet du flumazenil, un antagoniste du récepteur de benzodiazépines, sur l'activité anticonvulsive de l'extrait du CCT est étudié dans le but de rechercher une probable implication des récepteurs de benzodiazépines. Le flumazenil est administré 5 min avant l'administration de l'extrait de CCT et 35 min avant l'injection du pentylenetetrazole. L'effet s'est traduit par une inhibition de la période de latence prolongée induite par l'extrait sans influencer la durée des crises. L'effet modulateur probable des récepteurs des opioïdes dans l'activité anticonvulsive de l'extrait du CCT, le naloxone, un antagoniste des récepteurs des opioïdes est administré 5min avant l'administration de l'extrait de la plante et 35 min avant l'injection du pentylenetetrazole aux animaux. Les résultats ont révélé une prolongation de la période de latence et de la durée des crises en comparaison au groupe traité à l'extrait de la plante seul (Mehrzadi *et al.*, 2015).

#### I.4.9. Autres propriétés pharmacologiques

L'activité antihistaminique de l'extrait à l'éther de pétrole et aqueux des feuilles de CCT a été étudié chez des souris Swiss Albino en utilisant le modèle de catalepsie induite par la clonidine et l'haloperidol. La clonidine, un agonsite des récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques, induit une catalepsie chez les souris, une action qui est inhibée par les antagonistes des récepteurs H1 de l'histamine mais non ceux des récepteurs H2 (Jadhav *et al.*, 1983). L'haloperidol se lie essentiellement aux récepteurs dopaminergiques de sous type D2. Les résultats ont montré que l'extrait à l'éther de pétrole inhibe la catalepsie induite par la clonidine sans exercer un effet sur celle induite par l'haloperidol. Ce qui suggère que cette inhibition soit exercée via une action anti-histaminique et non dopaminergique (Talole *et al.*, 2011).

---

---

L'effet anesthésique local de l'extrait à l'éther de pétrole des feuilles de CCT a été évalué chez des grenouilles adultes (*Rana hexadactyla*). L'effet est évalué en exposant le nerf sciatique des grenouilles pendant 5 min en présence d'une pièce de coton imbibée dans l'extrait des feuilles de CCT. Après ce temps d'incubation, la patte postérieure est trempée dans un bécher contenant le HCl pour mesurer l'activité anesthésique locale. Les résultats ont montré un retrait rapide de la patte du bécher contenant l'acide en l'absence de traitement avec l'extrait du CCT. Ce réflexe a disparu après traitement avec l'extrait (Ramanathan *et al.*, 2011).

L'activité anti-ulcéreuse du CCT est évaluée par le modèle du pylore ligaturé. L'administration de l'extrait aqueux et éthanoliques des fruits de CCT est réalisée par voie orale. Le prétraitement des rats males Wistar avec l'extrait aqueux et éthanolique a entraîné une diminution significative du volume gastrique, de l'acidité totale et libre. Cependant, le pH du suc gastrique a significativement augmenté. Une diminution significative dans le nombre des ulcères et de l'index d'ulcération est enregistrée dans ce modèle d'ulcération (Prasanth Reddy, 2012).

L'effet du *Citrullus colocynthis* sur la croissance des poils a été étudié chez des rats albinos. Les résultats ont indiqué que le temps d'initiation de la croissance des poils a été réduit de moitié après traitement avec l'extrait à l'éther de pétrole par rapport aux animaux témoins non traités. De plus, le traitement a réussi à faire un plus grand nombre de follicules pileux à la phase anagène par rapport au médicament standard, le minoxidil (Roy *et al.*, 2007).

D'autre part, et dans un but de la lutte biologique, l'extrait de *C. colocynthis* a été testé sur des chenilles *Lymantria dispar*. Il s'est avéré que cet extrait induit une baisse importante de la consommation de la nourriture par les chenilles en relation probablement avec un effet antiappétant. Des fonctions vitales de l'insecte ont été également affectées (Benhsain, 2005). L'activité insecticide des extraits de fruits de *Citrullus colocynthis* à l'hexane, au chlorure de méthylène, au chloroforme et à l'éthanol contre *Aphis craccivora* a été observée (Torkey *et al.*, 2009). Dans une autre étude, les différents extraits de *Citrullus colocynthis* ont montré des effets larvicides contre les larves de moustiques (Rahuman *et al.*, 2008). Dans cette étude, le fractionnement de l'extrait à l'éther de pétrole a conduit à la séparation et l'identification d'acides gras ; l'acide oléique et linoléique ont été identifiés comme étant les composés larvicides, qui étaient efficace contre les larves des insectes : *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* Liston et *Culex quinquefasciatus*. Les résultats de cette étude montraient clairement

---

---

que l'extrait et la fraction du *Citrullus colocynthis* qui contiennent l'acide oléique et linoléique montrent une mortalité larvaire élevée (Rahuman *et al.*, 2008).

### **I.5. Toxicité du *Citrullus colocynthis***

Bien que les fruits du *Citrullus colocynthis* aient une longue histoire comme médicament, les rapports sur son innocuité et sur l'évaluation de la sécurité sont bien rares. De plus, peu de données sont disponibles sur l'effet dose réponse des toxines de la coloquinte, en partie à cause de l'absence d'identification du composé spécifique associée aux effets toxiques remarqués.

Les bio-marqueurs associés à la toxicité de la coloquinte ne sont pas actuellement disponibles. Cependant, les effets toxiques observés peuvent être reliés à la présence de certaines de substances dans la plante telles que des alcaloïdes, des saponines, des glycosides, des cucurbitacines qui sont présents à la fois sous formes glycosylés et aglycones et probablement d'autres substances chimiques. Ce qui augmente le risque de réactions indésirables par leurs effets additifs ou synergétiques.

Peu de données sont disponibles sur la toxico-cinétique de ces différents composés notamment les cucurbitacines de la coloquinte chez les mammifères. Ce qui est connu en relation avec la biodisponibilité de ces molécules est le temps d'apparition des symptômes de toxicité qui varient suivant l'espèce animale utilisée dans l'expérimentation, la voie d'administration du composé et la quantité administrée. Des études *in vitro* suggèrent que la coloquinte inhibe les réactions dépendantes du CYP1A, CYP2B et CYP3A, mais il existe peu de données sur l'importance clinique de ces réactions potentielles (Barth *et al.*, 2002).

Des méthodes analytiques sensibles sont disponibles pour la détection des cucurbitacines. La limite de quantification du cucurbitacine I dans le plasma par la chromatographie liquide/spectrométrie de masse est d'environ 10 ng/ml (Molavi *et al.*, 2006).

#### **I.5.1. Etiologie et symptômes d'intoxication**

##### **I.5.1.1. Etiologie**

L'extrême amertume des différentes préparations à base de la plante limite leur utilisation et par conséquent les intoxications chez l'être humain. Néanmoins, l'utilisation anarchique de la plante par certains gens afin d'obtenir certains effets thérapeutiques, sans respecter les doses administrées ou leur états pathologiques, peuvent être les principales causes de l'intoxication par cette plante. Plusieurs auteurs ont rapporté des cas d'intoxications chez des hommes et des femmes ayant utilisés les fruits de colocynth sous la proposition des

---

---

tradipraticiens pour plusieurs raisons : traitement de constipation chronique (fragment de fruit frais dans le rectum), le diabète (extrait des fruits), douleurs abdominales, comme agent hypoglycémiant, nettoyage interne du corps (pulpe des fruits) (Goldfain *et al.*, 1989; Khan *et al.*, 2003; Javadzadeh *et al.*, 2013).

### **I.5.1.2. Signes cliniques**

Les symptômes qui ont été rapportés chez l'être humain en cas d'intoxication par la coloquinte peuvent être résumé en : ténesme, diarrhée aqueuse, mucosale puis sanglante, des vomissements, des douleurs abdominales et coliques avec déshydratation (Al-Faraj, 1995; Khan *et al.*, 2003), des rectorragies (Javadzadeh *et al.*, 2013), une hypotension, une hypoglycémie, une augmentation du taux d'hématocrite avec hyperleucocytose et un endommagement hépatique avec augmentation des taux de l'ALT et l'AST (Rezvani *et al.*, 2013).

En plus de ces symptômes, des doses fortes peuvent provoquer une faiblesse, des évanouissements, des troubles sensoriels, des vertiges et une délire, qui peuvent être suivies par un collapsus circulatoire et enfin par la mort (Soulier *et al.*, 1979; Goldfain *et al.*, 1989).

Les lésions pathologiques impliquent principalement: un œdème, un érythème, des érosions superficielles et des exsudats inflammatoires de la muqueuse du côlon descendant et du sigmoïde. Les examens colonoscopiques ont indiqué l'absence d'ulcérations et de formation de pseudo-polypes. Les symptômes disparaissent généralement en l'espace de 3 à 6 jours et les lésions pathologiques disparaissent dans les 14 jours sans séquelles (Goldfain *et al.*, 1989).

### **I.5.1.3. Données générales humaines**

La pulpe des fruits du colocynth présente une fenêtre thérapeutique étroite. Dans la littérature, il est suggéré que les doses thérapeutiques acceptées des fruits du *Citrullus colocynthis* fluctue entre 0.6 à 1.75 g/jours et entre 0.1 à 0.4 g/jours, selon la médecine traditionnelle Iranienne (MTI) et la thérapie moderne respectivement. Les graines doivent être administrées à raison de 120 à 300 mg (max 600 mg) par jours, la poudre des racines à raison de 0.2 à 0.4 g/ jours. Si le fruit est administré avec ses correctifs tels que: la gomme arabique, les effets indésirables sont réduits et des doses supérieures sont permises (Rahimi *et al.*, 2012). In vitro, l'extrait de *C. colocynthis* est considéré exempt de toxicité à des concentrations jusqu'à 100 µg/ml (Barth *et al.*, 2002).

La pulpe du fruit séchée est irritante pour les yeux et provoque une douleur intense en contact avec la muqueuse nasale (Blacow et Wade, 1972).

La pulpe du fruit est réputée d'être capable de provoquer des fausses couches, lorsqu'il est administré à des femmes enceintes, effet pour lequel la plante était également utilisée en Europe. Cette activité pourrait être un résultat indirect d'une congestion dans la région pelvienne (Lewin, 1962, Banerjee et Dandiya, 1967).

Les premiers manuels prétendaient que la coloquinte est excrétée dans le lait maternel, et ne devraient donc pas être administré aux femmes qui allaitent (Desmet *et al.*, 1997).

#### **I.5.1.4. Données générales animales**

Plusieurs travaux ont rapporté que la coloquinte provoquent des effets toxiques chez les chèvres (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962; Barri *et al.*, 1983), les moutons (Kingsbury, 1964; Elawad *et al.*, 1984), les veaux (Bartick et Piskac, 1980), les poussins (Bakhiet et Adam, 1995) et les rats (Deghani et Parjehshahin, 2006).

Le traitement des moutons avec des doses orales quotidiennes de 1-10 g/kg de fruits frais de coloquinte a entraîné leur mort après 5 heures à 25 jours. Cependant, les moutons ayant consommés une nourriture renfermant des quantités quotidiennes de 0,25 à 10 g/kg de feuilles fraîches de coloquinte ont succombé au bout de 4 heures à 15 jours. Les principaux signes d'empoisonnement étaient la diarrhée, une dyspnée, l'anorexie, et une faiblesse générale. Les examens anatomopathologiques ont révélé des zones d'hémorragies et de congestion au niveau des : reins, poumons, cœur, foie et vésicule biliaire ainsi qu'une entérite (Elawad *et al.*, 1984). La consommation des doses élevées de CCT pendant une journée à 2 semaines a entraîné la mort des chèvres (Barri *et al.*, 1983). Le foie des moutons ayant le fruit de CCT pendant 42 jours semble aussi présenter une légère congestion accompagnée de changement du taux lipidique, avec la présence de vacuoles lipidiques cytoplasmiques dans les hépatocytes centro-lobulaires, une dégénérescence ou une nécrose des cellules rénales tubulaires avec accumulation des lymphocytes dans le cortex rénal, la lamina propria intestinal et le tractus portal du foie (Adam *et al.*, 2001a).

De même, d'après le travail d'Adam *et al.* (2001), sur des rats males Wistar ayant consommés une alimentation renfermant le broyat du fruit de CCT pendant 6 semaines, ont montré une perte de poids avec une diminution de la prise d'aliment, une diarrhée, des poils troublés, et une entérohépatonephrotoxicité (Adam *et al.*, 2001).

Chez des souris BALB/C, la dose létale médiane (DL<sub>50</sub>) des saponines extraits à partir de l'écorce des fruits de colocynth administré par voie orale était aux environ de 200 mg/kg. Des changements histologiques sous forme d'hémorragies et des érosions de la muqueuse ont été observés au niveau de l'intestin grêle des rats traités. Les coupes histologiques du foie de ces animaux ont montré de petites hémorragies au niveau de plusieurs lobules et une

---

---

congestion des veines centrales et des sinusoides accompagnés d'une inflammation non spécifique avec des nécroses hépatocellulaires. Une infiltration de neutrophiles et de lymphocytes pénétrant le parenchyme a été observée sans aucune lésion au niveau du tractus biliaire. Les coupes histologiques du rein de souris traitées par les saponines ont montré une destruction focale des tubules rénaux avec une exsudation et hémorragie touchant les glomérules. L'administration par voie orale de la saponine extraite de la coloquinte chez les rats provoque l'érosion aigue des pièces superficielles et de quelques villosités intestinales. L'absorption principale de la saponine par l'intestin grêle réduit probablement la possibilité de n'importe quel endommagement de l'estomac et du gros intestin. Des traces de saponine ont été trouvés au niveau de la sous muqueuse de l'estomac et du gros intestin (Diwan *et al.*, 2000).

L'administration intrapéritoniale de l'extrait alcoolique des graines de CCT à des rats males pendant 14 jours a entraîné des changements anatomopathologiques au niveau de leurs foies. Les coupes réalisées sur le foie ont montré de petites hémorragies au niveau de plusieurs lobules et une congestion des veines centrales et des sinusoides accompagnés d'une inflammation non spécifique avec des nécroses hépatocellulaires. Des changements morphologiques ont été remarqués sur les hépatocytes incluant: une caryorrhexie, une chromatolyse et une granulation au niveau du cytoplasme. En utilisant la coloration à la réticuline, du collagène et des fibres réticulées ont été observés au niveau du parenchyme (Deghani et Panjehshahin, 2006).

Des résultats semblables ont été décrits par Wasfi (1994) chez des rats traités avec l'extrait éthanolique des feuilles et des graines de la plante. Cet auteur et après réalisation des coupes histopathologiques sur les foies de rats traités de l'extrait éthanolique des feuilles de CCT a remarqué que la majeure partie des veines centrales et des sinusoides hépatiques étaient dilatées et remplis de sang tandis que les cellules paraissaient atrophiques. Les coupes de reins présentaient des hémorragies sévères particulièrement au niveau des portions médullaires. Les extraits éthanoliques des feuilles et de la pulpe de la coloquinte testés sur des cœurs isolés de lapin ont provoqué une augmentation immédiate de la tension artérielle avec réduction de la fréquence et de la force des contractions cardiaques (Wasfi, 1994).

Sawaya *et al.* (1983; 1986) ont effectué leurs essais en utilisant une alimentation mélangée avec des préparations à base des graines de la coloquinte sur des poussins depuis le 1<sup>er</sup> jour jusqu'au 21<sup>ème</sup> jours de leur vie. Une alimentation enrichie avec 15% de la poudre de graines de coloquinte a diminué de façon significative le poids corporel tandis que la

---

---

consommation d'une alimentation renfermant de l'huile de graines ou bien des graines entières n'a pas influencée la croissance.

Pour évaluer les effets anti-fertilité, un extrait brut de racines de *C. colocynthis* est administré par voie orale à des rats males pendant une période de 60 jours.

Des diminutions significatives de la motilité du sperme (au niveau de l'épididyme), de la densité et de la fertilité ont été observées chez tous les groupes traités. Une réduction remarquable du poids des testicules, de l'épididyme et des vésicules séminales est aussi constatée alors que le poids de prostate est resté normal.

L'observation histologique des testicules a révélé une dégénérescence de l'épithélium séminifère, un arrêt de la spermatogenèse à l'étape du spermatide, la présence d'éosinophiles et une diminution du diamètre des cellules de Leydig. Les concentrations du cholestérol testiculaire, du fructose et des protéines des vésicules séminales ont été entièrement dissipées. Une diminution notable du taux de testostérone corrobore les résultats déjà cités (Mali *et al.*, 2001).

#### **I.5.1.5. Traitement**

Dans le cas d'intoxication par le colocynth, le traitement est symptomatique, l'estomac doit être évacué, la morphine peut être administrée oralement suivie de boissons émoullientes. La décontamination de l'intestin est habituellement inutile en raison de la diarrhée et des vomissements associés à la toxicité par la coloquinte. Les patients doivent être examinés pour déceler tout déséquilibre en fluide et électrolytes et toutes carences devraient être corrigées avec des infusions de fluides et/ou d'électrolytes.

Dans les cas d'hommes intoxiqués rapportés par Khan *et al.* (2003), des injections d'antispasmodiques à base de butylbromure d'hyoscine ont été utilisées et se sont révélées efficaces dans le soulagement des spasmes des muscles lisses à l'origine des crampes, des douleurs abdominales et dans la réduction des fréquences de la diarrhée.

Des injections intraveineuses de solution saline normale accompagnées de pantoprazole ont été préconisées pour les femmes intoxiquées rapportés par Javadzadeh *et al.* (2013).

***CHAPITRE II :***  
***Matériel et méthodes***

## II.1. Matériel végétal

Les fruits sont utilisés comme support pour les essais biologiques puisqu'ils représentent la partie la plus utilisée en phytothérapie.

Les fruits de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sont récoltés après maturation au mois d'Aout/ septembre dans la région de Maârif (commune de Boussaâda) à 40 Km du chef lieu, wilaya de M'sila, sud est de l'Algérie. Ils ont été identifiés par le Pr. H. Laouer, Département de biologie et d'Ecologie végétale, université Ferhat Abbas, Sétif-1, Algérie et sur la base des caractéristiques morphologiques, en se servant des documents suivants : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales de Quezel et Santa (1962 ; 1963); la flore de la Tunisie (Pottier Alepetite, 1981).

Les fruits sont débarrassés de toutes les impuretés, séchées au laboratoire à une température ambiante située entre 25°C et 27°C et à l'abri du soleil et de la lumière pendant une durée suffisante. Les fruits secs, après avoir été débarrassés des graines, sont broyés en poudre à l'aide d'un broyeur électrique.

### II.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Une quantité de 80g du broyat de la pulpe des fruits de la plante est placée dans une cartouche en cellulose qui est insérée dans un extracteur de soxhlet surmonté d'un réfrigérant pour refroidissement. L'extracteur est placé sur un ballon contenant un volume suffisant de méthanol (600 ml) qui est chauffé à l'aide d'un chauffe-ballon pré-réglé à une température de 50°C. Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent sur le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le broyat dans le solvant chauffé. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagnées de substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. L'extraction est réalisée ainsi en continu jusqu'à épuisement totale du broyat (jusqu'à clarification du solvant d'extraction dans le siphon du soxhlet: 18 heures, une dizaine de cycles).

A l'issue de cette opération, l'extrait brut obtenu est filtré, concentré sous vide puis conservé à basse température jusqu'aux jours d'utilisation. Le rendement d'extraction est estimé en pesant le ballon de récupération vide et après évaporation.

### II.1.2. Fractionnement de l'extrait méthanolique

L'extrait brut évaporé est solubilisé dans un faible volume d'eau distillée bouillante puis fractionné selon la méthode de Markham (1982), en utilisant une série de solvants à polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol) (**Fig. 7**). Le fractionnement de l'extrait brut est réalisé suivant une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter, les deux liquides séparent les solutés en fonction de leur solubilité dans chaque solvant. L'extrait brut est initialement mélangé avec l'hexane (1V/V), après décantation la phase organique supérieure est récupérée. Cette étape est répétée plusieurs fois avec renouvellement du solvant jusqu'à ce qu'il devient transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (EHx). La phase aqueuse inférieure est soumise à un autre fractionnement par le chloroforme pour donner l'extrait chloroformique (ECh), par l'acétate d'éthyle pour donner la fraction de l'acétate d'éthyle (EAc), et enfin par le n-butanol pour donner la fraction butanolique en suivant les mêmes étapes que le premier fractionnement par l'hexane. Le raffinat qui en résulte représente la fraction aqueuse (EAq) résiduelle qui est également soumise à une évaporation et conservé avec les autres extraits à basse température jusqu'à utilisation. Le rendement des différentes fractions est calculé.

### II.1.3. Screening phytochimique de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique des fruits du CCT est analysé avant et après fractionnement pour la présence des tannins, flavonoïdes, coumarines, caroténoïdes, alcaloïdes, terpénoïdes stéroïdes, saponines, glycosides cardiotoniques et composés réducteurs.

La recherche de ces composés organiques est réalisée par des tests chimiques et par des examens chromatographiques par CCM sur gel de silice 60 F254 après révélation par des réactifs spécifiques des composés recherchés et examens des résultats avant révélation à la lumière visible et sous UV. Les techniques utilisées s'inspirent de celles décrites par (Harborne, 1973; Trease et Evans, 1987). Les résultats sont classés en :

- Réaction franchement positive : + + + ;
- Réaction positive : + + ;
- Réaction faiblement positive : + ;
- Réaction douteuse : +/- ;
- Réaction négative : -.

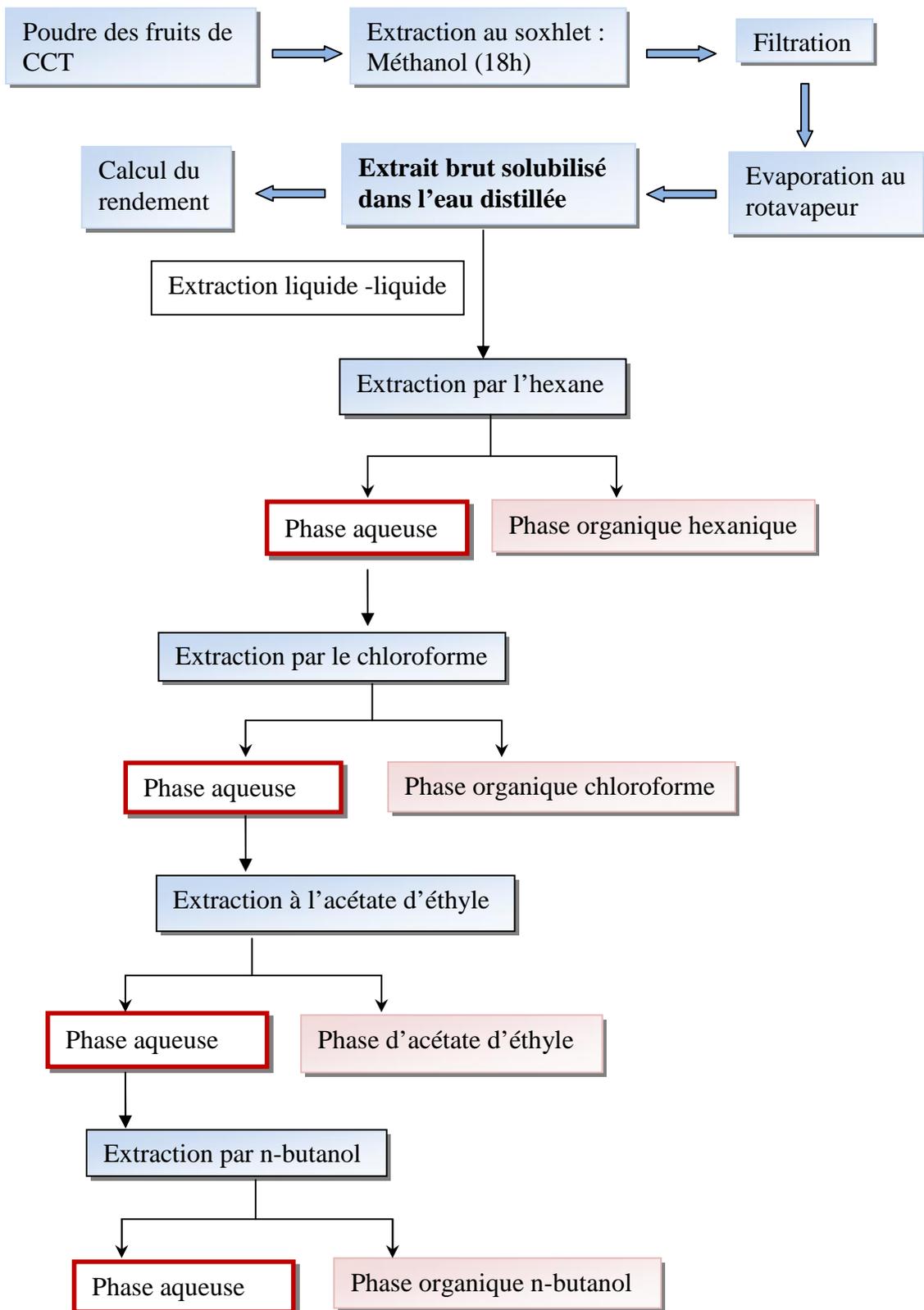


Fig. 7. Les étapes de la préparation et du fractionnement de l'extrait méthanolique des fruits de CCT.

### II.1.3.1. Screening phytochimique par des réactions colorées

#### Mise en évidence des alcaloïdes

Un millilitre d'extrait est traité avec quelques gouttes (1.5ml) d'HCl dilué (1%) et quelques gouttes (6gouttes) de réactifs de Mayer/Wagner ou Dragendorff. L'obtention d'un précipité blanc ou blanc-jaune, brun rougeâtre, ou rouge orangé respectivement témoigne la présence des alcaloïdes (Oguyemi, 1979).

#### Mise en évidence des Tannins

Cinq millilitres d'extrait sont mélangés avec 1ml (3 à 4 gouttes) de FeCl<sub>3</sub> (2%). En présence de tannins, il se développe une coloration bleue noire (tanins galliques et ellagiques), une coloration est bleue verdâtre (tanins cathéchique) (Trease et Evans, 1987).

##### *Réactif de Stiasny*

10 ml de formol à 30% et 5ml de HCl sont ajoutés à 5 ml de la solution à tester. Le mélange est chauffé au bain marie pendant 15 minutes. L'obtention d'un précipité montre la présence des tannins catéchiques.

Pour la détection des tannins galliques, le filtrat de la solution précédente est traité avec 5 ml d'acétate de sodium et trois gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 2 %. L'apparition d'une coloration bleu-noir intense, signe la présence des tannins galliques.

##### *Réactif de Bath Smith*

A 1 ml de l'extrait est ajouté 1 ml d'HCl à 20%. Le mélange est porté à ébullition. En présence des tannins catéchiques, un précipité de couleur rouge brique est formé (Chenni, 2010).

#### Mise en évidence des flavonoïdes

- Deux millilitres d'extrait sont traités avec quelques gouttes d'HCl concentré et quelques copeaux de Mg<sup>++</sup>. Après 3 min, l'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes (Jinga *et al.*, 2007; Rasool *et al.*, 2010).

- *Test à l'acétate de plomb* : l'extrait est traité avec quelques gouttes de la solution d'acétate de plomb à 10%. La formation d'un précipité jaune indique la présence des flavonoïdes (Uma et Sekar, 2014).

#### Mise en évidence des anthocyanes

A deux millilitre d'extrait sont ajoutés 2 ml HCl (10%) avec quelques gouttes d'ammoniac (10%). Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, conclure à la présence d'anthocyanes (Rasool *et al.*, 2010).

**Mise en évidence des coumarines**

Un millilitre d'extrait est additionné à 0.5ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25%. La fluorescence est observée sous UV à 366nm. L'extrait est dilué et additionné de quelques gouttes de NaOH concentré, puis examiné sous UV à 365nm, une fluorescence bleue oriente vers la présence de coumarines (Bouزيد., 2009).

**Mise en évidence des quinones (réaction de Borntrager)**

Cinq millilitres d'extrait sont mélangés avec 2.5ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% ou de KOH 10%. Après agitation, l'apparition d'une coloration qui vire au jaune, rouge ou violet confirme la présence des quinones (Ribérreau, 1968; Uma et Sekar, 2014).

**Mise en évidence terpénoïdes (Réaction de Lieberman Burchard)**

Deux millilitres d'extrait sont mélangés avec 5ml d'anhydride acétique et 5ml de chloroforme puis 1ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré sur les parois du bécher sans agiter. Après un repos de 20min, s'il ya formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration verte ou violette de la couche surnageant indique un résultat positif (Harborne, 1973).

**Mise en évidence stéroïdes (Test de Salkowski)**

Un volume de 2.5ml d'extrait est traité avec 0.4ml de chloroforme et 0.6ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. Un anneau marron-rouge est formé à l'interface en cas de présence de ces substances.

**Mise en évidence saponines (test de mousse)**

Deux millilitres d'extrait sont mélangés avec 2ml d'eau. Le mélange est agité pendant 15 secondes. Après un repos de 15min, la hauteur de la mousse formée est mesurée. Une hauteur de 1cm indique la présence des saponines. La mousse est mélangée avec quelques gouttes d'huile d'olive. La formation d'émulsion indique la présence de saponines (Sofowara, 1993).

**Mise en évidence des caroténoïdes**

1 g de l'échantillon est extrait avec 10 ml de chloroforme avec une agitation vigoureuse. Le mélange obtenu est filtré et le  $\text{H}_2\text{SO}_4$  85% est additionné. Une couleur bleue à l'interface indique la présence de ces substances (Uma et Sekar, 2014).

**Mise en évidence des glycosides cardiotoniques (Test de Keller Killiani)**

Deux millilitres d'extrait sont traités avec 1 ml d'acide acétique glacial contenant une à deux gouttes de  $\text{FeCl}_3$  (1%). Un millilitre de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré est ajouté à la surface. Un

anneau brun est obtenu à la surface indiquant la présence de deoxysucre caractéristiques des cardénolides (Trease et Evans, 1987).

### Mise en évidence des composés réducteurs

Un millilitre de liqueur de Fehling est mélangé avec 1ml d'extrait. Le mélange est incubé pendant 8min dans un bain marie bouillant. La formation d'un précipité rouge brique indique un résultat positif (Trease et Evans, 1987).

#### II.1.3.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice).

Pour analyser et identifier les composés majeurs présents dans les différentes fractions de l'extrait, un criblage phytochimique a été réalisé sur des chromatoplaques (60 F254, support- aluminium, 20×20, Fluka-Silica gel/DC) suivant les méthodes décrites dans la littérature (Wagner et Bladt, 1984).

Après dissolution de l'extrait (10mg/ml) dans du méthanol, 10 µl de chaque solution sont déposés à l'aide d'une micropipette sur la plaque à 1 cm du bord inférieur sur la ligne de base. La plaque est ensuite introduite dans la chambre de migration contenant la phase mobile préalablement saturée par ses vapeurs.

Différents systèmes de solvants ont été utilisés en qualité de développants: n-Hexane/Acétate d'éthyle, 20:4 (v/v) pour la fraction hexanique; Chloroforme/ Acétate d'éthyle /n-Hexane, 10:10:5 (v/v/v) pour la fraction chloroformique; Chloroforme/ Acétate d'éthyle/Acide acétique, 12:10:1 (v/v/v) et Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau/ Chloroforme, 18:2,4:2,1:6 (v/v/v/v) pour la fraction éthylacétatique et Acétate d'éthyle/ Ethanol/Acide formique/Eau, 10:1,1:0,7:2,5 (v/v/v/v) pour la fraction n-butanolique, Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau (7 : 2.7 : 0.3) pour la phase aqueuse (N'guessan *et al.*, 2011).

Après développement, quand le front du solvant arrive à 4 cm du bord supérieur de la plaque, les plaques sont séchées sous hotte. La révélation peut être physique des plaques sous lampe UV à 254nm et à 365nm et les bandes de migration sont repérées et délimitées.

La révélation chimique est réalisée par pulvérisation séparée de plusieurs systèmes de révélation. Selon le type de métabolites secondaires à identifier, plusieurs réactifs spécifiques ont été utilisés: le réactif de Liebermann-Bürchard, vanilline-acide phosphorique pour les stérols et terpènes, le réactif polyvalent de Godin pour les stérols, terpènes et flavonoïdes; Acétate de plomb basique à 5% (v/v) pour les coumarines; AlCl<sub>3</sub> à 5% pour les flavonoïdes;

le réactif de Dragendorff pour les alcaloïdes; le  $\text{FeCl}_3$  à 10% (v/v) pour les composés phénoliques et  $\text{FeCl}_3$  à 10% (v/v) ou de la vanilline/HCl pour les tanins, la Vanilline- $\text{H}_2\text{SO}_4$  pour les saponines (stéroïdiques et triterpéniques);  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50% dans l'éthanol pour les glycosides cardiotoniques (N'guessan *et al.*, 2011).

## II.2. Matériel animal

Les rats blancs de la souche Wistar utilisés dans les différentes expériences ainsi que les souris proviennent de l'institut Pasteur d'Alger. Ces animaux sont logés dans des cages en plastique transparent d'une longueur de 55 cm, d'une largeur de 33 cm et d'une hauteur de 19 cm. Ils ont disposé d'eau du robinet et de nourriture standard (croquettes, Ets ONAB El Kseur, Béjaia) *ad libitum*, la litière est renouvelée chaque 3 jour. Ils ont été stabulés aux conditions de l'animalerie de la Faculté des sciences de la nature et de la vie – Université de Sétif pendant deux semaines avant l'expérimentation.

### II.2.1. Détermination de la $\text{DL}_{50}$ chez les rats et les souris

Pour la détermination de la dose médiane létale ( $\text{DL}_{50}$ ), cent rats du genre *Albinos-Wistar* 50 males :  $186.25 \pm 2.80\text{g}$  et 50 femelles :  $176.41 \pm 2.72\text{g}$ ) et une centaine de souris *Mus musculus* (50 males :  $24.24 \pm 0.4\text{g}$  et 50 femelles :  $21.067 \pm 0.33\text{g}$ ) ont été employées pour l'étude.

Après une période d'acclimatisation, les animaux sont pesés et répartis en 5 groupes comprenant chacun 10 animaux. Après une période de jeûn de 24 heures, chaque groupe reçoit par gavage « per os » une dose unique de l'extrait méthanolique du fruit de *Citrullus colocynthis* : extrait préparé dans l'eau distillée en présence de 2% d'éthanol 95° (Loiseleur, 1963). Le groupe témoin reçoit le véhicule (eau distillée en présence de 2% d'éthanol 95°).

Les cinq groupes de rats males ont reçu respectivement les doses : 500mg/kg, 1000 mg/kg, 1800mg/kg, 2000mg/kg et 3000 mg/kg. Les cinq lots des rats femelles ont reçu les doses : 1000mg/kg, 1400 mg/kg, 2500mg/kg, 3000 mg/kg et 4000mg/kg respectivement. Les doses administrées aux groupes des souris males sont respectivement 25, 50, 100, 250 et 1000mg/kg. Les lots des souris femelles sont traités avec les doses respectives 50, 100, 250, 500 et 1000mg/kg.

Après l'administration de l'extrait, les animaux sont observés individuellement chaque heure pendant le premier jour et chaque jour pendant 14 jours. Les symptômes de toxicité apparents (contraction abdominale, activité, respiration, diarrhée, coma) et le taux de mortalité sont enregistrés pour chaque lot traité pendant toute la durée de l'expérience. La  $\text{DL}_{50}$  et son

intervalle de confiance sont calculés par la méthode graphique de Litchfield et Wilcoxon (1949), la méthode arithmétique de Behrens et Karber (1935) et par l'équation de Dragstedt et Lang (1957).

### II.2.2. Toxicité aiguë non létale chez les rats males

Pour cette étape, soixante dix rats males du genre *Albinos-Wistar* ayant un poids corporel moyen de  $(227.23 \pm 5.02\text{g})$  ont été sélectionnés et marqués. Les animaux ont été répartis en sept lots de 10 rats chacun.

- ✓ Les animaux sont privés de la nourriture 24 h avant l'essai.
- ✓ Ils sont pesés au moment de l'application.
- ✓ L'extrait est solubilisé dans l'éthanol 95° (2%) ensuite dilué dans l'eau physiologique. Les sept groupes recevaient *per os* (par gavage) une dose unique représentant le 1/3 de la DL<sub>50</sub> soit 440 mg/kg.
- ✓ Les animaux sont observés pendant toute la période du traitement pour noter le comportement et la carte clinique. Ils sont pesés de nouveau puis sacrifiés comme suit :
  - **Premier groupe** est sacrifié après 24 heures.
  - **Deuxième groupe** est sacrifié après 3 jours de son traitement.
  - **Troisième groupe** est sacrifié après 5 jours de son traitement.
  - **Quatrième groupe** est sacrifié après 7 jours du traitement.
  - **Cinquième groupe** est sacrifié après 10 jours du traitement.
  - **Sixième groupe** est sacrifié après 14 jours du traitement.
  - **Le groupe témoin (Septième groupe)** a reçu le véhicule dans lequel l'extrait a été préparé (l'eau distillée en présence de l'éthanol 95°).
- ✓ Le sang est prélevé par à partir du plexus retro-orbital pour les études hématologiques et biochimiques. Le sang total obtenu est centrifugé à 3000 tours par minutes pendant 10 minutes. Le sérum est recueilli dans des tubes Eppendorff, et conservé à -20 C° en vue d'analyses des paramètres sériques.
- ✓ Après la collection du sang, les animaux sont sacrifiés par dislocation cérébrale. Après l'autopsie, tous les organes ont été examinés macroscopiquement *in situ* (foie, cerveau, cœur, reins, rate, testicules et poumons) puis ils sont prélevés, lavés et pesés. La masse relative des organes est calculée puis comparée aux masses relatives des organes des animaux témoins.
- ✓ Des pièces des reins et des foies sont conservées dans une solution de formol à 10% pour les études anatomopathologiques.

### II.2.3. Toxicité sub-aigue chez les rats males

La toxicité subaigue a été évaluée sur un lot constitué de quarante rats males du genre *Albino-Wistar* ayant un poids corporel moyen de  $(172,2 \pm 4,39 \text{ g})$ . Les animaux ont été répartis en trois lots. Les groupes traités (n=15) recevaient journalièrement une dose unique ( $1/5 \text{ DL}_{50} = 265 \text{ mg/Kg}$ ) de l'extrait méthanolique toujours par voie orale. Leur sacrifice est programmé comme suit :

- **Premier groupe** est sacrifié après six semaines de traitement.
- **Deuxième groupe** est sacrifié après six semaines de traitement et une semaine de récupération.
- **Le groupe témoin** (n=10) a reçu le véhicule qui a servi à la préparation de l'extrait.
- ✓ Les animaux sont observés journalièrement et l'évolution du poids corporel ainsi que la consommation de l'aliment sont enregistrés périodiquement tout au long de l'expérimentation.
- ✓ A la fin du traitement, les animaux sont observés puis sacrifiés. Le sang est prélevé par à partir du plexus retro-orbital pour les études hématologiques et biochimiques. Les organes sont observés macroscopiquement *in situ* (rein, rate, foie, testicules, poumons, coeur et cerveau), prélevés, débarrassés de l'excès de graisse, séchés avec du papier filtre et pesés. Des pièces de reins et des foies sont conservés dans le formol à 10% pour les études anatomopathologiques.

### II.2.4. Toxicité chronique chez les rats males

Les animaux (un lot de 30 rats, poids corporel moyen  $212,207 \pm 6,302 \text{ g}$ ) de cette étude ont été journalièrement traités avec l'extrait méthanolique par voie orale ( $131 \text{ mg/kg} = 1/10 \text{ DL}_{50}$ ) pendant 90 jours. Les rats mâles sont répartis en deux lots, un lot témoin de 10 rats et un lot traité de 20 rats.

- ✓ Les animaux sont observés quotidiennement et le poids corporel des animaux ainsi que la consommation des aliments sont enregistrés chaque semaine.
- ✓ A la fin du traitement, les animaux sont observés puis sacrifiés. Le sang est prélevé à partir du plexus retro-orbital pour les études hématologiques et biochimiques. Les organes sont observés macroscopiquement *in situ* (rein, rate, foie, testicules, poumons, coeur et cerveau), prélevés, débarrassés de l'excès de graisse, séchés avec du papier filtre et pesés. Des pièces de reins et des foies sont conservés dans le formol à 10% pour les études anatomopathologiques.

---

---

### II.2.5. Etude de quelques paramètres hématologiques et biochimiques sériques

A la fin du traitement, les animaux sont anesthésiés avec l'uréthane. Deux échantillons de sang sont récupérés à partir du plexus retro-orbital pour les études hématologiques et biochimiques.

Un échantillon est récupéré dans des tubes contenant l'éthylène diamine acide tétra-acétique pour l'étude des paramètres hématologiques (FNS) : Erythrocytes (GR), leucocytes (GB), concentration d'hémoglobine (HGB), volume globulaire moyen (VGM), Taux corpusculaire moyen en hémoglobine (TCMH), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), taux d'hémoglobine (HCT), volume plaquettaire moyen (VPM) et l'hématocrite plaquettaire (PCT) avec un automate (Beckman Coulter MEDONIC – USA). Le deuxième échantillon est utilisé pour mesurer les activités sériques de la Glutamate –oxaloacétate transaminase (AST ou GOT), Glutamate - Pyruvate Transaminase (ALT ou GPT) (en utilisant des kits commerciaux Kits –SGM Rome-Italy), la phosphatase alcaline (PAL) (en utilisant des kits commerciaux – CYPRESS DIAGNOSTIC Langdrop – Belgium), les concentrations des protéines totales, l'urée, le taux de glucose, la créatinine, sodium, potassium, calcium et le phosphore avec un automate (Beckman coulter Synchro CX-9 clinical system ALX –USA). Les dosages hématologiques et biochimiques sont effectués au laboratoire central du CHU de Sétif.

### II.2.6. Technique histologique

Les reins et les foies sont fixés dans du formol 10 %, sont coupés en pièces de 5 à 10 cm, déposés dans des cassettes en plastique, puis sont déshydratés (par immersion dans des bains successifs d'alcools et d'acétone, ces derniers sont éliminés par des solvants (xylol), avant d'être coulé dans des moules contenant de la paraffine fondue par chauffage à 60°C (paraffine liquide).

Après refroidissement, le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé à l'aide d'un microtome permettant de réaliser des coupes de 5 µm d'épaisseur. Les coupes obtenues sont étalées et collées sur des lames, puis séchées dans une étuve pendant une nuit. Elles sont ensuite colorées par une solution d'hématoxyline-éosine. Après coloration le montage se fait à l'aide de l'Eukitt; l'échantillon est placé entre lame et lamelle. La préparation est séchée à l'air.

Ces coupes histologiques sont réalisées au laboratoire d'anatomopathologie de CHU de Sétif.

## II.2.7. Effet de l'extrait des fruits du *Citrullus colocynthis* sur la perméabilité vasculaire au bleu Evans

### Principe

Cette méthode est basée sur l'injection intraveineuse du Bleu Evans chez le rat. Le bleu Evans est un colorant qui se combine à l'albumine. Sous les conditions physiologiques, l'endothélium est imperméable à l'albumine, et donc au bleu Evans associé à l'albumine. Dans les conditions pathologiques qui favorisent l'augmentation de perméabilité vasculaire, les cellules endothéliales perdent partiellement ses contacts étroits et l'endothélium devient perméable aux petites protéines telles que l'albumine. Cette condition permet l'extravasation du Bleu Evans dans les tissus.

Le taux de modification dans la perméabilité vasculaire peut être estimé par mesure quantitative du colorant incorporé par milligramme de tissu des animaux témoins versus les tissus de l'animal traité. Le Bleu Evans peut être extrait de tissus par l'incubation d'une quantité spécifique de tissu en présence de formamide. L'absorbance maximale du Bleu Evans est située à 620 nm. En utilisant une courbe d'étalonnage de bleu Evans, les mesures de la densité optiques peuvent être converties en milligramme de colorant capturé par milligramme de tissu (Radu et Chernoff, 2013).

### Méthodologie

La perméabilité de la microcirculation du foie et des reins est étudiée chez des rats soumis à une administration de l'extrait méthanolique à raison de 265 mg/kg pendant une semaine. Au 8<sup>ème</sup> jours, les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritoniale d'uréthane. Le bleu Evans 1% (w/w) est injecté au niveau de la veine dorsale du pénis à raison de 20 mg/kg (Lordal *et al.*, 1996). Après 30min, une laparotomie ventro-médiane est pratiquée et le foie et les reins sont excisés, lavés, pesés puis conservés en vue du dosage du bleu Evans.

### Dosage du bleu Evans

Le foie et les reins sont digérés dans 3ml de KOH 3.5N à 37C° pendant une nuit. Ensuite, 18ml d'un mélange d'acide phosphorique 4N et d'acétone (1.75/16.25 ; V/V) sont ajoutés au digestat. Les tubes sont vigoureusement agités pendant quelques secondes puis centrifugés à 700g pendant 15min. l'absorbance du surnageant est mesurée à 620nm (spectrophotomètre-Shimadzu UV-1601, Germany).

La concentration du bleu Evans de l'échantillon est déduite à partir de la droite d'étalonnage établie en utilisant des concentrations du colorant de 2 à 30µg/ml (Annexe 2).

---

---

La perméabilité vasculaire est exprimée comme étant la quantité de colorant qui est passée par extravasation et qui s'est accumulée au niveau du tissu pendant les 30min. La quantité de bleu Evans dans le tissu est exprimée en  $\mu\text{g/g}$  de tissu frais.

### **II.2.8. Mesure du taux de peroxydation lipidique au niveau du sang et d'homogénats de foie et de reins de rats males**

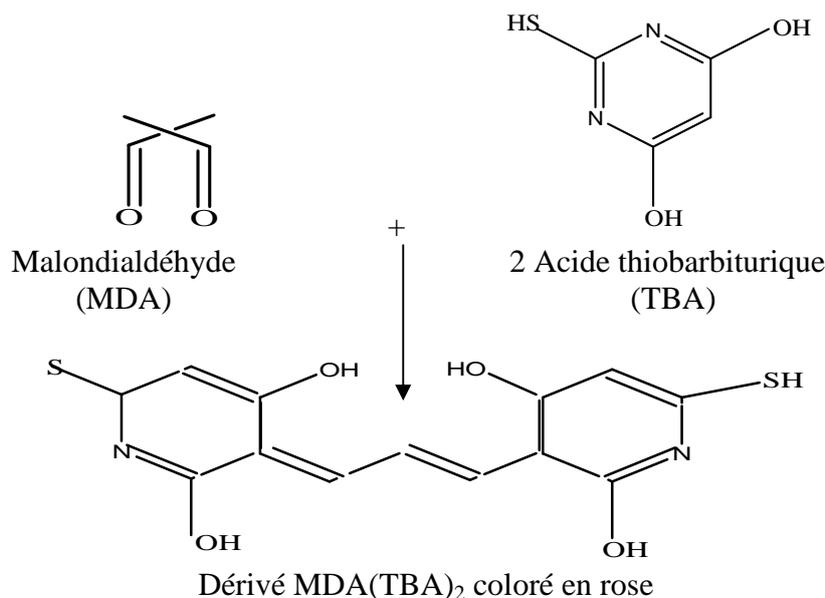
Des rats males Albino Wistar, adultes de poids entre 180 et 210g, sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en trois lots expérimentaux de 6 à 10 animaux chacun. Ils ont été gavés quotidiennement durant une semaine par l'extrait méthanolique 265 mg/kg. Les rats du groupe témoin ont reçu le même volume d'une solution saline normale.

#### **Prélèvement sanguin et préparation des homogénats de foie et de reins**

Après collection du sang, les animaux sont sacrifiés par dislocation cérébrale. Après dissection, le foie et les reins sont rapidement récupérés, lavés au NaCl 0.9%, séchés au papier filtre puis pesés. Ensuite, des homogénats tissulaires de 10% (P/V) de foies et de reins sont préparés dans le PBS (10mM, pH 7.4) froid en utilisant l'ultraturrax (Mansour *et al.*, 2003). L'hémolysat est préparé en incubant 0.5ml de globules rouges en présence de 5ml de tampon phosphate hypotonique (10mM, NaCl 50mM, pH 8) (Debnath *et al.*, 2013). Après centrifugation à 3000rpm pendant 15 minutes le surnageant est prélevé et conservé à basse température jusqu'à utilisation.

#### **Méthodologie**

Le taux de peroxydation lipidique dans le sang et au niveau de l'homogénat de foie et des reins est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA). Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100 °C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (lecture à 530 nm) (Yagi, 1976).



**Fig. 8.** Principe de dosage du malondialdéhyde

Pour le dosage du MDA, à 375µl de l'homogénat sont ajoutés 150µl de tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH7.4) et 375µl de solution TCA-BHT (TCA20%, BHT1%). Après homogénéisation, la solution est centrifugée à 1000tpm pendant 10min. Un volume de 400µl de surnageant est traité avec 80µl d'HCl 0.6M et 320µl de solution Tris-TBA (Tris 26mM, TBA 120mM). Après incubation au bain marie à 80C° pendant 10min, la densité optique de la solution est mesurée à 530nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formée, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

### Expression des résultats

La concentration de TBARS a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction molaire du MDA ( $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Les résultats sont exprimés en nmol/mg de protéines :

$$\text{MDA (nmol/ mg de protéine)} = \text{DO de l'échantillon} / \epsilon \times \text{mg de protéines}$$

### II.2.9. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont représentés sous forme de Moyenne  $\pm$  SEM. Ils sont analysés avec le logiciel Sigma Stat (version 3). La différence entre le témoin et les groupes traités est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples et par l'analyse de la variance à un critère de classification (One-way ANOVA) suivi du test de Dunnet/Tuckey pour les comparaisons multiples.

La détermination du taux d'hémolyse (50%) est effectuée avec le logiciel GraphPad Prism 5. Les valeurs de  $p < 0.05$  sont considérées statistiquement significatives.

***CHAPITRE III :***  
***Résultats expérimentaux***

### III.1. Extraction

L'extrait méthanolique brut des fruits de *Citrullus colocynthis* (CCT) obtenu présente un aspect pâteux de couleur brun verdâtre. Le rendement d'extraction était aux alentours de  $13.73 \pm 0.02\%$  (P/P). Le fractionnement de l'extrait (15,5 g) a permis de récupérer cinq fractions. Les extraits obtenus présentent généralement un aspect pâteux et parfois visqueux, de couleur verte ou marron.

Le rendement a été déterminé par rapport au poids de l'extrait méthanolique qui a servi au fractionnement, les résultats ont été exprimés en pourcentage. Les résultats obtenus montrent que les rendements en extraits sont variables et que les rendements les plus élevés correspondent à ceux de l'extrait butanolique et aqueux (**Tableau 5**).

La comparaison des rendements des différentes fractions par rapport à l'extrait brut, montre qu'une grande partie des constituants de l'extrait brut reste dans les fractions butanolique et aqueuse. Les fractions hexanique et chloroformiques n'ont pu entraîner que de faibles quantités de substances végétales (**Tableau 5**).

**Tableau 5:** Résultats du fractionnement de l'extrait méthanolique brut des fruits du *Citrullus colocynthis*.

Extrait/Fraction	Couleur	Aspect	Rdt %
Méthanolique	Brun foncé	Pâteux	13,73
Hexanique	Vert foncé	Visqueux	4,516
Chloroformique	Brun clair	Pâteux	5,806
Acétate d'éthyle	Marron	Pâteux	14,194
Butanolique	Marron clair	Pâteux	23,871
Aqueuse	Marron foncé	Pâteux	23,226

### III.2. Screening phytochimique de l'extrait méthanolique

#### III.2.1- Screening phytochimique par les réactions de précipitation en tubes

Les résultats des tests chimiques de détection des phytoconstituants de l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis* et ses différentes fractions sont reportés sur le **tableau 6** et au niveau des figures en annexe 2.

La plupart des tests répertoriés sur le tableau sont positifs; ce qui indique que les fruits de la plante renferment des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tannins, des quinones, des stéroïdes, des saponines et glycosides. Les composés les plus abondants dans les fruits de la plante collectée

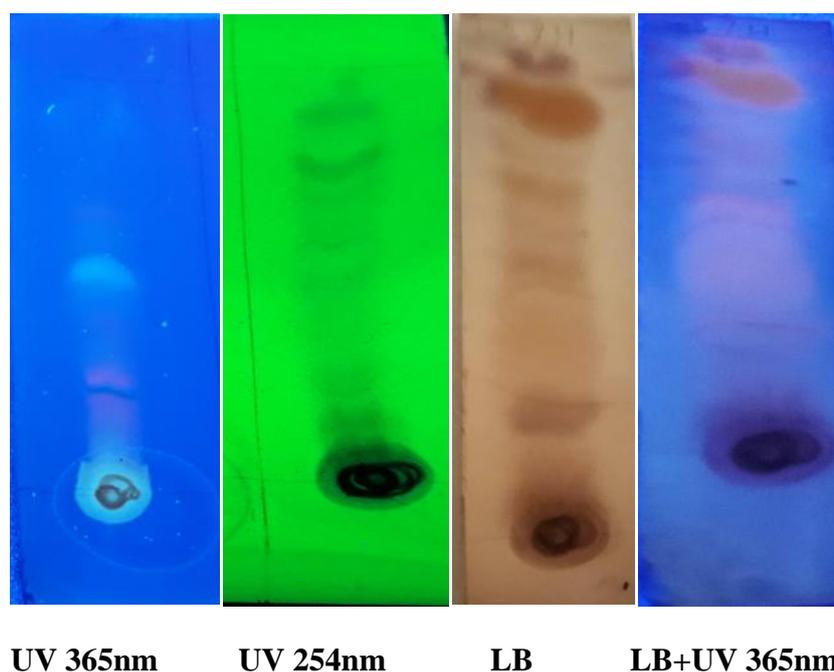
de la région de Maârif de M'sila sont surtout: les tanins, les terpènes et les glycosides cardiotoniques.

### III.2.2- Screening phytochimique par la chromatographie sur couche mince

Le criblage phytochimique effectué sur l'extrait et ses différentes fractions au moyen de la CCM, montre que toutes les fractions donnent après leur migration en présence des différents systèmes d'élution utilisés, des taches différentes après observation sous la lumière UV ou bien suite à leur traitement avec les différents types révélateurs. Les résultats sont regroupés au niveau du **tableau 7**.

#### Résultat de la CCM de la fraction hexanique

L'analyse de la fraction hexanique par CCM, en utilisant le système d'éluant (n-Hexane/acétate d'éthyle ; 20: 4 (v/v)), a permis d'obtenir plusieurs spots sous UV et après révélation par les différents types de révélateurs (**Tableau 7, Fig. 9 et 10**). Les résultats obtenus révèlent la richesse de cette fraction en composés terpéniques, stéroïdiques et en glycosides cardiotoniques.



**Fig. 9.** Chromatogramme de la fraction hexanique en utilisant le système d'éluant (n-Hexane/acétate d'éthyle; 20: 4 (v/v)) révélé sous UV et par le réactif de Liebermann-Burchard.

**Tableau 6:** Résultats des tests chimiques de détection des principes actifs de l'extrait méthanolique brut des fruits de *Citrullus colocynthis*.

Principes actifs	Techniques utilisées	Extrait méthanolique brut	Fraction hexanique	Fraction chloroformique	Fraction d'acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Fraction aqueuse
<b>Alcaloïdes</b>	Réactif de <i>Dragendorff</i>	+	+	+++	+++	+	+
	Réactif de <i>Wagner</i>	+	±	++	++	+	+
	Réactif de <i>Mayer</i>	+	-	-	-	-	-
<b>Tannins</b>	FeCl <sub>3</sub> (2%)	+++	+	+	+	+++	+
	Réactif de <i>Stiasny</i>	+++	++	++	++	+++	+++
	Réactif de <i>Bath Smith</i>	+	+	-	+	+	+
<b>Flavonoïdes</b>	HCl Concentré + Mg	±	-	+	+	+	±
	Acétate de plomb à 10%	-	+	+	-		
<b>Composés réducteurs</b>	Liqueur de <i>Fehling</i>	+	+	+	+	+	+
<b>Anthocyanes</b>	HCl (10%) avec quelques gouttes d'ammoniac (10%)	-	-	-	-		-
<b>Coumarines</b>	NH <sub>4</sub> OH à 25% + fluorescence sous UV à 366nm.	+	+	+	+	+	+
<b>Quinones (réaction de <i>Borntrager</i>)</b>	NH <sub>4</sub> OH 10%	+	+	±	±	+	+
<b>Terpénoides (Réaction de <i>Lieberman Burchard</i>)</b>	Anhydride acétique + chloroforme + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentré	+++	+	+++	+++	+++	+++
<b>Stéroïdes (Test de <i>Salkowski</i>)</b>	Chloroforme + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+	+	+	+	+	+
<b>Saponines (test de mousse)</b>	Formation de la mousse + d'huile d'olive	+	+	-	-	+	-
<b>Caroténoïdes</b>	Chloroforme + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 85%	-	-	-	-	-	
<b>Glycosides cardiotoniques (Test de <i>Keller Kiliani</i>)</b>	Acide acétique glacial + FeCl <sub>3</sub> (1%) + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentré	+++	+	++	+	+++	+++

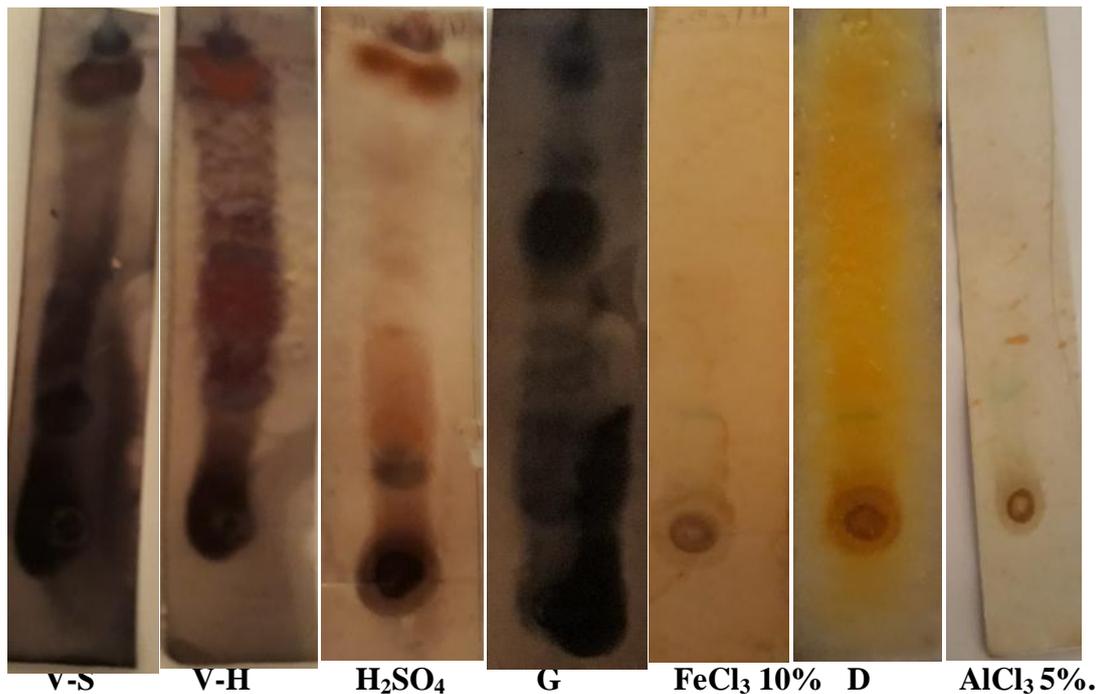
++ +: réaction franchement positive, ++ : réaction positive, + : réaction faiblement positive, +/- : réaction douteuse; - : réaction négative

**Tableau 7:** Résultats des CCM réalisées pour la détection des principes actifs de l'extrait méthanolique brut des fruits de *Citrullus colocynthis* et ses différentes fractions.

Fraction de l'extrait méthanolique	Système de révélation	Composés identifiés	Nombre de spots et couleur dans le visible	UV 365 nm	UV 254 nm
<b>Hexanique</b>	Liebermann-Bürchard	Stérols et Triterpènes	5 spots (Rf : 2 rose claires 0,5 et 0,65, orange 0,81, 2 bleu 0,21 et 0,93) <b><u>LB+ UV 365 nm</u></b> 4 zones de fluorescence (Rf : 2 rose claires 0,5 et 0,65, orange 0,81, bleu 0,93)	3 spots fluorescents (2 spots roses: 0,21-0,5 un spot bleu lumière)	4 spots d'extinction de fluorescence (Rf : 0,11- 0,21- 0,71- 0,87)
	Vanilline sulfurique	Terpènes, stéroïdes, caroténoïdes, cardénolides, flavonoïdes	Bleu violet (Rf : 0,94), Orange-rouge (Rf : 0,87), 2 sombres (Rf: 0,21 et 0,33)		
	Godin	Universel	4 spots sombres (Rf : 0,25- 0,31-0,62 et 0,91)		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50% dans l'éthanol	Glycosides cardiotoniques	Grise (Rf: 0,18) Rouge (Rf : 0,46-0,67) Marron (Rf: 0,92) Bleu (0,94)		
<b>Chloroformique</b>	Liebermann-Bürchard	Stérols et Triterpènes	-	Une fluorescence	2 zones d'extinction de fluorescence (Rf : 0,26- 0,52)
	Vanilline sulfurique	Terpènes, stéroïdes, caroténoïdes, cardénolides, flavonoïdes	Sombres (Rf : 0,7- 0,95)		
	Godin	Universel	Sombres (Rf: 0,64- 0,72- 0,78- 0,88)		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50% dans l'éthanol	Glycosides cardiotoniques	sombres (0,61- 0,88)		
	FeCl <sub>3</sub> à 10 % Vanilline- HCl	Phénols, Flavonoïdes, Tannins	Gris (0,93) sombres (0,65- 0,76- 0,9)		
	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Pb 5%	Coumarines	-		

	Dragendorff	Alcaloïdes	Orange (au lieu de dépôt) 2 zones orange très claires (0,25-0,87)		
	AlCl <sub>3</sub> à 5%	Flavonoïdes	-		
<b>Ethyl acétatique</b>	Liebermann-Bürchard	Stérols et Triterpènes	Spot sombre (0,94)	Système 2 : 2 spots bleu (Rf : 0,18- 0,37)	Système 1: 1 Gand spot noir (Rf : 0,87) Système 2: 5 spots (Rf: 0,23- 0,58- 0,65- 0,77- 0,85)
	Vanilline sulfurique	Terpènes, stéroïdes, caroténoïdes, cardénolides, flavonoïdes	2 spots sombres (Noir :0,7- 0,95)		
	Vanilline- HCl	Phénols, Flavonoïdes, Tannins	Spots sombres (0,65- 0,81- 0,9- 0,95)		
	Godin	Universel	Spots sombres (0,64- 0,72- 0,78- 0,88)		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50% dans l'éthanol	Glycosides cardiotoniques	Spots sombres (0,78- 0,88)		
	FeCl <sub>3</sub> à 10 %	Phénols, Flavonoïdes, Tannins	Spot (0,93)		
	Dragendorff	Alcaloïdes	-		
	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Pb 5%	Coumarines	-		
	AlCl <sub>3</sub> 5%	Flavonoïdes	-		
<b>Butanolique</b>	Liebermann Bürchard + UV 365 nm	Stérols et Triterpènes	3 spots sombres (Rf : 0,27- 0,42- 0,57) <b>LB+ UV 365 nm</b> 3 spots Bleus (Rf : 0,27- 0,42- 0,57)	2 spots fluorescents (Rf: 0,56- 0,75)	2 zones d'extinction (Rf: 0,16- 0,32)
	Vanilline sulfurique	Terpènes, stéroïdes, caroténoïdes, cardénolides, flavonoïdes	Sombres (Rf : 0,35- 0,55) Spot brun (0,47)		
	Godin	Universel	Sombres (Rf : 0,34- 0,47- 0,97)		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50% dans l'éthanol	Glycosides cardiotoniques	Sombres (0,21 et 0,42)		
	FeCl <sub>3</sub> à 10 %	Phénols, Flavonoïdes, Tannins	Brun (Rf: 0,57)		
	Dragendorff	Alcaloïdes	Spot orange brun (0,15)		

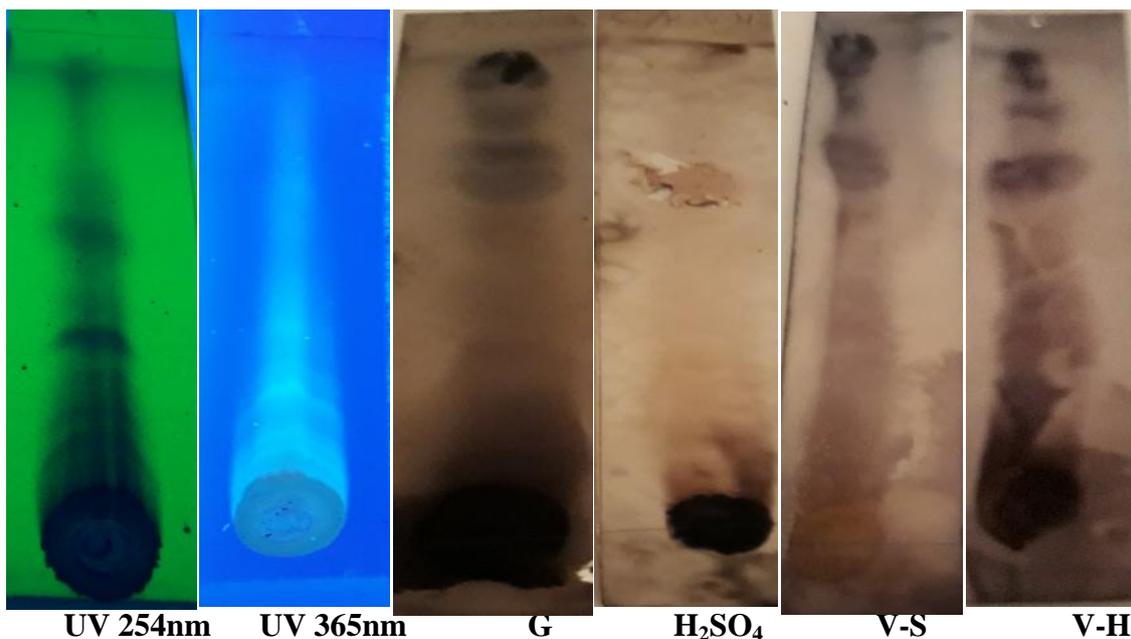
<b>Aqueuse</b>	Liebermann-Bürchard	Stérols et Triterpènes	Spot Brun (0,75) <b><u>LB+ UV 365 nm</u></b> Spot Bleu (0,75)	1 spot (Rf : 0,62) Belu foncé	1 spot (Rf : 0,69) Noir
	Vanilline sulfurique	Terpènes, stéroïdes, caroténoïdes, cardénolides, flavonoïdes	Brun foncé (0,68)		
	Vanilline- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Terpènes	Brun (0,75)		
	Godin	Universel	Brun (0,75)		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50% dans l'éthanol	Glycosides cardiotoniques	Brun (0,75)		
	FeCl <sub>3</sub> à 10 %	Phénols, Flavonoïdes, Tannins	Brun (0,75)		
	Dragendorff	Alcaloïdes	Spot (0,68)		
(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Pb 5%	Coumarines	Spot (0,64)			



**Fig. 10.** Chromatogramme de la fraction hexanique en utilisant le système d'éluant (n-Hexane/acétate d'éthyle ; 20: 4 (v/v)) révéillé par la vaniline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Vanilline-HCl, le H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le réactif de Godin, le FeCl<sub>3</sub> 10%, Dragendorff et l'AlCl<sub>3</sub> 5%.

#### Résultat de la CCM de la fraction chloroformique

L'analyse de la fraction chloroformique par CCM, en utilisant le système d'éluant (Chloroforme/acétate d'éthyle/n-Hexane; 10: 10: 4 (v/v/v)), a permis de révéller la présence terpènes, stérols, des glycosides cardiotoniques, des phénols, des tannins et des alcaloïdes (Tableau 7, Fig. 11).

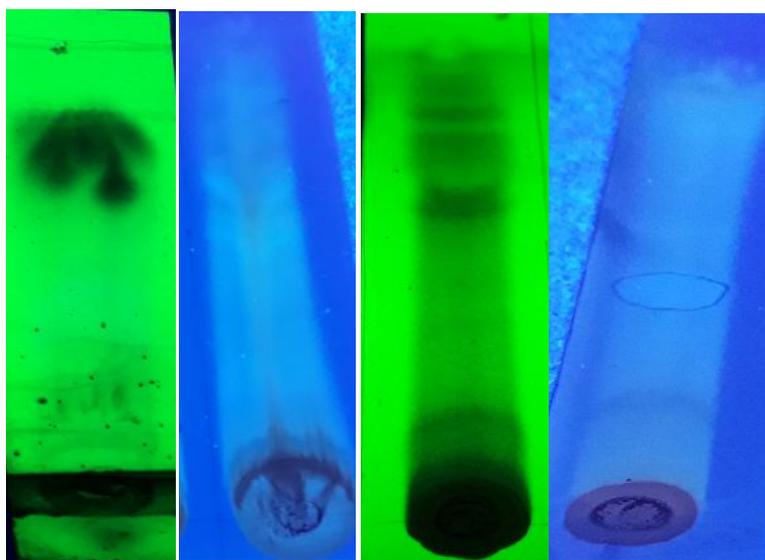


**Fig. 11.** Chromatogrammes de la fraction chloroformique en utilisant le système d'éluant (Chloroforme/ acétate d'éthyle/ n-Hexane; 10: 10: 4 (v/v/v)) révéillé sous l'UV et au visible par le réactif de Godin, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et Vanilline- HCl.

### Résultat de la CCM de la fraction d'acétate d'éthyle

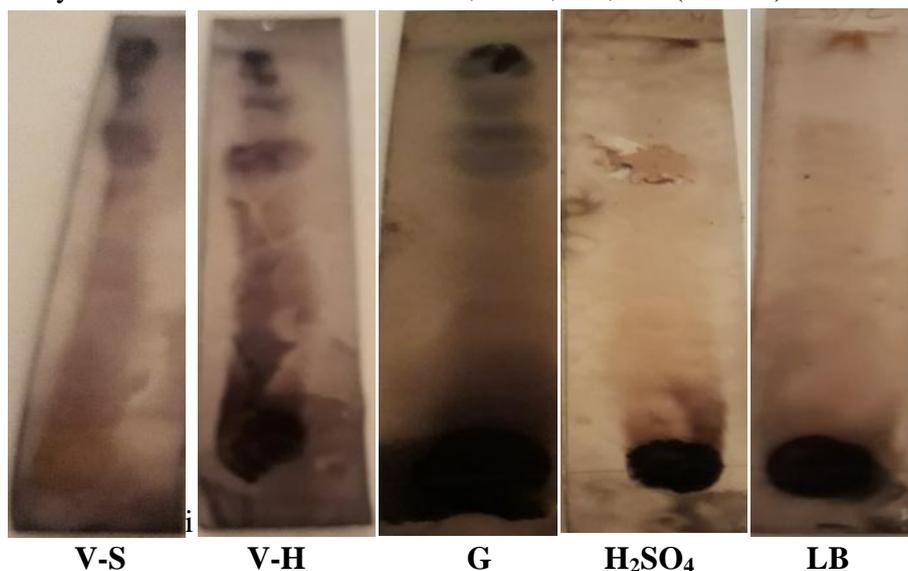
La fraction d'acétate d'éthyle analysée par CCM, en utilisant le système solvant (Acétate d'éthyle/ Méthanol/ Eau/ Chloroforme; 18: 2,4: 2,1: 6 (v/v/v/v)), a permis d'obtenir plusieurs spots sous UV et après révélation par plusieurs révélateurs. Cette fraction semble renfermer des terpènes, des stérols, des glycosides cardiotoniques, des phénols, des tannins mais pauvre en alcaloïdes, coumarines et flavonoïdes (**Tableau 7, Fig. 12 et 13**).

Le deuxième système d'éluant (Chloroforme/ acétate d'éthyle/ acide acétique; 12: 10: 1 (v/v/v)) n'a pas permis l'obtention de spots bien distinguables soit après observation des plaques sous UV et ou bien après révélation au visible.



S1: UV 254nm S1: UV 365nm S2: UV 254nm S2: UV 365nm

**Fig. 12.** Chromatogrammes de la fraction acétate d'éthyle en utilisant les systèmes d'éluant S1 : Chloroforme/ acétate d'éthyle/ acide acétique; 12: 10: 1 (v/v/v) et S2 : Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau/ Chloroforme; 18: 2,4: 2,1: 6 (v/v/v/v) révélé sous l'UV.

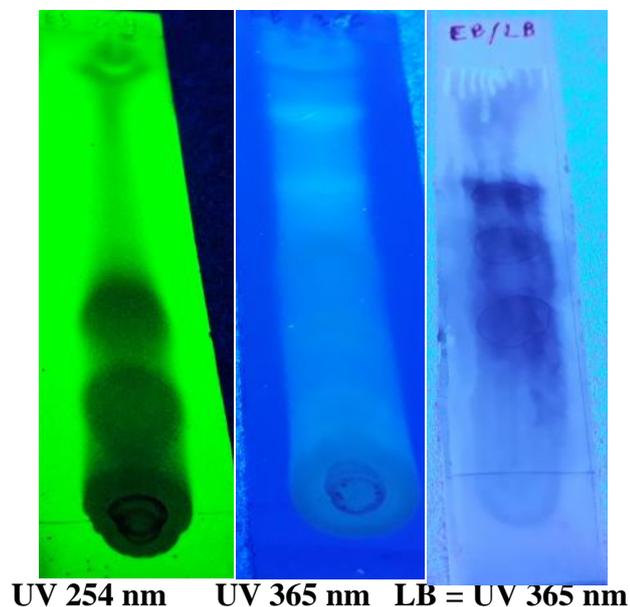


V-S V-H G H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> LB

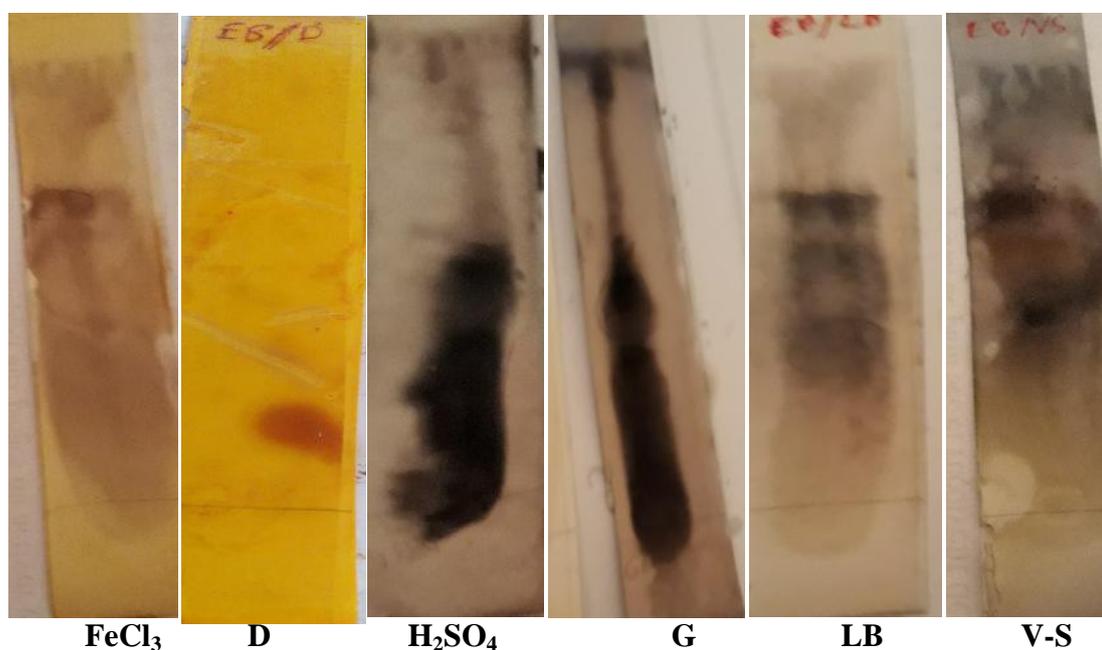
**Fig. 13.** Chromatogrammes de la fraction acétate d'éthyle en utilisant le système d'éluant S2 : Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau/ Chloroforme; 18: 2,4: 2,1: 6 (v/v v/v) révélé par la Vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, la Vanilline-HCl, le réactif de Godin et le H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### Résultat de la CCM de la fraction butanolique

La fraction butanolique semble être la plus riche en phytoconstitués notamment : terpènes, stérols, glycosides cardiotoniques, alcaloïdes et tannins (**Tableau 7, Fig. 14 et 15**).



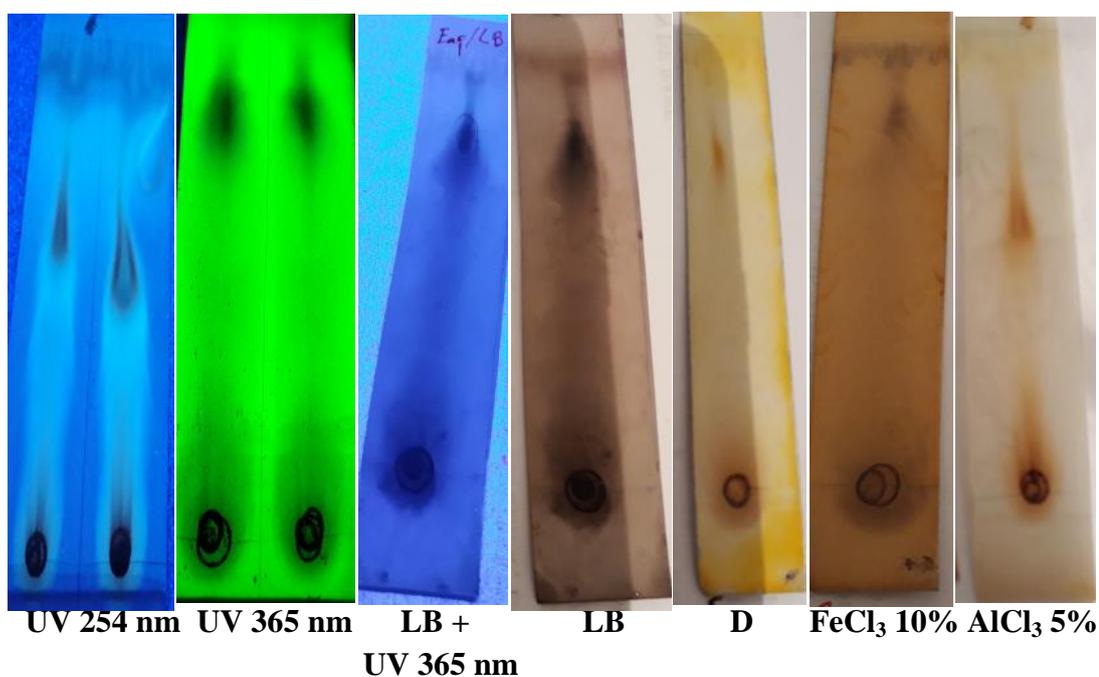
**Fig. 14.** Chromatogrammes de la fraction butanolique en utilisant le système d'éluant Acétate d'éthyle/ Ethanol/ Acide formique/ Eau; 10: 1,10: 0,7 : 2,5 (v/v v/v) révélés sous l'UV.



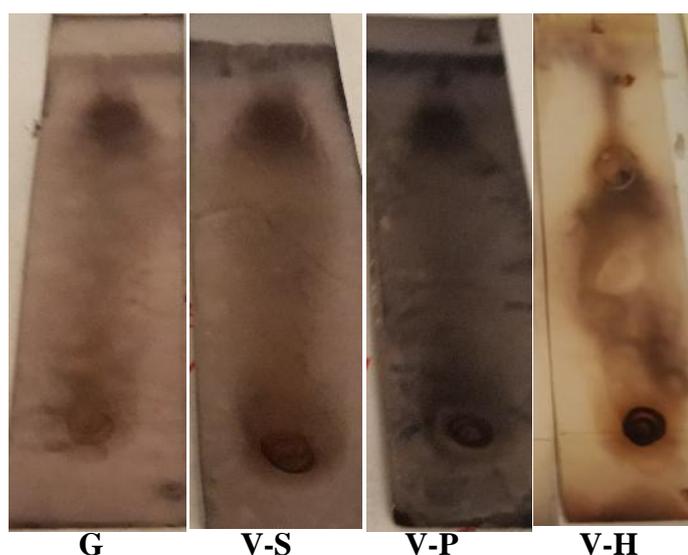
**Fig. 15.** Chromatogrammes de la fraction butanolique en utilisant le système d'éluant Acétate d'éthyle/ Ethanol/ Acide formique/ Eau; 10: 1,10: 0,7 : 2,5 (v/v v/v) révélés par le FeCl<sub>3</sub>, Dragendorff, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Godin, Liebermann-Burchard et Vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### Résultat de la CCM de la fraction aqueuse

La fraction aqueuse analysée par CCM, en utilisant le système d'éluant (Acétate d'éthyle/ Méthanol/Eau; 7: 2,7: 0,3 (v/v/v)), a permis de révéler la présence de la plupart des métabolites secondaires : terpènes, stérols, glycosides cardiotoniques, alcaloïdes, phénols mais avec il paraît qu'elle soit moins riche comparativement aux autres fractions (**Tableau 7, Fig. 16 et 17**).



**Fig. 16.** Chromatogrammes de la fraction aqueuse en utilisant le système d'éluant Acétate d'éthyle/ Méthanol/Eau; 7: 2,7: 0,3 (v/v/v) révélés sous l'UV et avec le réactif de Dragendorff, L.B., FeCl<sub>3</sub> 10% et l'AlCl<sub>3</sub> 5%.



**Fig. 17.** Chromatogrammes de la fraction aqueuse en utilisant le système d'éluant Acétate d'éthyle/ Méthanol/Eau; 7: 2,7: 0,3 (v/v/v) révélés avec le réactif de Godin, vanilline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, vanilline-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> et vanilline-HCl.

---

---

### III.3- Paramètres toxicométriques

#### III.3.1- Estimation de la DL<sub>50</sub> par la méthode de Litchfield et Wilcoxon

##### A- Observation du comportement et carte clinique des animaux

Les animaux ont été mis sous observation pendant 72 heures afin de noter les symptômes de toxicité, le comportement et le taux de mortalité. Les tableaux cliniques des rats mâles et femelles et des souris males et femelles traitées étaient semblables.

Les doses testées ont produit des symptômes de toxicité qui ont commencé à apparaître dès les premières heures du traitement et qui se sont aggravés au fil du temps. Dès le début du traitement et ceci même pour les doses faibles, les symptômes constatés pourraient être résumés en une irritation de la bouche et du nez, une agitation, un redressement des poils, une faiblesse avec manque de vivacité et refus de boire et de s'alimenter.

Après quelques minutes, une diarrhée aqueuse s'installe et s'aggrave au fil du temps pour devenir riche en mucus et parfois même sanguinolente, l'activité des animaux devient réduite, leur mouvement devient lente, ils se couchent sur le ventre avec les pattes postérieures écartées et cyanosées, ils s'isolent et se rangent les uns à côté des autres dans un coin de la cage, leur respiration devient laborieuse avec accélération du rythme cardiaque, perte d'équilibre, paralysie des pattes puis totale, coma et enfin la mort. L'intensité des symptômes observés était dose dépendante.

La mort survient au bout de quelques heures. Après 72 heures, les animaux survivants ont présenté certains symptômes incluant une diarrhée modérée et ont retrouvé un comportement normal comparable à celui des témoins.

##### B- Détermination de la DL<sub>50</sub> chez les rats mâles

Les taux de mortalité chez les rats males et femelles étaient maximum (100%) chez les groupes traités respectivement avec 3000mg/kg et 4000mg/kg (**Tableau 8 et 9**), tandis que les souris males et femelles ont succombées en leur totalité après avoir reçu la dose de 1000 mg/kg (**Tableau 10 et 11**).

Les taux de mortalité enregistrés, exprimés en unités probit, sont présentés en fonction des différentes doses de l'extrait méthanolique du CCT administrés (Litchfield et Wilcoxon, 1949).

La dose létale médiane (DL<sub>50</sub>) de l'extrait pour les rats males déterminée graphiquement est de 1311,45 mg/kg avec des limites d'intervalle de confiance à 95% de: 1037.80 à 1657.27 mg/kg. Les DL<sub>16</sub> et DL<sub>84</sub> étaient respectivement de 825,61 mg/kg et 2083,19 mg/kg (**Fig. 18**).

La détermination de la  $DL_{50}$  de l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis* par les méthodes arithmétiques de Dragstedt et Lang (1957) et Karber et Behrens (1935) a permis d'obtenir des valeurs de la  $DL_{50}$  chez les rats mâles de 1533,33 mg/kg et 1465 mg/kg respectivement.

**Tableau 8 :** Détermination des paramètres toxicométriques après administration de l'extrait méthanolique du fruit du *Citrullus colocynthis* par voie orale chez des rats males par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

Dose (mg/Kg)	NB Mort /NB total de rats dans un groupe	Effet observé		Effet attendu		Différence %	$t^2$
		Probit	%	Probit	%		
500	0/10	2.54	0.7	2.92	1.9	1,20	0.007
1000	3/10	4.48	30	4.41	27.7	-2,30	0.0028
1800	6/10	5.25	60	5.68	75.3	15,30	0.15
2000	9/10	6.28	90	5.91	81.9	-8,10	0.0046
3000	10/10	7.26	98.8	6.79	96.3	-2,50	0.016

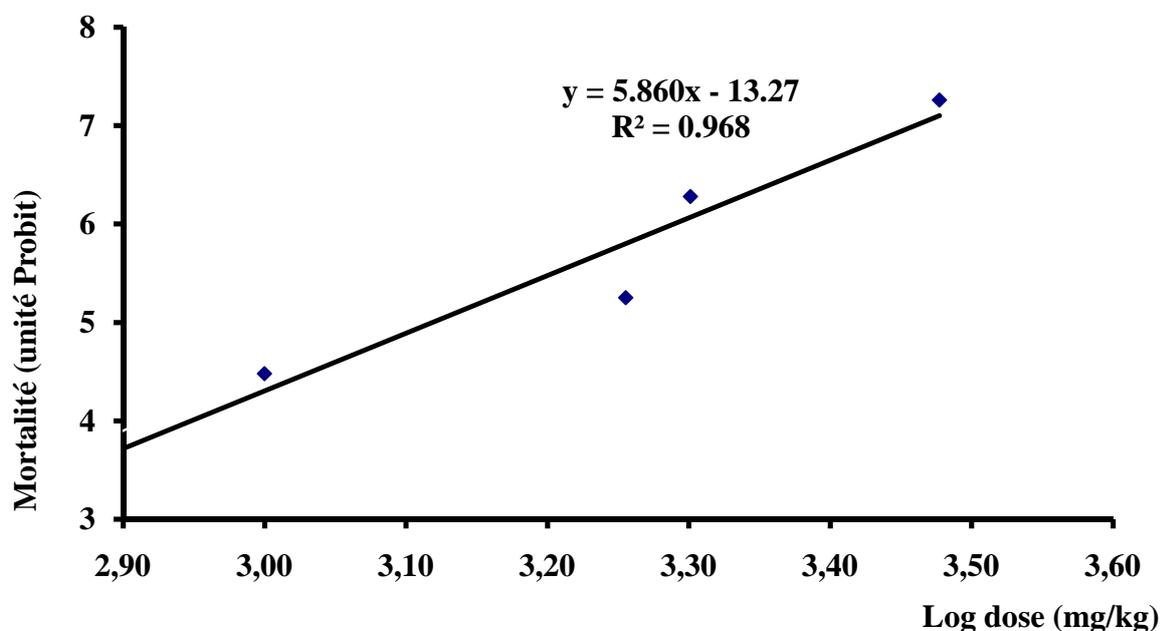
La somme des diverses contributions au  $\chi^2$  :  $\chi^2_{\text{expérimental}} = 0.180$

$\chi^2$  de la droite :  $\chi^2 = \chi^2_{\text{tabulé}}$  con  $\chi^2_{\text{tabulé}} = 1.804$  (N : nombre total d'animaux = 50, K : le nombre total de doses = 5)

On lit la valeur de  $\chi^2$  pour le seuil de probabilité  $p = 0.05$  pour un degré de liberté  $n = K - 2 = 3$  (Nombres de doses - 2):  $\chi^2_{\text{tabulé}} = 7.82$ .

Vu que le  $\chi^2_{\text{expérimental}} < \chi^2_{\text{tabulé}}$ , les résultats de l'expérience sont acceptables.

A partir des données présentées au tableau, la courbe probit = f (log dose) est tracé (Fig. 20).



**Fig. 18.** Courbe dose-effet pour la détermination de la  $DL_{50}$  chez des rats males traités par voie orale avec l'extrait méthanolique du fruit de CCT.

$DL_{16}$  825.611 mg/kg

$DL_{84}$  2083.191 mg/kg

Pente de la droite :  $S = (DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16})/2 = 1,59$

#### L'intervalle de confiance de la $DL_{50}$

Nombre total des animaux dont les effets attendus sont compris entre 16 et 84% :  $N' = 30$

Exposant de  $S = 2.77 / N' = 0.51$

$f_{DL_{50}} = (S)^{\text{exposant}} = 1.26$

Pour le seuil de probabilité  $p = 0.05$ ; l'intervalle de confiance de la  $DL_{50}$  :  $DL_{50}$

$[DL_{50}/f_{DL_{50}}; DL_{50} \times f_{DL_{50}}]$  est: **[1037.8 mg/kg <  $DL_{50}$  < 1657.27] mg/kg**

#### L'intervalle de confiance de la pente S

$f_S = A^{\text{exposant}} = 1,23$  où Exposant =  $10(K-1)/K N'$

Pour le seuil de probabilité  $p = 0,05$ ; l'intervalle de la pente S:  $S \quad [S/f_S; S \times f_S]$  est :

**[1.30 < S < 1.95]**

#### C- Détermination de la $DL_{50}$ chez le rats femelles

Après administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT par voie orale aux différents lots de dix souris, et avec les doses comprises entre 1000 mg/kg et 4000 mg/kg, la mortalité des rats femelles en pourcentage et en unités probits en fonction de la dose sont relevés dans le **tableau 9** et représentées graphiquement dans la **figure 19**.

**Tableau 9:** Détermination des paramètres toxicométriques après administration de l'extrait méthanolique du fruit de *Citrullus colocynthis* par voie orale chez des rats femelles par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

Dose (mg/Kg)	NB Mort /NB total de rats dans un groupe	Effet observé		Effet attendu		Différence	$t^2$
		Probit	%	%	%		
1000	0/10	3.12	3	3.685	9.3	6,3	0.048
1400	3/10	4.48	30	4.479	29.9	-0,1	0
2500	8/10	5.84	80	5.846	80.1	0,1	0
3000	9/10	6.28	90	6.276	89.9	-0,1	0
4000	10/10	7.37	99.1	6.954	97.4	-1,7	0.01

La somme des diverses contributions au  $\chi^2$  :  $\chi^2_{\text{expérimental}} = 0,058$

$\chi^2$  de la droite :  $\chi^2 = 0,058$  con  $2 \cdot N/K = 0,058 \cdot 50/5$  ( $N$  : nombre total d'animaux = 50,  $K$  : le nombre total de doses = 5) = 0.58

On lit la valeur de  $\chi^2$  pour le seuil de probabilité  $p = 0.05$  pour un degré de liberté  $n = K - 2 = 3$  (Nombres de doses - 2):  $\chi^2_{\text{tabulé}} = 7.82$ .

Vu que le  $\chi^2$  expérimental <  $\chi^2$  tabulé, les résultats de l'expérience sont acceptables

A partir des données présentées au tableau, on trace la courbe probit = f (log dose) (Fig. 19).

DL<sub>50</sub> calculée à partir de la droite tracée est égale : **DL<sub>50</sub> 1746.457 mg/kg**

DL<sub>16</sub> 1142.787 mg/kg

DL<sub>84</sub> 2669.012 mg/kg

Pente de la droite  $S = (DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16})/2 = 1.53$

#### L'intervalle de confiance de la DL<sub>50</sub>

Nombre total des animaux dont les effets attendus sont compris entre 16 et 84% : N'=20

N'=4.47

Exposant de S = 2.77/ N'=0.62

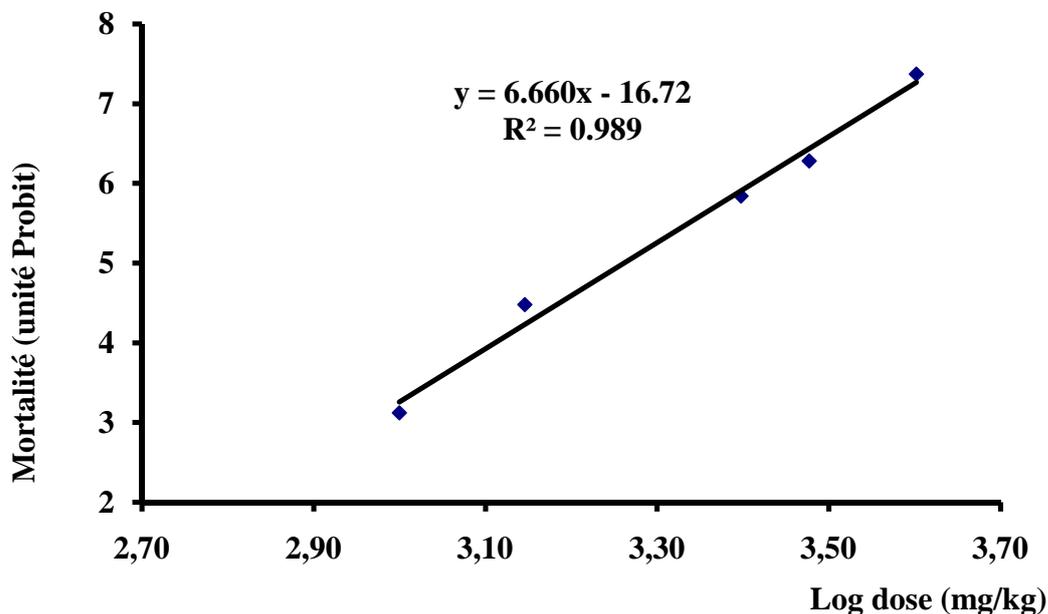
$fDL_{50} = (S)^{\text{exposant}} = 1.30$

Pour le seuil de probabilité p = 0.05; l'intervalle de la DL<sub>50</sub> : DL<sub>50</sub> [DL<sub>50</sub>/fDL<sub>50</sub>; DL<sub>50</sub> × fDL<sub>50</sub>] est : [1342.98 < DL<sub>50</sub> < 2271.15] mg/kg

#### L'intervalle de confiance de la pente S

$f_S = A^{\text{exposant}} = 1.26$  où Exposant = 10(K-1)/K N'

Pour le seuil de probabilité p=0,05; l'intervalle de la pente S est: [1.21 < S < 1.93]



**Fig. 19.** Courbe dose-effet enregistré pour la détermination de la DL<sub>50</sub> chez des rats femelles traités par voie orale avec l'extrait méthanolique du fruit de CCT.

### D- Détermination de la DL<sub>50</sub> chez les souris mâles

Des doses comprises entre 25 mg/kg et 1000 mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits de CCT ont été administrés par voie orale aux différents lots des souris mâles. Les résultats de la mortalité de ces animaux en fonction des doses administrées sont relevés dans le **tableau 10** et représentés dans la **figure 20**.

**Tableau 10:** Détermination des paramètres toxicométriques après administration de l'extrait méthanolique du fruit du *Citrullus colocynthis* par voie orale chez des souris males par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

Dose (mg/Kg)	NB Mort /NB total de rats dans un groupe	Effet observé		Effet attendu		Différence %	t <sup>2</sup>
		Probit	%	Probit	%		
25	0/10	2.35	0.4	2.743	1.2	0,8	0.006
50	1/10	3.72	10	3.662	8.1	-1,9	0.005
100	3/10	4.48	30	4.581	31.1	1,1	0
250	8/10	5.84	80	5.796	78.9	-1,1	0
1000	10/10	7.75	99.7	7.634	99.5	-0,2	0

La somme des diverses contributions au  $\chi^2$  :  $\chi^2_{\text{expérimental}} = 0.011$

$\chi^2$  de la droite :  $\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$  con  $\chi^2_{.N/K=0,058.50/5}$  (N : nombre total d'animaux = 50, K : le nombre total de doses = 5) = 0.11

On lit la valeur de  $\chi^2$  pour le seuil de probabilité  $p = 0.05$  pour un degré de liberté  $n = K - 2 = 3$  (Nombres de doses - 2):  $\chi^2_{\text{tabulé}} = 7.82$ .

Vu que le  $\chi^2_{\text{expérimental}} < \chi^2_{\text{tabulé}}$ , les résultats de l'expérience sont acceptables

A partir des données présentées au tableau, on trace la courbe probit = f (log dose) (**Fig. 20**).

DL<sub>50</sub> calculée à partir de la droite tracée est égale: **DL<sub>50</sub> 137.132 mg/kg**

DL<sub>16</sub> 64.506 mg/kg

DL<sub>84</sub> 291.525 mg/kg

Pente de la droite  $S = (DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16})/2 = 2.13$

#### L'intervalle de confiance de la DL<sub>50</sub>

Nombre total des animaux dont les effets attendus sont compris entre 16 et 84% : N'=20

Racine N'=4.47

Exposant de S = 2.77/ N'=0.62

$fDL_{50} = (S)^{\text{exposant}} = 1.60$

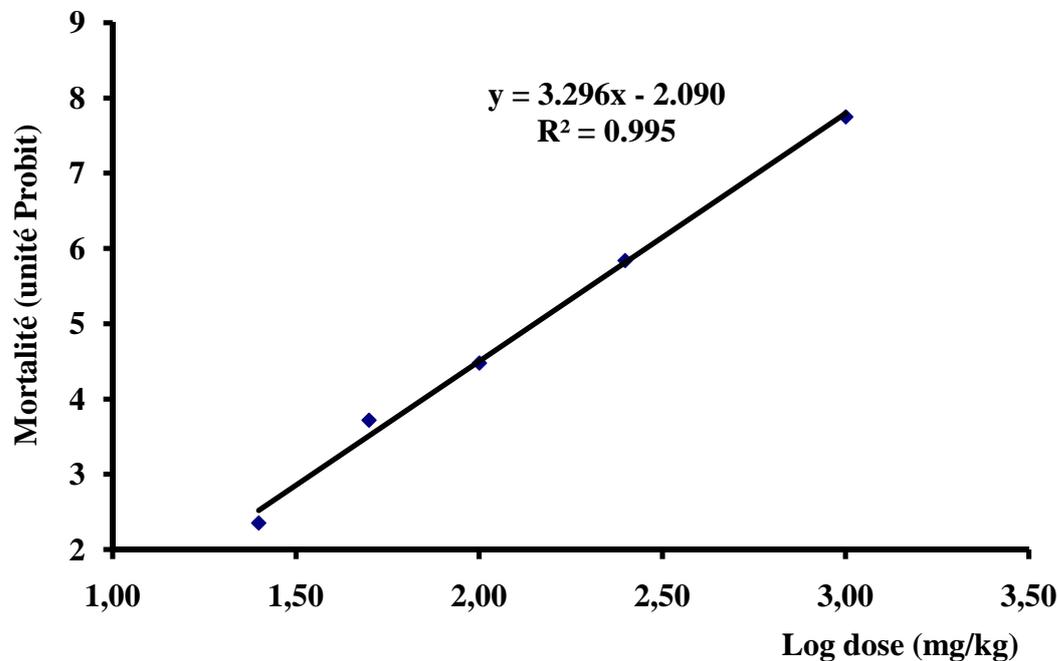
Pour le seuil de probabilité  $P = 0.05$ ; l'intervalle de la DL<sub>50</sub> : DL<sub>50</sub> [DL<sub>50</sub>/fDL<sub>50</sub> : DL<sub>50</sub> ×

fDL<sub>50</sub>] est : [85.95 < DL<sub>50</sub> < 218.78] mg/kg

**L'intervalle de confiance de la pente S**

$$f_s = A^{\text{exposant}} = 1.37 \quad \text{où} \quad \text{Exposant} = 10(K-1)/K \quad N'$$

Pour le seuil de probabilité  $P=0,05$ ; l'intervalle de la pente S est : **[1.56<S<2.90]**



**Fig. 20.** Courbe dose-effet pour la détermination de la  $DL_{50}$  chez des souris mâles traitées par voie orale avec l'extrait méthanolique du fruit de CCT.

**E- Détermination de la  $DL_{50}$  chez les souris femelles**

Des doses comprises entre 50 mg/kg et 1000 mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits de CCT ont été administrés par voie orale aux différents lots des souris femelles. Les résultats de la mortalité de ces animaux en fonction des doses administrées sont relevés dans le **tableau 11** et représentés dans la **figure 21**.

**Tableau 11:** Détermination des paramètres toxicométriques après administration de l'extrait méthanolique du fruit de *Citrullus colocynthis* par voie orale chez des souris femelles par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949).

Dose (mg/Kg)	NB Mort /NB total de rats dans un groupe	Effet observé		Effet attendu		Différence %	t <sup>2</sup>
		Probit	%	Probit	%		
50	0/10	3	2.3	3.519	6.9	4,6	0.03
100	3/10	4.48	30	4.265	23.1	-6,9	0.028
250	4/10	4.75	40	5.25	59.9	19,9	0.195
500	9/10	6.28	90	5.995	83.9	-6,1	0.028
1000	10/10	7.23	98.7	6.741	95.9	-2,8	0.019

La somme des diverses contributions au  $\chi^2$  :  $\chi^2_{\text{expérimental}} = 0.30$

$\chi^2$  de la droite :  $\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$  con  $\chi^2_{.N/K=0,058.50/5}$  (N : nombre total d'animaux = 50, K : le nombre total de doses = 5) = 3

On lit la valeur de  $\chi^2$  pour le seuil de probabilité  $p=0.05$  pour un degré de liberté  $n = K-2 = 3$  (Nombres de doses - 2):  $\chi^2_{\text{tabulé}} = 7.82$ .

Vu que le  $\chi^2_{\text{expérimental}} < \chi^2_{\text{tabulé}}$ , les résultats de l'expérience sont acceptables

A partir des données présentées au tableau, on trace la courbe probit = f (log dose) (**Fig. 21**).

DL<sub>50</sub> calculée à partir de la droite tracée est égale:

Selon le graphique Probit=f (Log Dose): **DL<sub>50</sub> = 198.158 mg/kg**

DL<sub>16</sub> = 78.187 mg/kg

DL<sub>84</sub> = 502.214 mg/kg

Pente de la droite  $S = (DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16})/2 = 2.53$

#### L'intervalle de confiance de la DL<sub>50</sub>

Nombre total des animaux dont les effets attendus sont compris entre 16 et 84% : N'=30

Racine N' = 5.48

Exposant de S = 2.77/ N' = 0.51

$f_{DL_{50}} = (S)^{\text{exposant}} = 1.60$

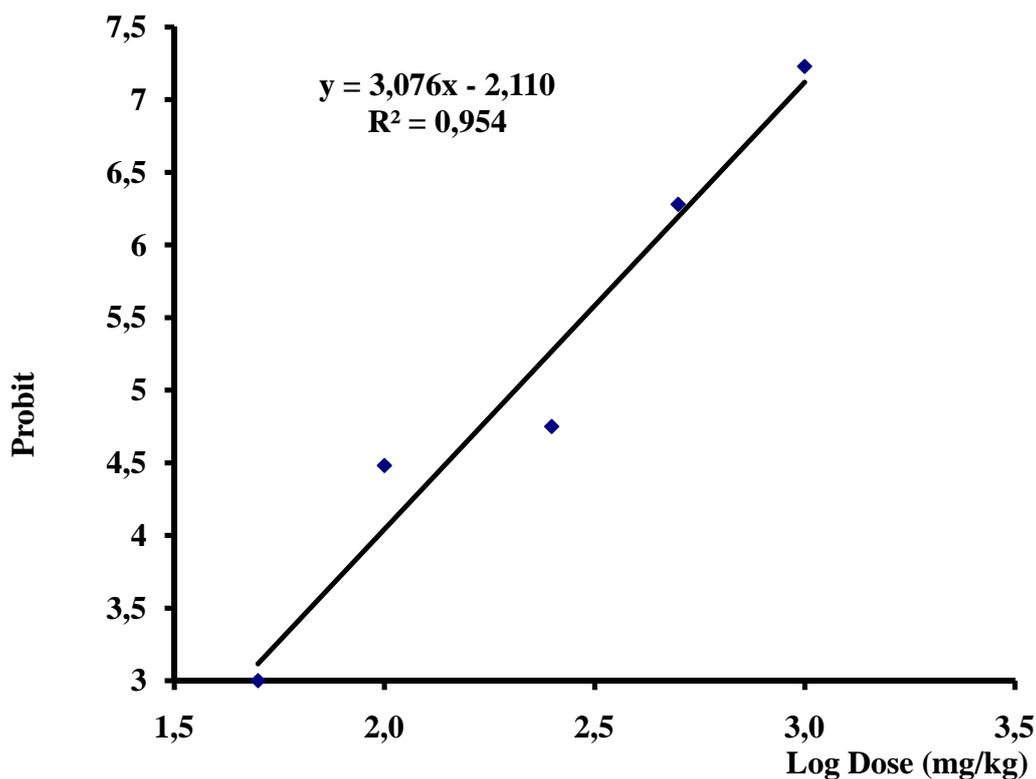
Pour le seuil de probabilité  $P = 0.05$ ; l'intervalle de la DL<sub>50</sub> : DL<sub>50</sub> [DL<sub>50</sub>/fDL<sub>50</sub>; DL<sub>50</sub> × fDL<sub>50</sub>] est :

$$[123.81 < DL_{50} < 317.15] \text{ mg/kg}$$

#### L'intervalle de confiance de la pente S

$f_S = A^{\text{exposant}} = 1.63$  où Exposant =  $10(K-1)/K$  N'

Pour le seuil de probabilité  $P=0,05$ ; l'intervalle de la pente S est: **[1.55 < S < 4.14]**



**Fig. 21.** Courbe dose-effet pour la détermination de la  $DL_{50}$  chez des souris femelles traitées par voie orale avec l'extrait méthanolique du fruit de CCT.

### F- Comparaison des $DL_{50}$

Il s'agit de comparer les valeurs de :  $S$ ,  $f_s$ ,  $DL_{50}$  et  $fDL_{50}$  entre les différentes espèces étudiées.

**Tableau 12 :** Les différents paramètres toxicométriques calculés pour les différentes espèces animales utilisées.

Paramètre	Rats mâles	Rats femelles	Souris mâles	Souris femelles
$DL_{50}$ (mg/kg)	1311.45	1746.46	137.13	198.16
$DL_{16}$ (mg/kg)	825.61	1142.79	64.51	78.19
$DL_{84}$ (mg/kg)	2083.19	2669.01	291.52	502.21
Zone $Z = DL_{16}/DL_{84}$	0.40	0.43	0.22	0.16
Pente $S = (DL_{84}/DL_{50} + DL_{50}/DL_{16})/2$	1.59	1.53	2.13	2.53
Coefficient de toxicité $K = 1/S * DL_{50}$	0.00048	0.00037	0.00343	0.00199
$fDL_{50}$	1.26	1.30	1.60	1.60
$f_s$	1.23	1.26	1.37	1.63

### ➤ Comparaison entre rats mâles et femelles

A partir du **tableau 12**, le rapport de la pente (RS):  $RS = S_{\text{sup}}/S_{\text{inf}} = 1.04$  est calculé. La valeur de  $f_{RS} = 1.35$ .

Puisque :  $RS = 1.04 < f_{RS} = 1.35$ , les deux droites pour les rats mâles et femelles peuvent être considérées comme parallèles (**Fig. 24**). Par conséquent, le mécanisme léthalité chez les rats mâles et femelles pourrait être identique.

Calcul des limites de confiance du rapport de pentes : RS [RS/ $f_{RS}$  : RS $\times f_{RS}$ ]

[0.77 < **RS** < 1.404]

### *Calcul du rapport d'activité entre deux espèces (RP)*

Ce rapport ne peut être calculé que si les droites peuvent être considérées comme parallèles, c'est-à-dire lorsque  $RS < f_{RS}$ .

$RP = DL_{50\text{sup}}/DL_{50\text{inf}} = 1.33$  et  $f_{RP} = 1.43$

Puisque :  $RP = 1.33 < f_{RP} = 1.43$ , il n'y a pas de différence significative de point de vue effet biologique entre rat mâles et femelles.

Calcul des limites de confiance de RP : RP [RS/ $f_{RP}$  : RS $\times f_{RP}$ ] donc [0.93 < **RP** < 1.90]

### ➤ Comparaison entre souris mâles et femelles

A partir du **tableau 12**, le rapport de la pente (RS):  $RS = S_{\text{sup}}/S_{\text{inf}} = 1.19$ . La valeur de  $f_{RS} = 1.76$ .

Puisque :  $RS = 1.19 < f_{RS} = 1.76$ , les deux droites pour les souris mâles et femelles sont parallèles (**Fig. 22**). Par conséquent, le mécanisme léthalité chez les souris mâles et femelles pourrait être identique.

Calcul des limites de confiance du rapport de pentes: [0.676 < **RS** < 2.094]

### *Calcul du rapport d'activité entre deux espèces (RP)*

$RP = DL_{50\text{sup}}/DL_{50\text{inf}} = 1.45$  et  $f_{RP} = 1.94$

Puisque :  $RP = 1.33 < f_{RP} = 1.94$ , il n'y a pas de différence significative de point de vue effet biologique entre souris mâles et femelles.

Calcul des limites de confiance de RP: [1.337 < **RP** < 2.813]

### ➤ Comparaison entre rats et souris mâles

A partir du **tableau 12**, on calcul le rapport de la pente (RS):  $RS = S_{\text{sup}}/S_{\text{inf}} = 1.34$ . La valeur de  $f_{RS} = 1.465$ .

Puisque :  $RS = 1,34 < f_{RS} = 1,465$ , les deux droites pour les rats et les souris mâles sont parallèles (**Fig. 22**). Par conséquent, le mécanisme léthalité chez les rats et les souris mâles pourrait être identique.

Calcul des limites de confiance du rapport de pentes : [1.093 < **RS** < 1.963]

**Calcul du rapport d'activité entre deux espèces (RP)**

$$RP = DL_{50sup}/DL_{50inf} = 9.56 \text{ et } f_{RP} = 1.69$$

Puisque:  $RP = 9.56 > f_{RP} = 1.69$ , probablement, il ya une différence significative de point de vue effet biologique entre rats et souris mâles.

Calcul des limites de confiance de RP :  $[5.656 < RP < 16.156]$

**➤ Comparaison entre rats et souris femelles**

A partir du **tableau 12**, on calcul le rapport de la pente (RS):  $RS = S_{sup}/S_{inf} = 1.66$ . La valeur de  $f_{RS} = 1.7$ .

Puisque, la valeur de  $RS = 1.66 \approx f_{SR} = 1.7$ , les deux droites pour les rats et les souris femelles sont parallèles (**Fig. 22**). Par conséquent, le mécanisme léthalité chez les rats et les souris femelles pourrait être identique.

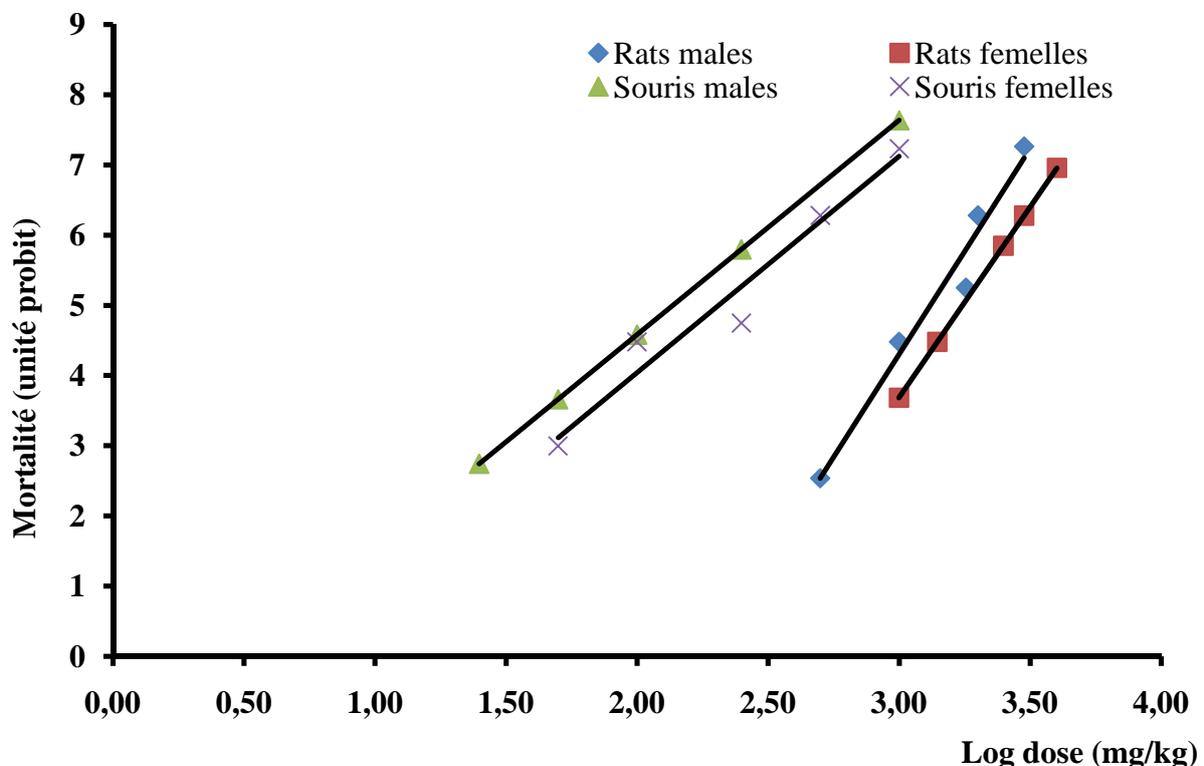
Calcul des limites de confiance du rapport de pentes :  $[0.98 < RS < 2.82]$

**Calcul du rapport d'activité entre deux espèces (RP)**

$$RP = DL_{50sup} / DL_{50inf} = 8.81 \text{ et } f_{RP} = 1.71$$

Puisque:  $RP = 8.81 > f_{RP} = 1.71$ , probablement, il ya une différence significative de point de vue effet biologique entre rats et souris femelles.

Calcul des limites de confiance de RP:  $[5.005 < RP < 15.505]$



**Fig. 22.** Courbe dose-effet enregistré au cours de la détermination de la  $DL_{50}$  chez des rats mâles et femelles et des souris mâles et femelles traités par voie orale avec l'extrait méthanolique du fruit de CCT .

---

---

### III.3.2- Etude de la toxicité aigüe non léthale

#### III.3.2.1- Toxicité aigüe chez les rats mâles

Les signes majeurs de toxicité observés après l'administration d'une dose unique de l'extrait méthanolique du CCT par voie orale (440 mg/kg  $1/3$  DL<sub>50</sub>) qui commencent à apparaître dès la première heure peuvent être résumés en: un redressement des poils, une baisse de l'activité, une tendance au regroupement des rats dans un coin de la cage, apparition des selles molles puis une diarrhée légère. Malgré ces symptômes, aucune mortalité n'a été enregistrée au cours de l'expérience.

Aucune différence significative n'est enregistrée sur le poids corporel moyen des groupes traités en comparaison aux témoins. L'examen macroscopique des différents organes *in situ* n'a pas révélé de changements morphologiques au niveau des organes des animaux traités en comparaison à ceux des témoins. Les effets de l'extrait des fruits de CCT sur la masse relative des organes (foie, rein, poumon, cœur, cerveau, testicule et rate) sont présentés dans le **tableau 13**. Une réduction significative est notée sur la masse relative du foie, des reins et des poumons de la plupart des groupes traités (du 1<sup>er</sup> au 10<sup>ème</sup> jour) en comparaison aux témoins. Après 14 jours du traitement, il semble qu'il ya récupération car aucun changement n'a pu être observée sur l'ensemble des organes de ce groupe comparativement aux témoins (**Tableau 13**).

**Tableau 13:** Masse relative des organes de rats mâles Albino Wistar traités par voie orale avec une dose de 440 mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits du *C. colocynthis*.

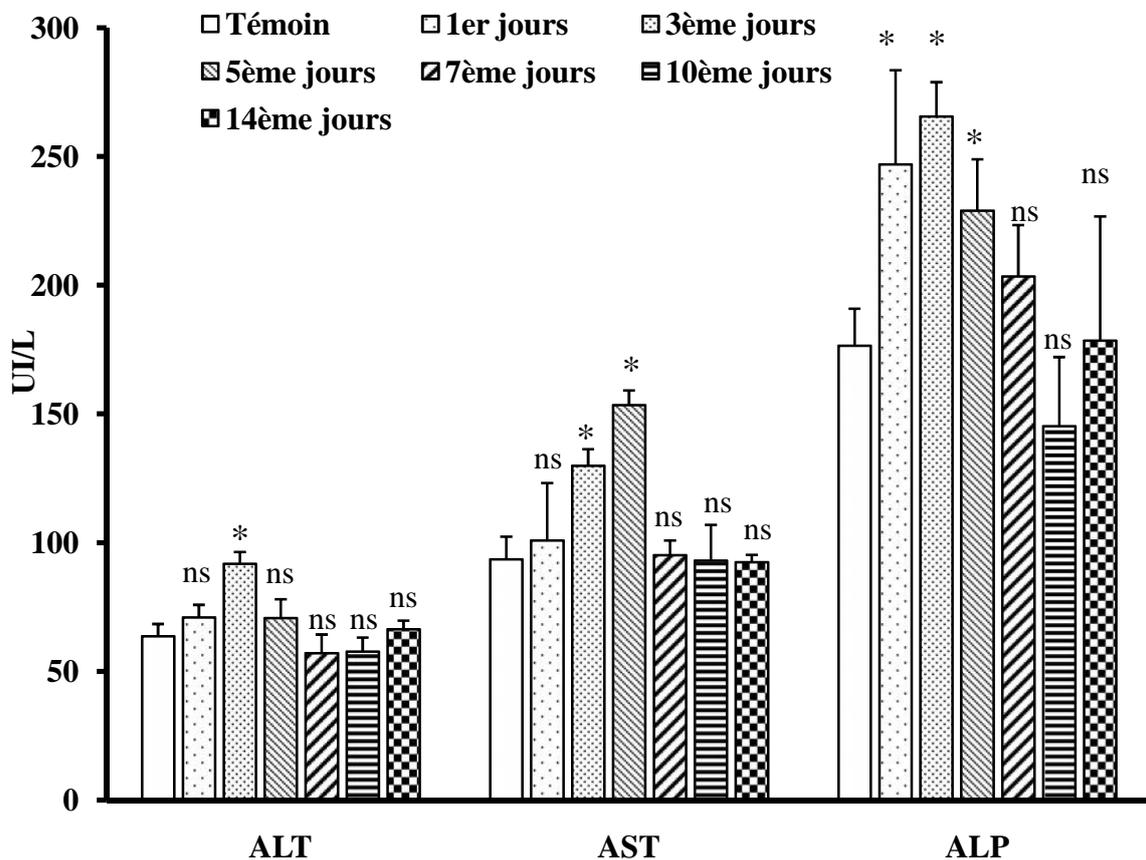
<b>Organe</b> <b>Groupe</b>	<b>Foie</b>	<b>Reins</b>	<b>Cerveau</b>	<b>Testicules</b>	<b>Poumons</b>	<b>Cœur</b>	<b>Rate</b>
<b>Témoin</b>	0,0391 ± 0,0003	0,0075±0,0002	0,0075±0,0002	0,0103±0,0006	0,0074±0,0004	0,0031±0,00003	0,0038±0,0002
<b>1 jour</b>	0,0341±0,0015*	0,0056±0,0005*	0,0073±0,0005 <sup>ns</sup>	0,0083±0,0003*	0,0056±0,0007*	0,0026±0,0002*	0,0033±0,0005*
<b>3 jours</b>	0,0354±0,0018*	0,0049±0,0007*	0,0073±0,0002 <sup>ns</sup>	0,0069±0,0002*	0,0057±0,0003*	0,0027±0,0002 <sup>ns</sup>	0,0033±0,0002*
<b>5 jours</b>	0,0356± 0,0022*	0,0053± 0,0002*	0,0075± 0,0003 <sup>ns</sup>	0,0084± 0,0011 <sup>ns</sup>	0,0063± 0,0002*	0,0028± 0,0002 <sup>ns</sup>	0,0031± 0,0002*
<b>7 jours</b>	0,0357± 0,0025*	0,0054± 0,0002*	0,0073± 0,0003 <sup>ns</sup>	0,0093± 0,0006 <sup>ns</sup>	0,0065± 0,0006*	0,0029± 0,0001 <sup>ns</sup>	0,0034± 0,0003 <sup>ns</sup>
<b>10 jours</b>	0,0359± 0,0014*	0,0061± 0,0002*	0,0075± 0,0003 <sup>ns</sup>	0,0093± 0,0008 <sup>ns</sup>	0,0065± 0,0003*	0,0029± 0,0002 <sup>ns</sup>	0,0035± 0,0005 <sup>ns</sup>
<b>14 jours</b>	0,0378± 0,0005 <sup>ns</sup>	0,0067± 0,0007 <sup>ns</sup>	0,0077± 0,00001 <sup>ns</sup>	0,0099± 0,0012 <sup>ns</sup>	0,0068± 0,0005 <sup>ns</sup>	0,0030± 0,0001 <sup>ns</sup>	0,0035± 0,0001 <sup>ns</sup>

Les valeurs sont la Moyenne ±SEM (n=10). Comparaison par rapport au témoin. \* : P≤ 0,05, ns : P> 0,05.

### III.3.2.2- Etude des paramètres biochimiques

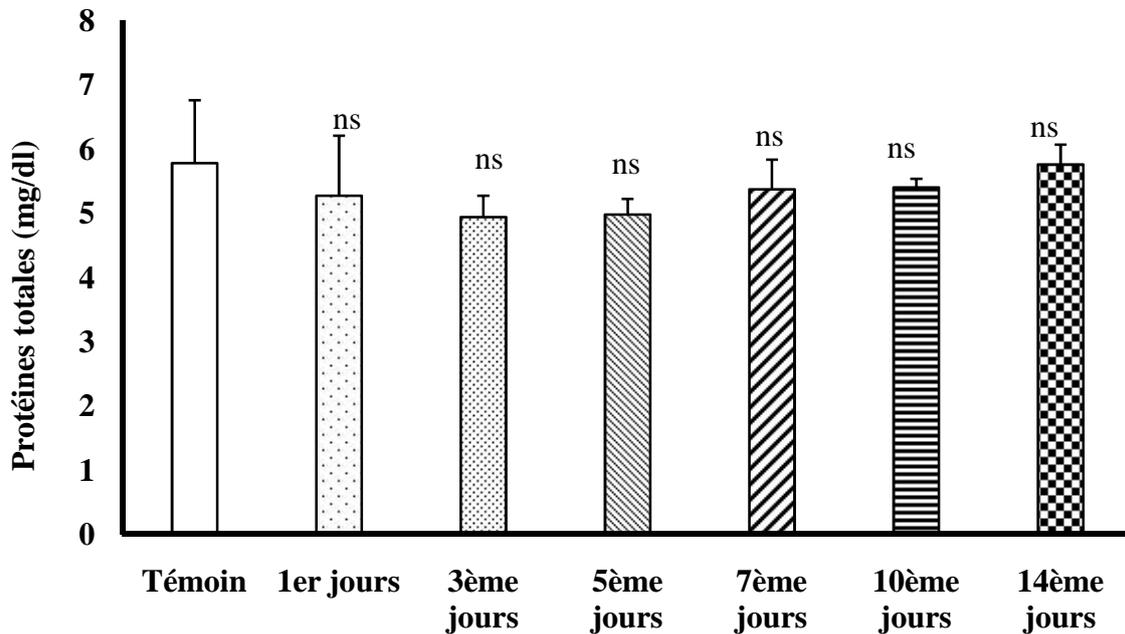
Les résultats des marqueurs de la fonction hépatique AST (GOT) (glutamate-oxaloacétate transaminase), ALT (GPT) (glutamate-pyruvate transaminase), ALP (phosphatase alcaline) et TP (protéines totales) sont présentés dans la figure 18. Les valeurs de l'ALT ont enregistré une augmentation significative de 43.96% en comparaison avec les valeurs des témoins chez le groupe sacrifié après 3 jours de traitement. L'activité de l'AST a présenté une augmentation significative de 38.70% et 63.91% respectivement chez les groupes sacrifiés après 3 et 5 jours du traitement. Une augmentation significative de l'activité de l'ALP est notée chez les groupes sacrifiés après 1, 3, 5, 7 jours de l'administration de l'extrait avec des taux respectifs de 39.83%, 50.35%, 29.65% et 15.18%.

L'activité des trois enzymes se normalise après 14 jours du traitement (**Fig. 23**).



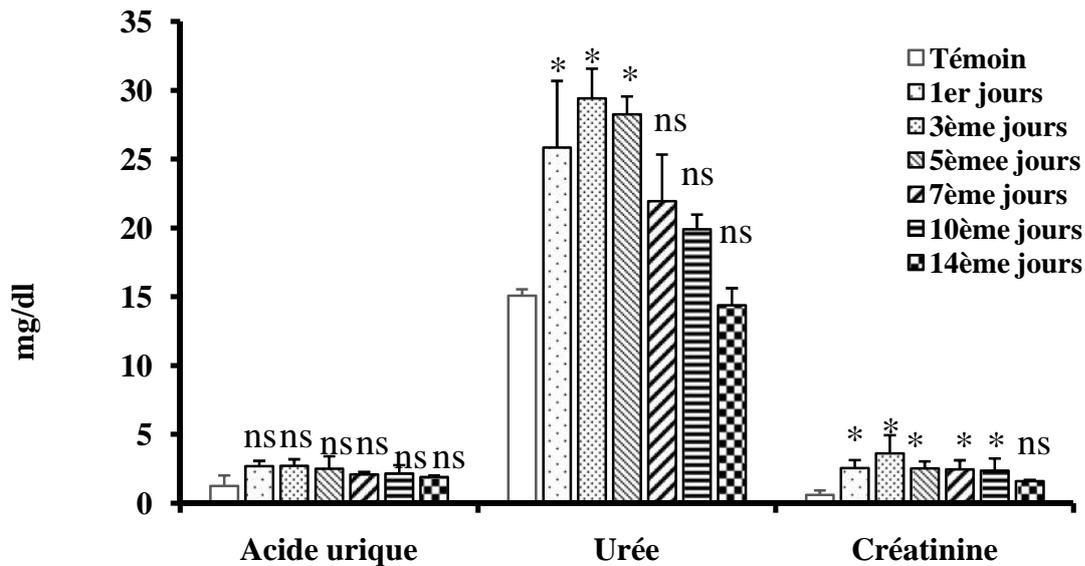
**Fig. 23.** Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur l'activité de l'AST, l'ALT et l'ALP chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM (n=10). Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

Le taux des protéines totales n'a pas connu de changements notables par rapport aux témoins chez les groupes sacrifiés après 3 et 5 jours du traitement (**Fig. 24**).



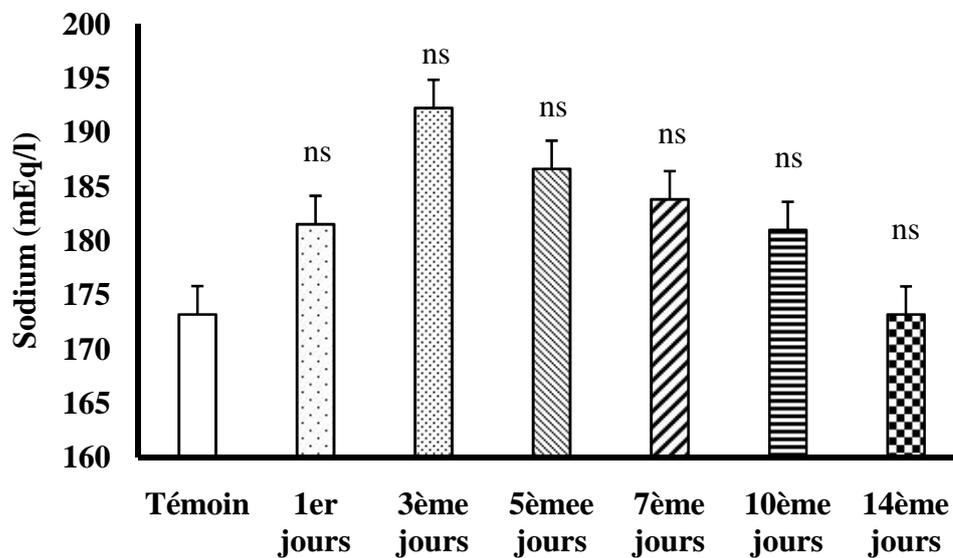
**Fig. 24.** Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux des protéines totales chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM (n=10). Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

Les effets de l'extrait des fruits de la coloquinte sur certains paramètres des fonctions rénales sont présentés sur les **figures 25, 26 et 27**. Le taux d'urée a significativement augmenté chez les groupes sacrifiés après 1, 3, 5 jours de leur traitement (taux d'augmentation de 71.23%, 94.99% et 87.27% respectivement). De même, le taux de créatinine a significativement augmenté jusqu'au dixième jour du traitement. L'acide urique n'a pas enregistré de changement notable.

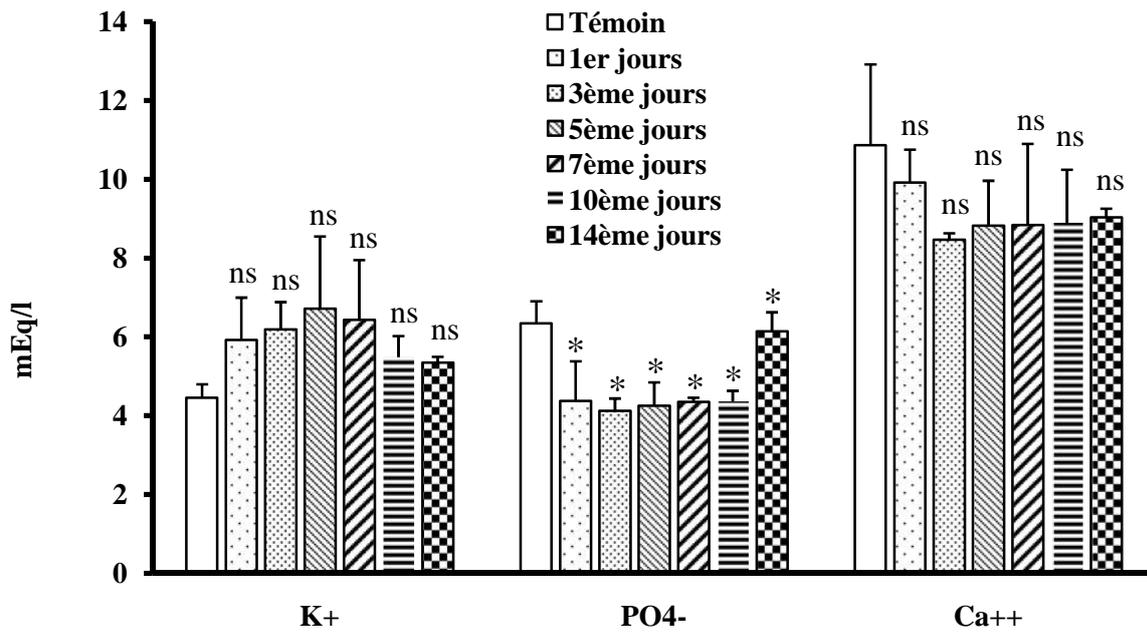


**Fig. 25.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux d'acide urique, d'urée et de créatinine chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM (n=10). Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

Il ressort de la **figure 27** que le phosphore était le seul l'électrolyte qui a présenté une réduction significative de ses niveaux chez l'ensemble des rats traités comparativement avec les valeurs témoins.

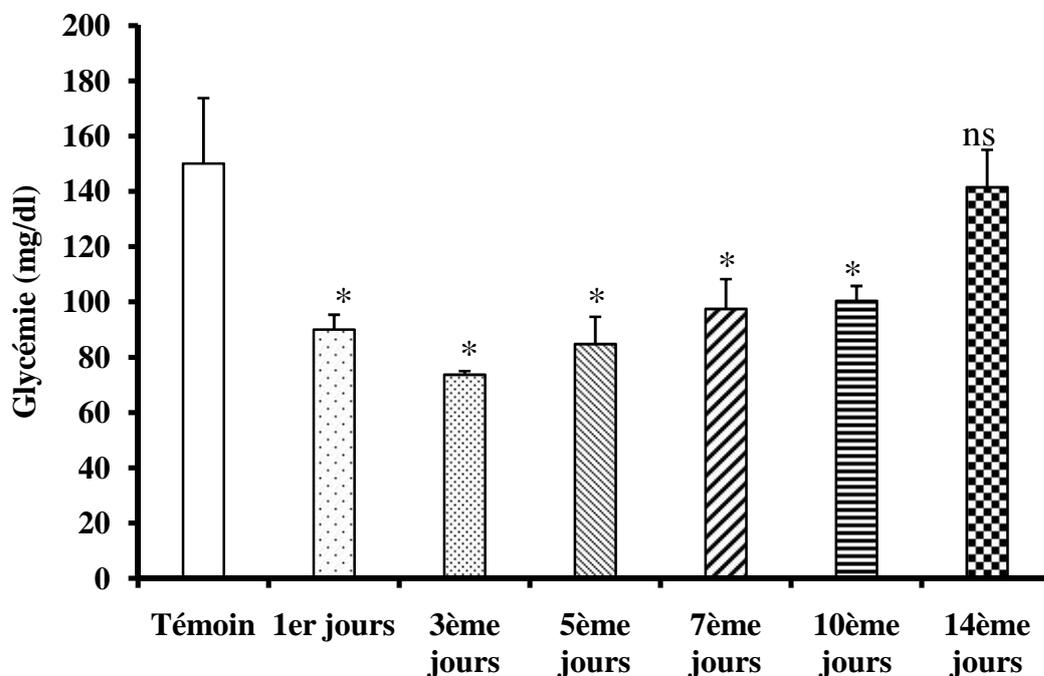


**Fig. 26.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux de sodium chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM (n=10). Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



**Fig. 27.** Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux de potassium, de phosphore et de calcium chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM (n=10). Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

Tous les groupes traités (à l'exception du groupe sacrifié après 14 jours) ont enregistré une réduction significative du taux de glycémie par rapport au témoin (**Fig. 28**).



**Fig. 28.** Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440mg/kg) sur le taux de glucose chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM (n=10). Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

---

---

### III.3.2.3- Etude de quelques paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques des rats traités avec l'extrait du *Citrullus colocynthis* sont présentés dans le **tableau 14**. Les taux des globules rouges, HCT (hématocrite), HGB (hémoglobine) et globules blancs étaient significativement plus faibles chez les groupes traités par rapport au groupe témoin. Les valeurs de la plupart des paramètres hématologiques se normalisent au 14<sup>ème</sup> jour.

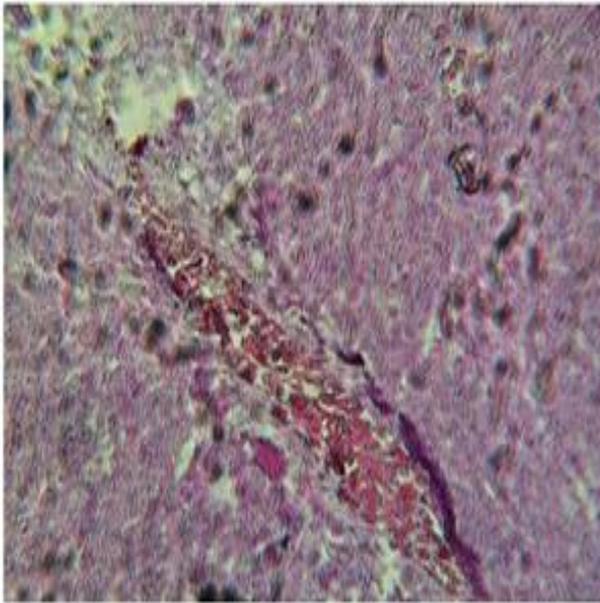
**Tableau 14:** Les changements des paramètres hématologiques enregistrés chez des rats males Albino Wistar traités par voie orale avec une dose de 440 mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits du *C. colocynthis*

Paramètre Groupe	Témoin	Groupe 1 jour	Groupe 3 jours	Groupe 5 jours	Groupe 7 jours	Groupe 10 jours	Groupe 14 jours
Erythrocyte (GR, 10 <sup>12</sup> /L)	8,703±0,112	7,881±0,348*	7,619±0,069*	7,665±0,095*	7,993±0,172*	8,301±0,132*	8,416±0,075*
Hémoglobine (g/dl)	14,818±0,344	12,863± 0,240*	11,250± 0,378*	12,171± 0,261*	12,535± 0,197*	13,038± 0,309*	13,825± 0,207 <sup>ns</sup>
Hématocrite (%)	47,700±0,803	43,313±1,711*	41,975± 0,515*	42,271± 0,662*	42,513± 1,009*	43,388± 0,436*	45,713± 0,505*
VGM (µm <sup>3</sup> )	56,138±1,045	51,438± 0,713*	41,963± 0,851*	52,125± 0,578*	52,475± 0,678*	54,125± 0,767 <sup>ns</sup>	55,1± 0,798 <sup>ns</sup>
TCMH (pg)	17,450±0,276	17,275± 0,264*	17,163± 0,115*	17,343± 0,251*	16,674± 0,356*	17,775± 0,281*	18,888± 0,418*
CCMH (g/dl)	36,038±0,480	33,563± 0,668*	30,55± 0,351*	31,375± 0,730*	31,00± 0,477*	33,391± 0,408*	35,20± 0,140 <sup>ns</sup>
Leucocyte (GB, 10 <sup>9</sup> /L)	11,315±0,588	9,363± 0,729*	8,258± 0,060*	8,50± 0,274*	8,604± 0,242*	9,729± 0,244*	9,893± 0,243*
PLT (µm <sup>3</sup> )	818,00±11,759	669,00± 66,311*	593,50± 41,386*	697,875± 17,898*	45,625± 17,274*	762,125±13,571*	780,909± 14,780*

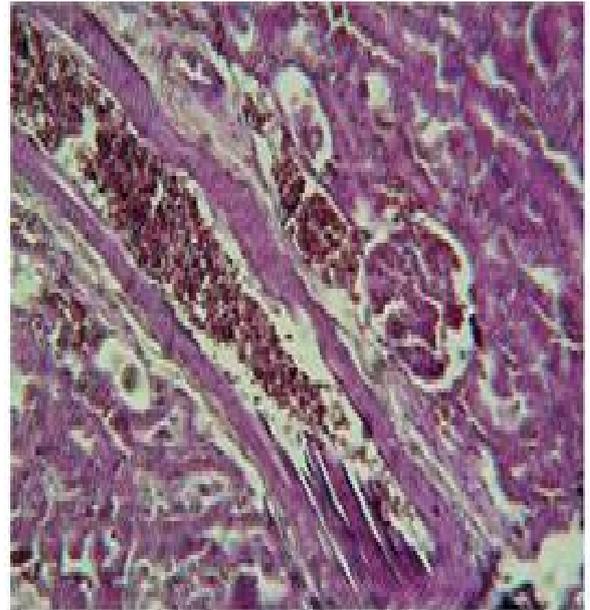
Les valeurs sont la Moyenne ±SEM (n=10). Comparaison par rapport au témoin. \* : P≤ 0,05, ns : P> 0,05.

### III.3.2.4- Etude histologique

L'examen histologique du foie des rats du groupe sacrifié après 24 heures (**Fig. 29, 30**) a révélé un parenchyme hépatique traversé par des vaisseaux sanguins congestifs et un parenchyme rénal présentant un aspect congestif. Le parenchyme rénal devient discrètement congestif chez le groupe sacrifié après 5 jours (**Fig. 31, 32**). La congestion disparaît complètement après 14 jours de traitement au niveau du foie et des reins (**Fig. 33, 34**). Le groupe témoin a présenté un parenchyme hépatique avec une architecture préservée fait de rayons radiaux de Remack convergeant vers une veine centrale et un parenchyme rénal avec une architecture conservée (**Fig. 35 et 36**). Aucun des rats traités n'a eu de lésions cardiaques ou spléniques.



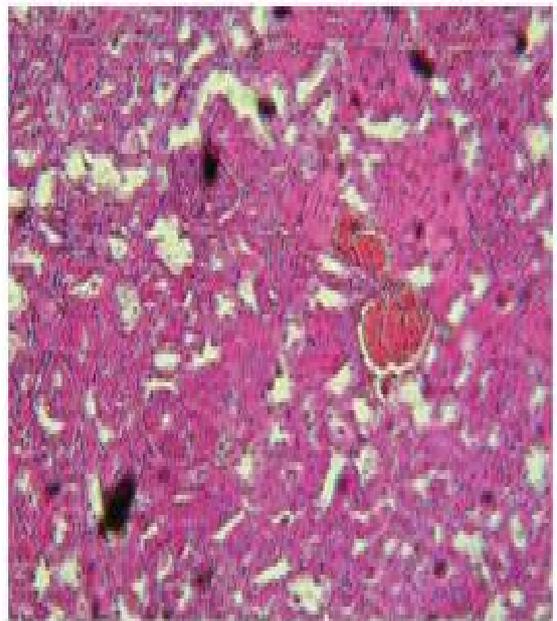
**Fig. 29.** Parenchyme hépatique traversé par des vaisseaux sanguins congestifs après une journée de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).



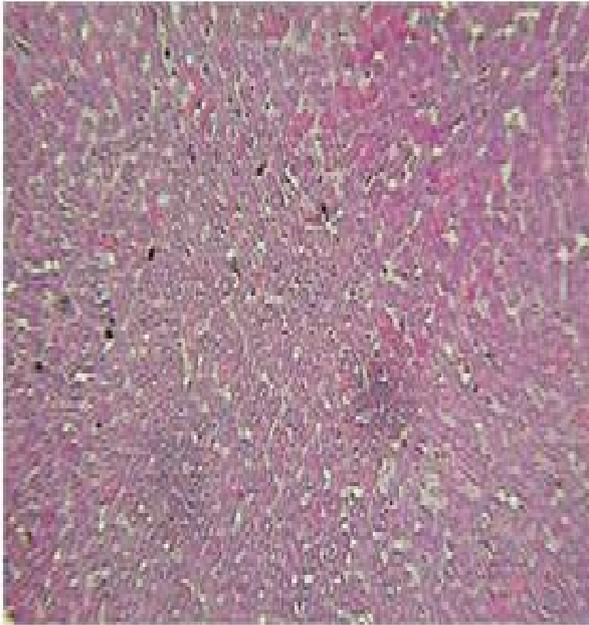
**Fig. 30.** Parenchyme rénal congestif après une journée de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).



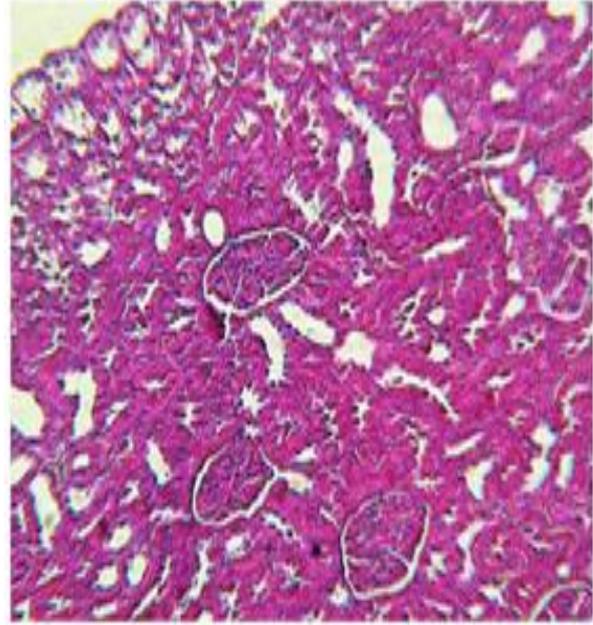
**Fig. 31.** Coupe histologique du foie de rat males après 5 jours de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (440 mg/kg) présentant un parenchyme hépatique avec une architecture discrètement congestive. H&E ( $\times 40$ ).



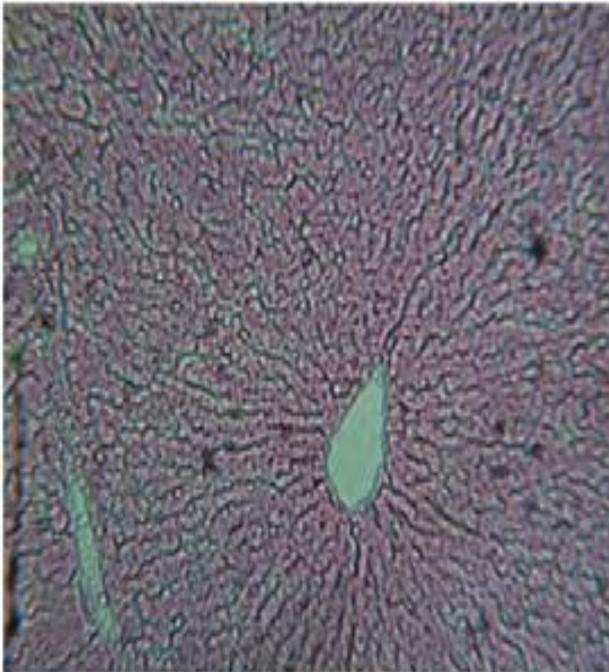
**Fig. 32.** Parenchyme rénal avec une architecture discrètement congestive après 5 jours de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).



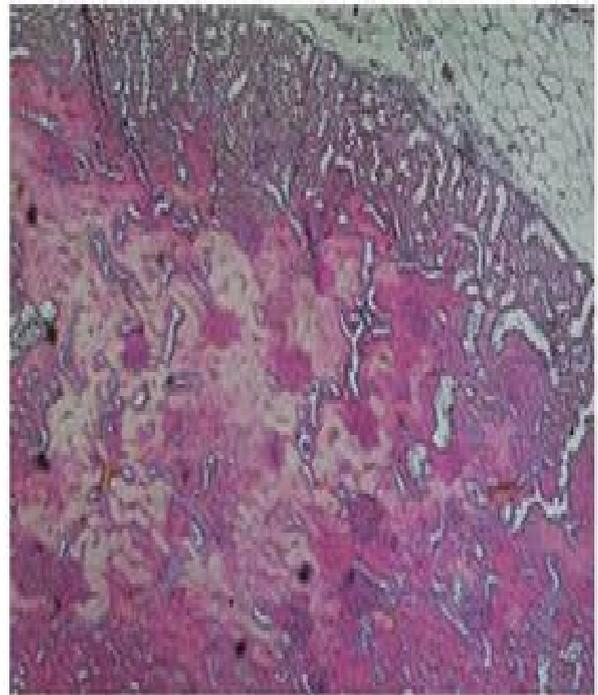
**Fig. 33.** Parenchyme hépatique sans aucune particularité après 14 jours de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).



**Fig. 34.** Parenchyme rénal normal après 14 jours de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT aux rats males (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).



**Fig. 35.** Morphologie préservée du foie des rats témoins avec absence de toute congestion. H&E ( $\times 100$ ).



**Fig. 36.** Des reins normaux sans aucune congestion chez les rats témoins. H&E ( $\times 100$ ).

### III.3.3- Toxicité subaiguë chez les rats mâles

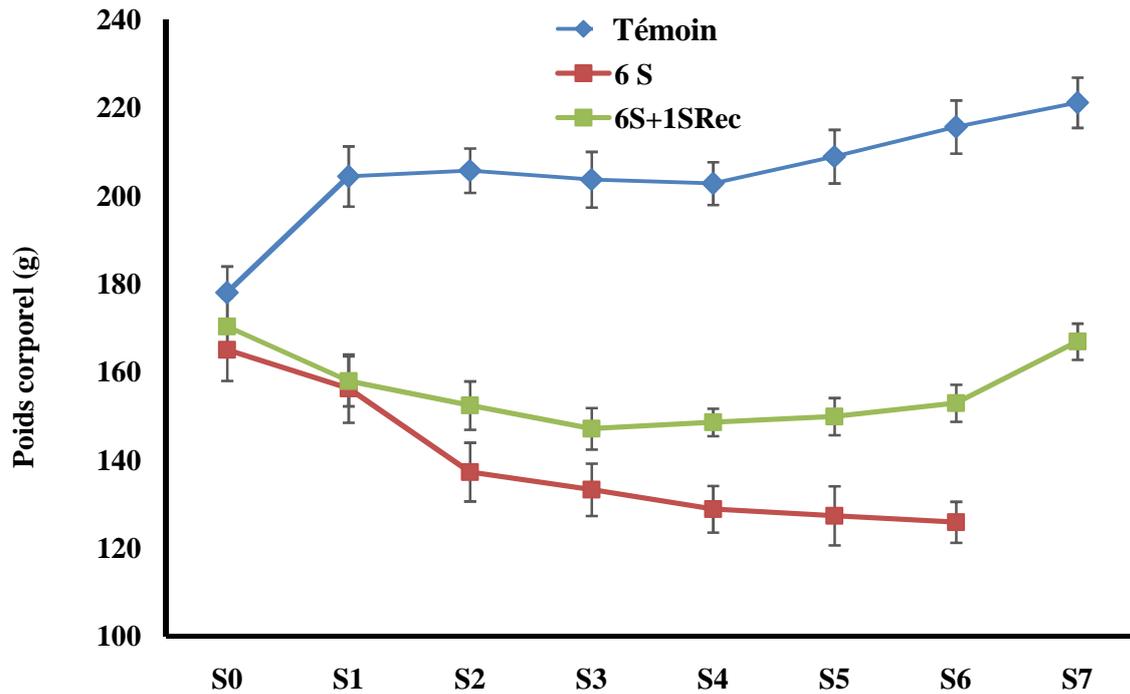
#### III.3.3.1- Evolution du poids corporel, de la prise alimentaire et des masses relatives des organes des rats males

Au cours de l'étude de la toxicité subaiguë, certains changements dans le comportement général et les activités physiologiques des animaux tels que: la diarrhée, l'hypoactivité, poils hérissés, manque d'appétit, le regroupement des animaux dans une extrémité de la cage ont été observés chez les animaux traités par voie orale avec l'extrait des fruits de CCT à une dose de 265 mg/kg (1/5 DL<sub>50</sub>) pendant six semaines. Cependant, le traitement des rats avec cet extrait n'a pas induit de mortalité pendant toute la durée de l'étude.

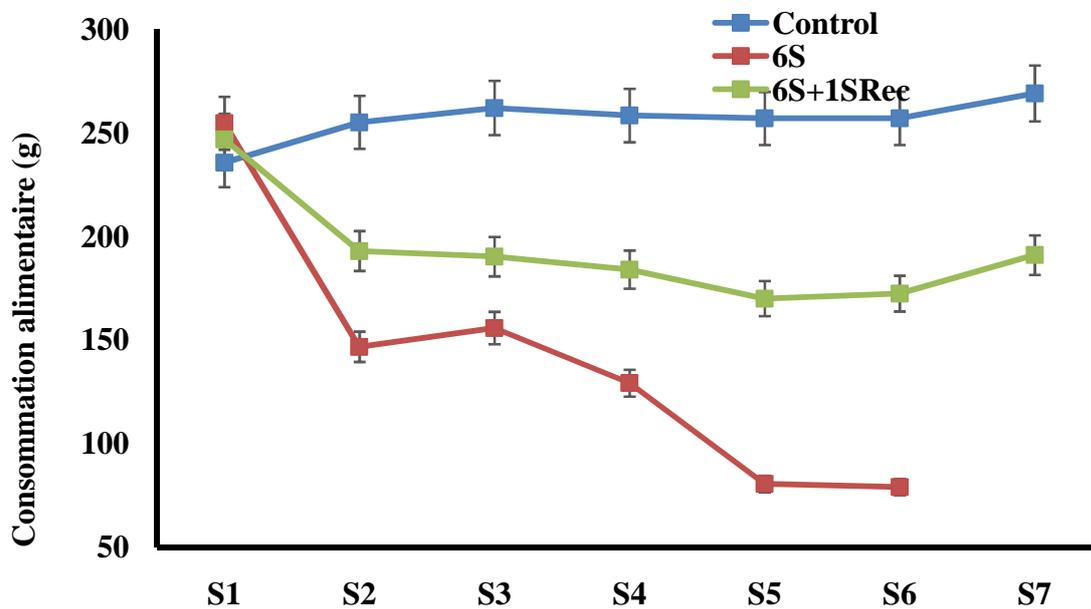
La **figure 37** présente l'évolution du poids corporel des animaux traités par l'extrait de CCT pendant six semaines. Le traitement s'est traduit par une réduction significative du poids corporel final des animaux par rapport au poids initial. Cette diminution était de l'ordre de 5.31% à la première semaine et de 29.25% à la dernière semaine du traitement. Les animaux témoins ont enregistré une augmentation de leur poids corporel entre 14.84% et 24.25% depuis la première jusqu'à la dernière semaine. Après une semaine de récupération, les animaux de ce groupe ont enregistré un retour au poids initial.

Parallèlement, la diminution du poids corporel était accompagnée d'une diminution de la prise alimentaire allant de 42.36% à la première semaine jusqu'à 68.97% à la dernière semaine du traitement. Cette diminution était moins importante pour le deuxième groupe qui est laissé sans traitement pendant une semaine (période de récupération) (**Fig. 38**).

Après six semaines de l'administration journalière de l'extrait de la plante, les animaux ont présenté une diminution significative de la masse relative du foie (37.54%), des reins (21.95%), des poumons et du cœur par rapport au groupe témoin (**tableau 15**). Chez le groupe traité par l'extrait pendant six semaines suivi d'une période de récupération d'une semaine, une réduction a été notée sur la masse relative du foie (18.49%), du cerveau, des reins (12.19%), des testicules, du cœur et de la rate mais elle était significativement différente pour les poumons.



**Fig. 37.** Effet de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265 mg/kg) pendant six semaines sur le poids corporel des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



**Fig. 38.** Effet de l'administration par voie orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265 mg/kg) pendant six semaines sur la consommation alimentaire chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

**Tableau 15:** Masse relative des organes de rats mâles Albino Wistar traités par voie orale avec une dose de 265 mg/Kg de l'extrait méthanolique des fruits du *C. colocynthis*.

<i>Organe/ Groupe</i>	<i>Témoin</i>	<i>Groupe 6S</i>	<i>Groupe 6Set 1S de réc.</i>
<b>Foie</b>	0,0546 ± 0,0044	0,0341±0,0021*	0,0445±0,0046 <sup>ns</sup>
<b>Reins</b>	0,0082±0,0002	0,0064±0,0003*	0,0072±0,0007 <sup>ns</sup>
<b>Cerveau</b>	0,0081±0,0005	0,0081±0,0004 <sup>ns</sup>	0,0083±0,0005 <sup>ns</sup>
<b>Testicules</b>	0,0146±0,0006	0,0118±0,0012 <sup>ns</sup>	0,0136±0,0009 <sup>ns</sup>
<b>Poumons</b>	0,0083±0,0005	0,0065±0,0004*	0,0065±0,0006*
<b>Cœur</b>	0,0038±0,0002	0,0030±0,0002*	0,0031±0,0003 <sup>ns</sup>
<b>Rate</b>	0,0029±0,0001	0,0024±0,0003 <sup>ns</sup>	0,0027±0,0005 <sup>ns</sup>

Les valeurs sont la Moyenne ±SEM. Comparaison par rapport au témoin.

\* : P ≤ 0,05, ns : P > 0,05.

### III.3.3.2- Etude de quelques paramètres hématologiques

Les valeurs de la plupart des paramètres hématologiques des rats traités pendant six semaines étaient significativement différentes de celles du groupe témoin (**Tableau 16**). Les valeurs de globules rouges (GR), HGB, HCT et PLT du groupe témoin étaient significativement plus élevées que celles du groupe traité.

**Tableau 16:** Les changements hématologiques enregistrés chez des rats males Albino Wistar traités par voie orale avec une dose de 265 mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis*.

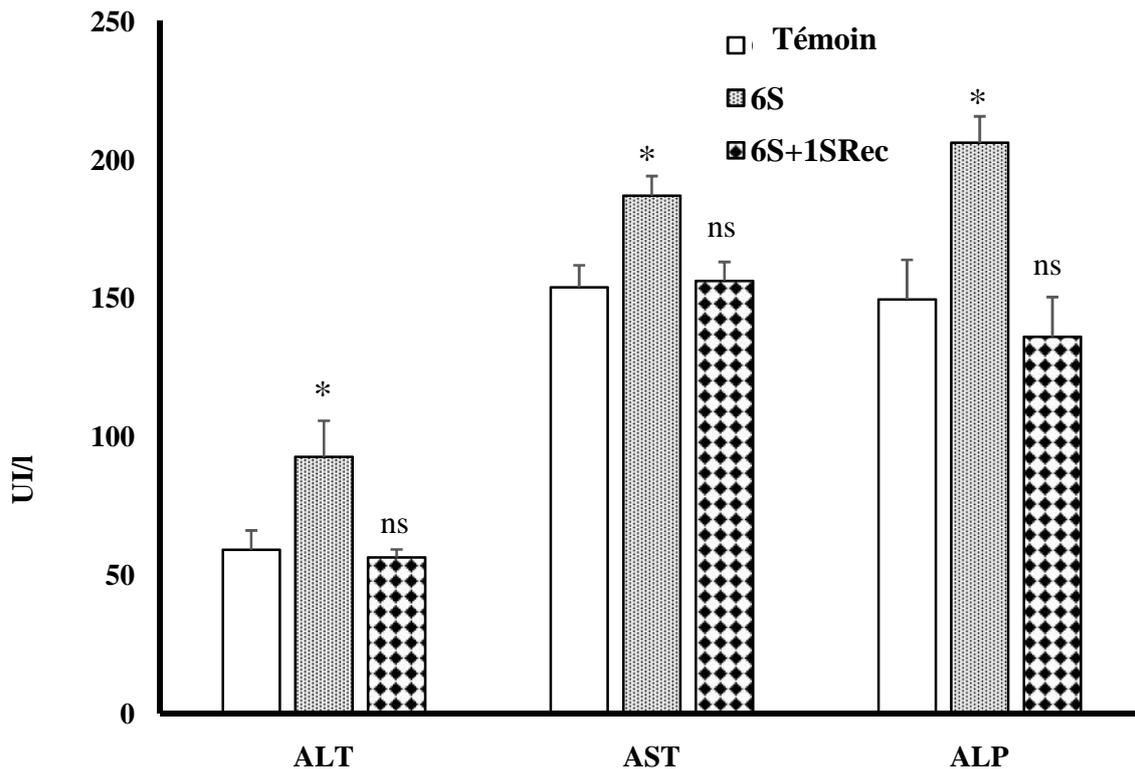
<b>Paramètre Groupe</b>	<i>Témoin</i>	<i>Groupe traité pendant 6S</i>	<i>Groupe traité pendant 6S et 1S de récupération</i>
<b>Erythrocyte (GR, 10<sup>12</sup>/L)</b>	10,514±0,132	8,509±0,164*	9,926±0,225 <sup>ns</sup>
<b>Hémoglobine(g/dl)</b>	16,700±0,327	15,225±0,158*	15,975±0,173 <sup>ns</sup>
<b>Hématocrite (%)</b>	56,521±0,691	45,65±0,909*	54,850±1,511 <sup>ns</sup>
<b>VGM(μm<sup>3</sup>)</b>	56,317±1,079	52,925±0,212*	55,35±0,83 <sup>ns</sup>
<b>TCMH(pg)</b>	15,500±0,152	18,686±0,237*	18,863±0,166*
<b>CCMH(g/dl)</b>	28,743±0,306	34,45±0,262*	29,550±0,620 <sup>ns</sup>
<b>Leucocyte(GB, 10<sup>9</sup>/L)</b>	11,750±0,193	8,450±0,856*	11,688±0,462 <sup>ns</sup>
<b>PLT(μm<sup>3</sup>)</b>	632,429±22,104	537,143±25,544*	666,375±52,832 <sup>ns</sup>

Les valeurs sont la Moyenne ±SEM. Comparaison par rapport au témoin.

\* : P ≤ 0,05, ns : P > 0,05.

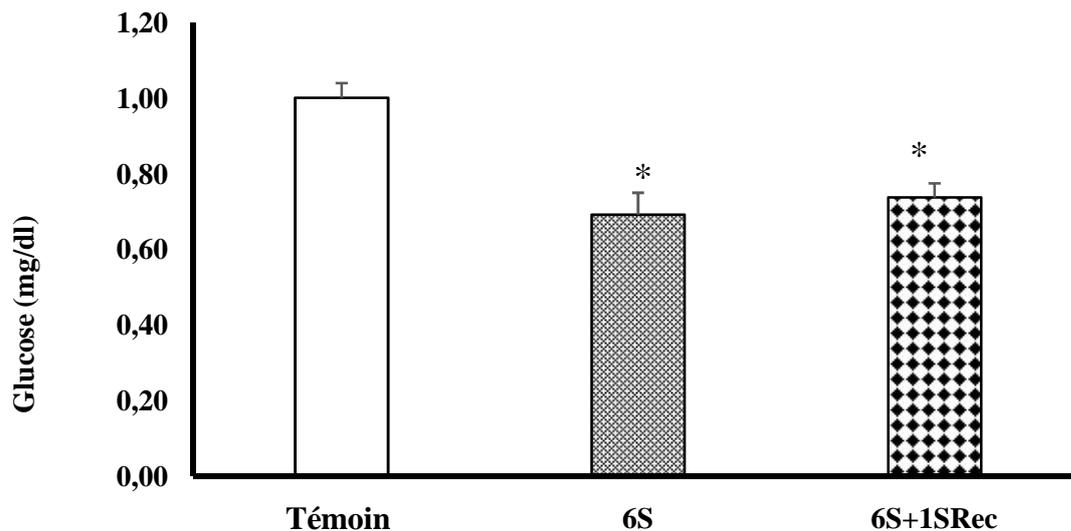
### III.3.3.3- Etude des paramètres Biochimiques

L'évaluation des différentes activités enzymatiques dans le cas de la toxicité sub-aiguë a révélé des différences significatives. Les taux de GOT (21.47%), GPT (56.57%) et ALP (37.84%) ont enregistré une élévation significative par rapport au témoin (**Fig. 39**). Cependant, les activités des mêmes enzymes ont enregistré une légère augmentation après une période de récupération d'une semaine qui a suivie les six semaines de traitement avec l'extrait de fruit de CCT.



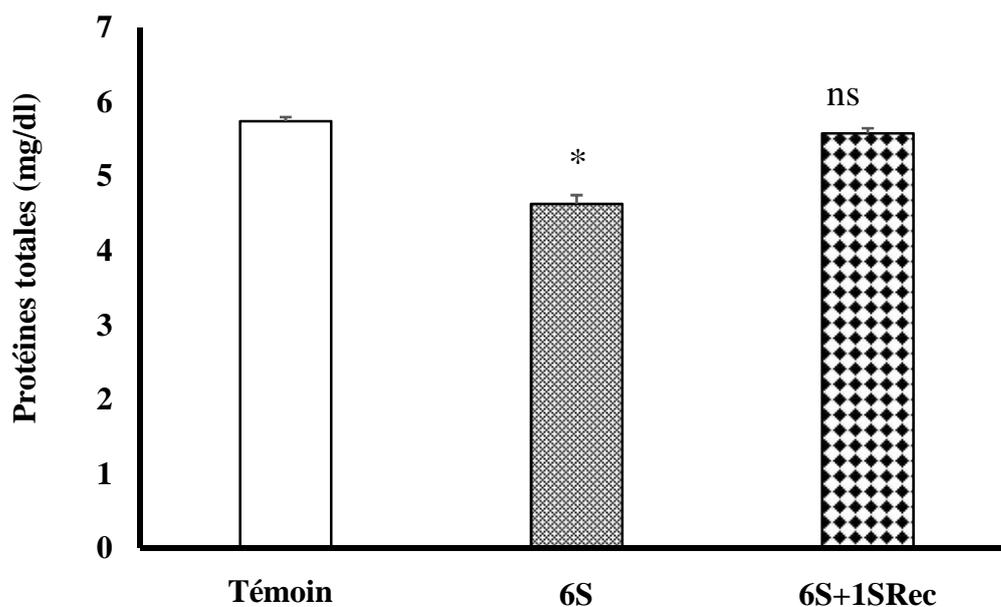
**Fig. 39.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur l'activité des enzymes ALT, AST et ALP chez des rats mâles. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

Ces changements ont été accompagnés d'une diminution significative du taux de glucose (26.27%) et des niveaux de protéines totales (19.39%) par rapport au groupe témoin (**Fig. 40 et 41**).



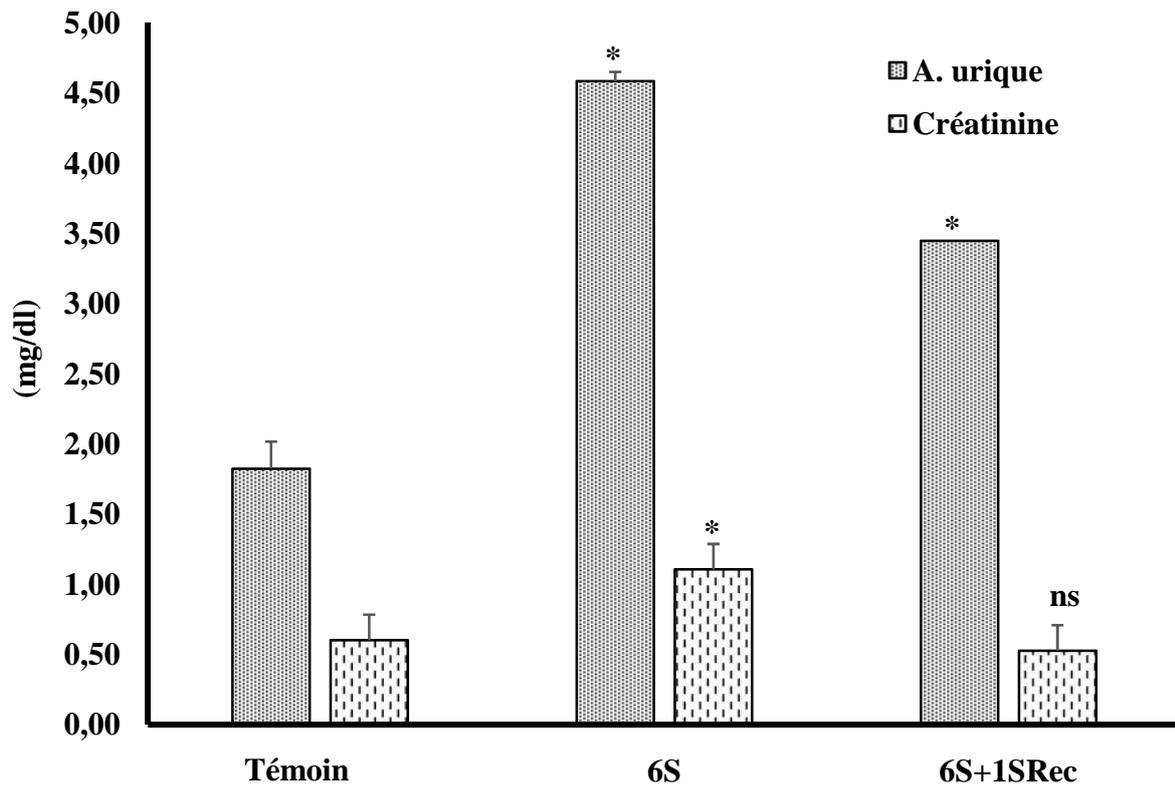
**Fig. 40.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur la glycémie des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM.

Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$  ; ns :  $P > 0,05$ .

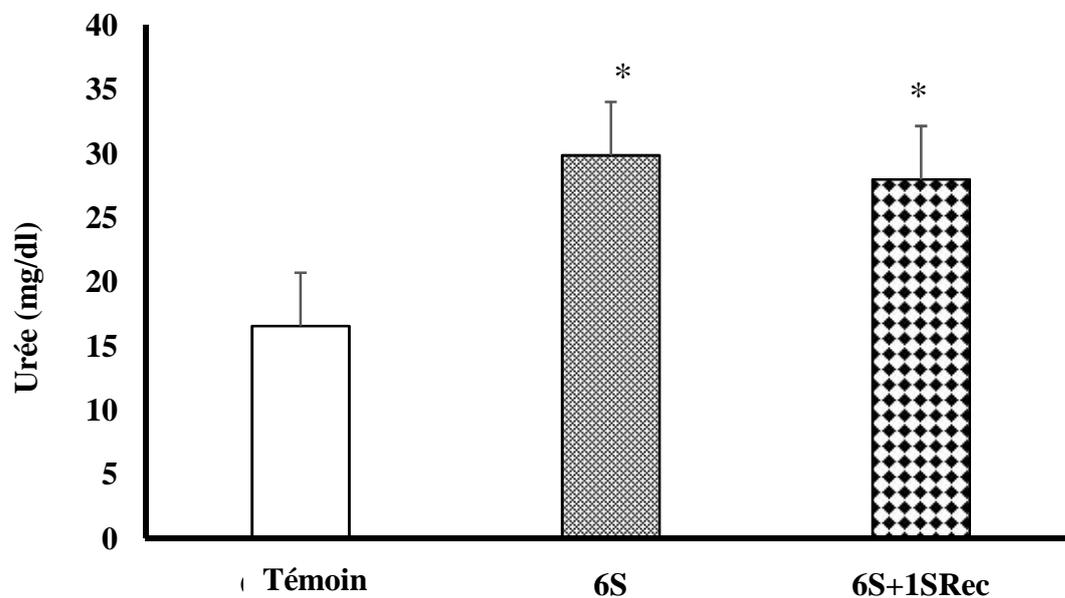


**Fig. 41.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le taux des protéines totales des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

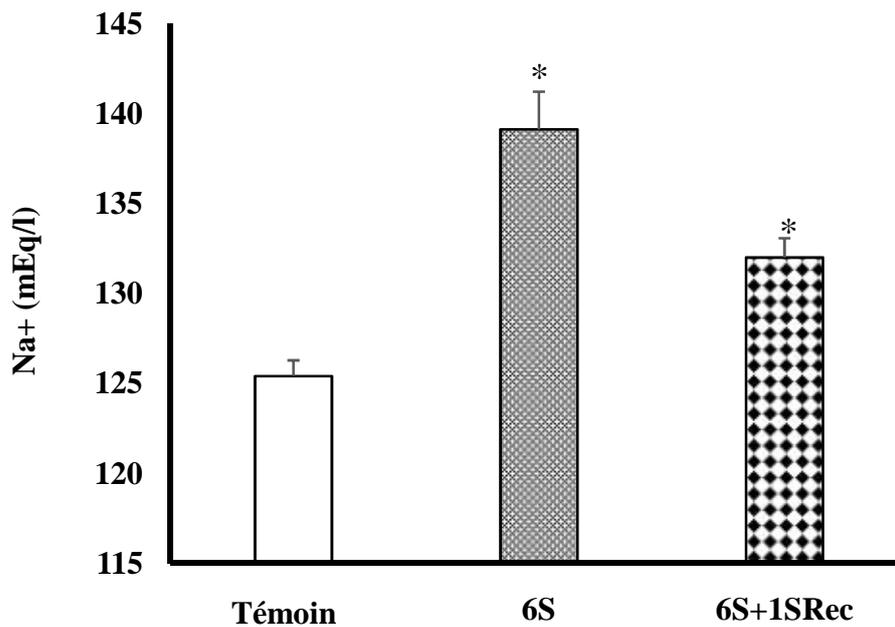
Les valeurs des paramètres de la fonction rénale : urée (80.28%), acide urique (151.39%), créatinine (83.416%),  $\text{Na}^+$  (10.93%),  $\text{K}^+$  (48.89%) ont connu une élévation significative chez le premier groupe et une réduction significative des taux de  $\text{PO}_4^-$  (26.29%) et de  $\text{Ca}^{+2}$  (20.10%) (**Fig. 42, 43, 44 et 45**).



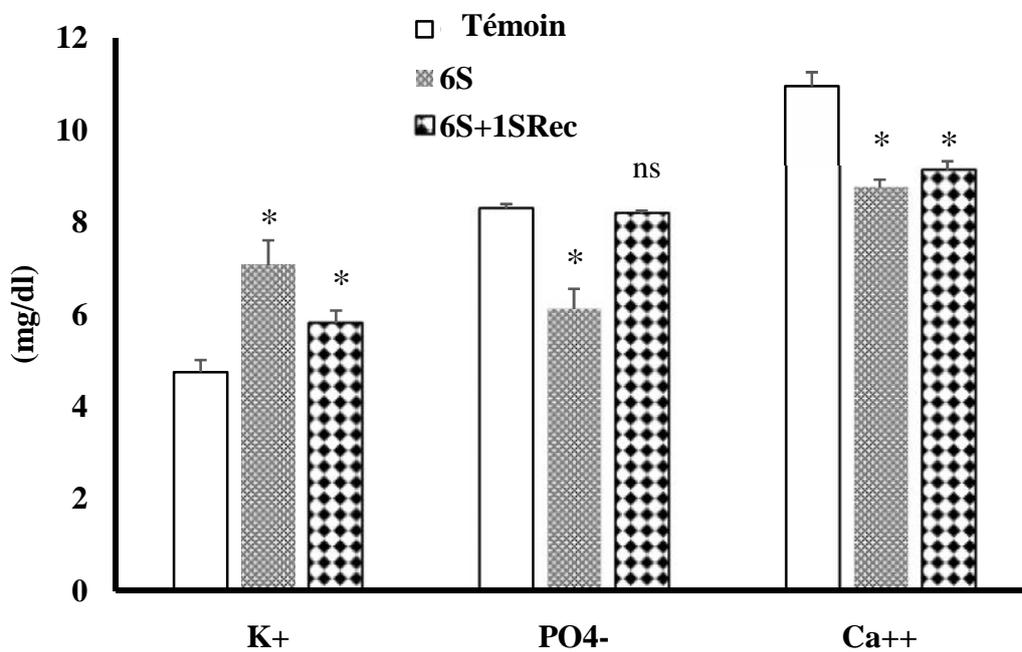
**Fig. 42.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le taux d'urée et de créatinine des rats males. . Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



**Fig. 43.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le taux d'urée chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



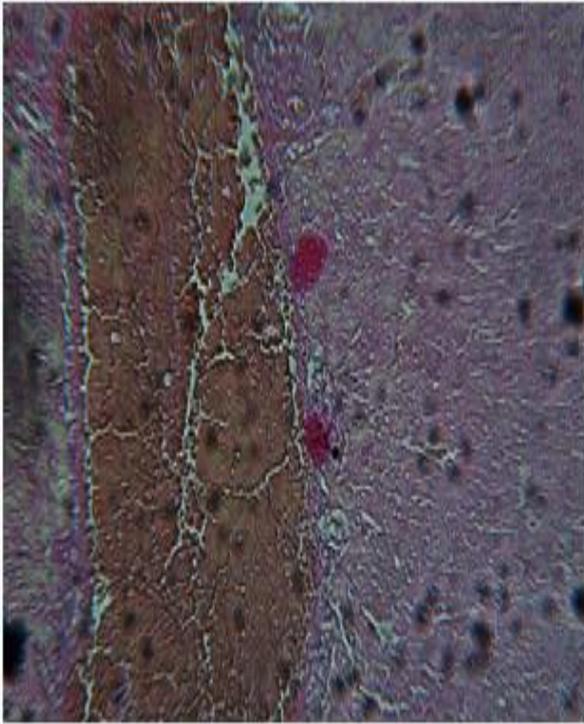
**Fig. 44.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le niveau de sodium chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



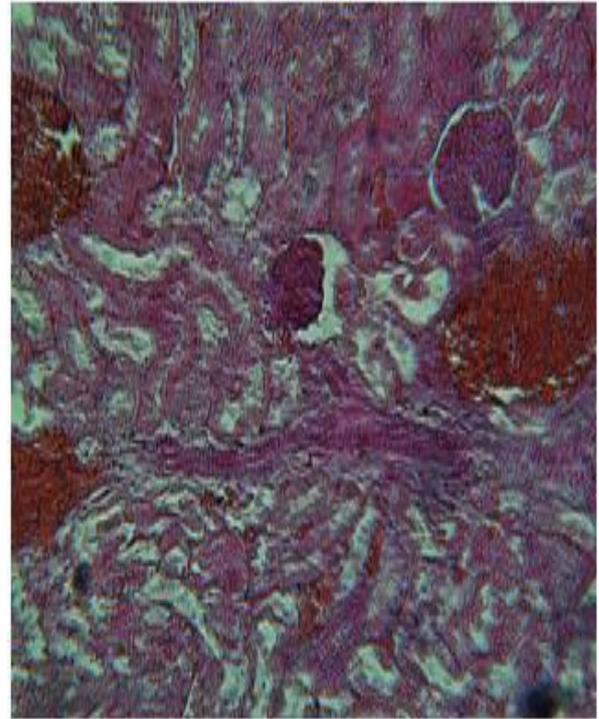
**Fig. 45.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines sur le taux de K<sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-</sup> et Ca<sup>++</sup> chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

#### III.3.3.4- Etude histologique

L'examen macroscopique des organes après dissection n'a pas permis d'observer d'anomalies morphologiques chez les deux groupes d'animaux traités par rapport aux rats témoins. Sous l'examen microscopique, le groupe traité pendant six semaines a montré un foie et des reins présentant une importante congestion avec une architecture conservée (**Fig. 46 et 47**). Les animaux du groupe traité pendant six semaines suivi d'une période de récupération d'une semaine a montré un foie présentant une légère congestion avec conservation de son architecture et un parenchyme rénal fait de tubules et de glomérules réguliers, parcouru par des vaisseaux sanguins présentant une légère congestion (**Fig. 48 et 49**) comparativement au foie et reins des animaux témoins (**Fig. 50 et 51**).



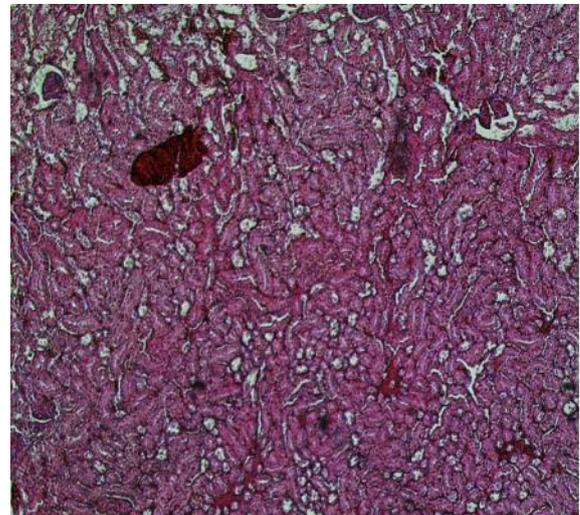
**Fig. 46.** Foie congestive avec architecture préservée chez des rats males après administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines. H&E ( $\times 100$ ).



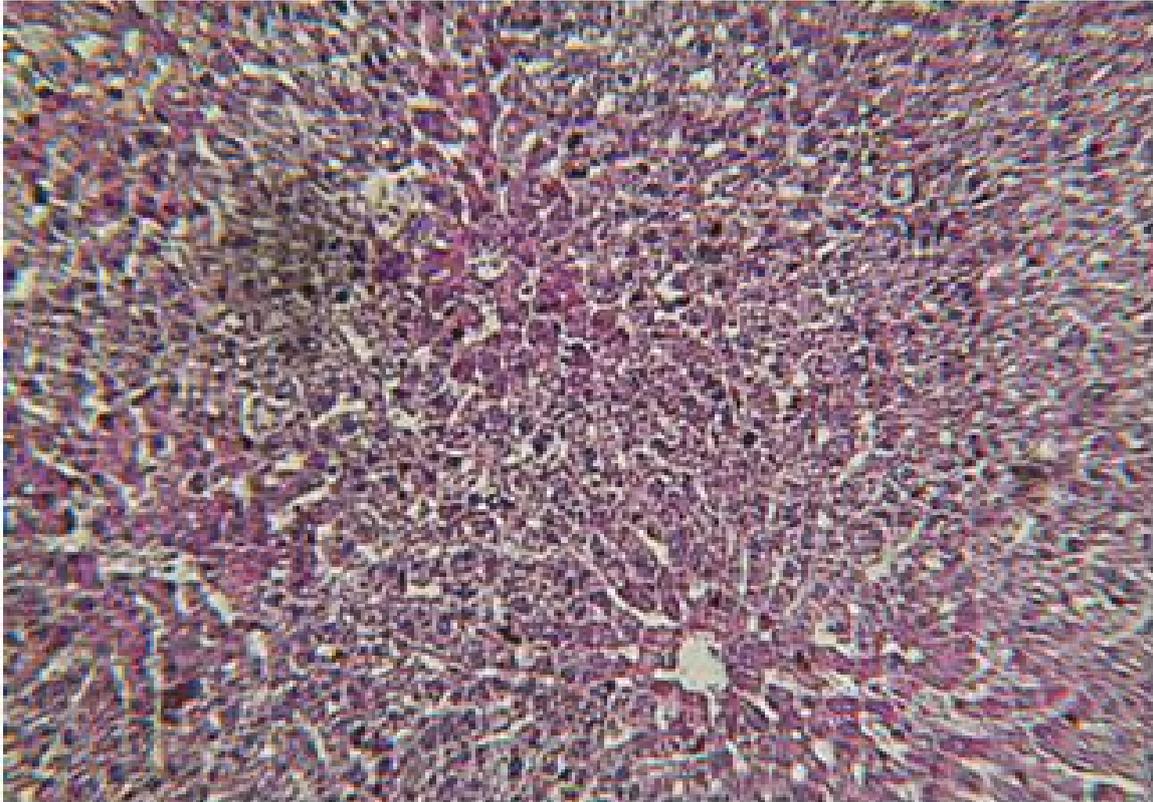
**Fig. 47.** Reins congestifs des rats males après administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines. H&E ( $\times 400$ ).



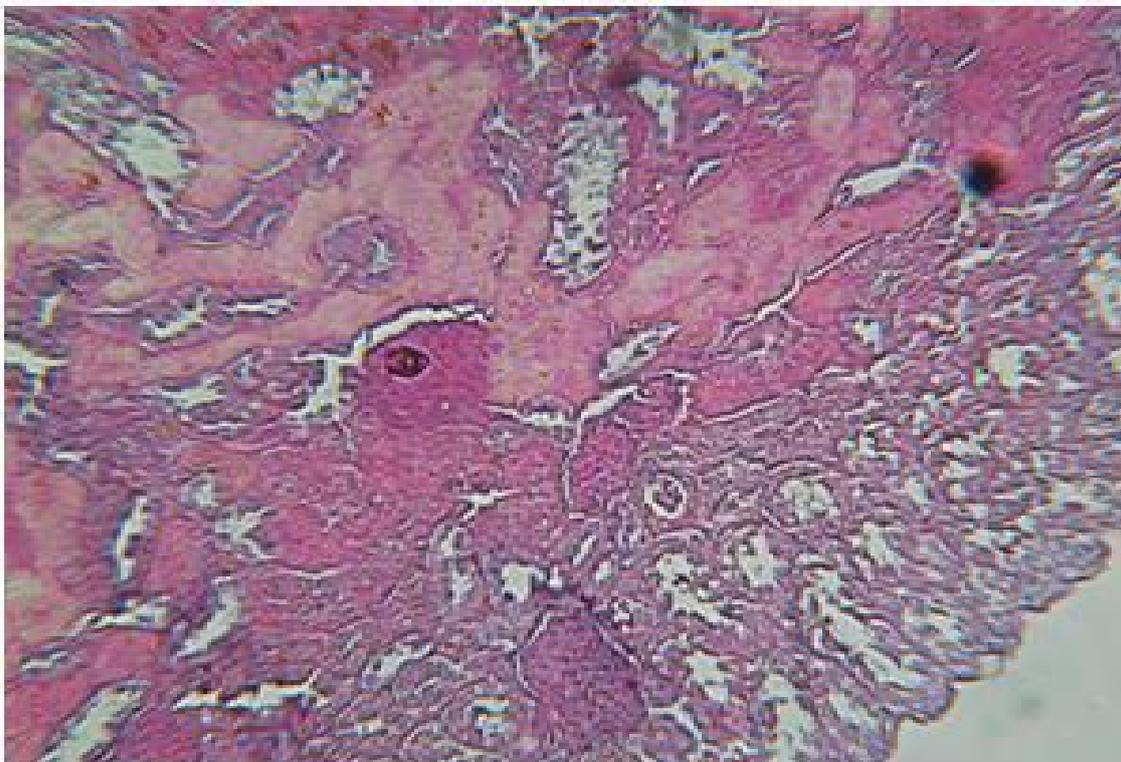
**Fig. 48.** Foie présentant une légère congestion avec conservation de l'architecture chez des rats males après administration orale de l'extrait méthanolique des fruits du CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines suivie d'une semaine de récupération. H&E ( $\times 100$ ).



**Fig. 49.** Parenchyme rénal fait de tubes et de glomérules réguliers, parcouru par des vaisseaux sanguins présentant une légère congestion chez des rats males après administration orale de l'extrait méthanolique des fruits du CCT avec une dose de 265 mg/kg pendant six semaines suivie d'une semaine de récupération. H&E ( $\times 100$ ).



**Fig. 50.** Parenchyme hépatique avec une architecture préservée fait de travées radial de Remack convergeant vers la veine centrale chez les rats témoins. H&E ( $\times 100$ ).

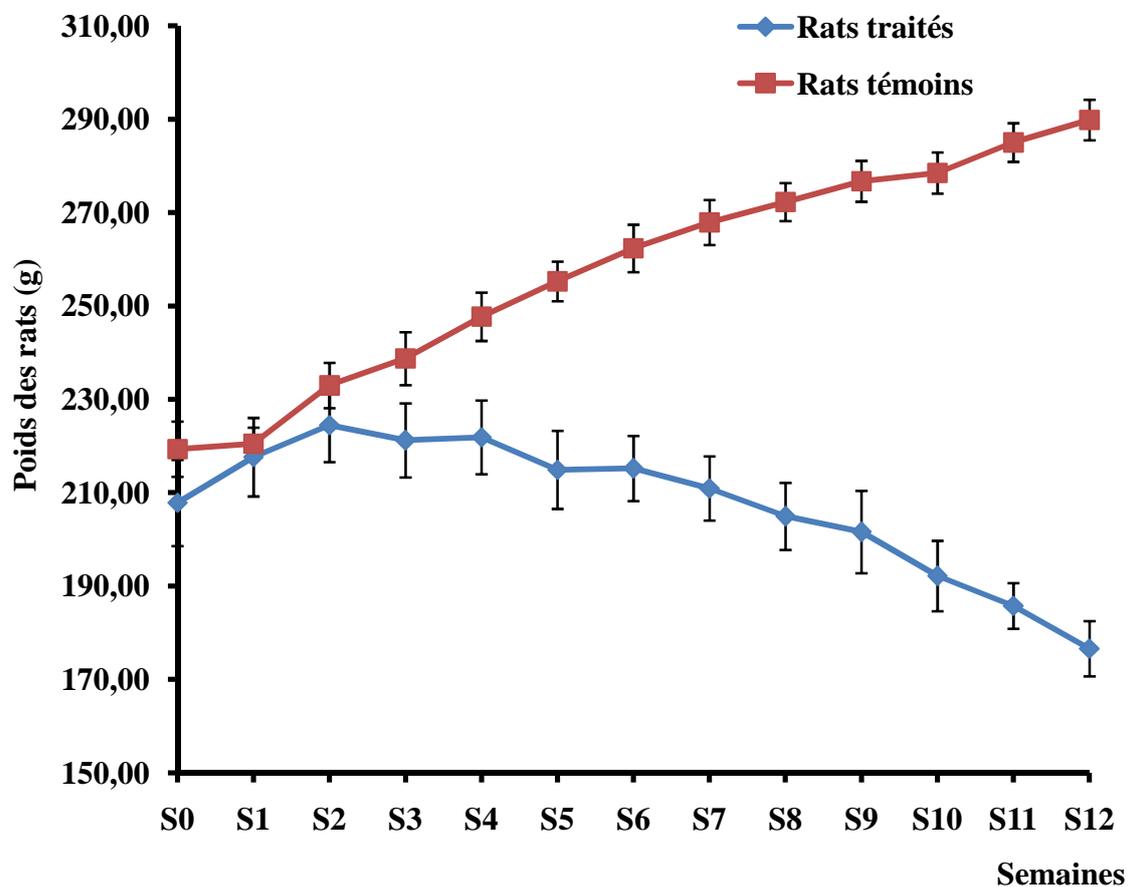


**Fig. 51.** Parenchyme rénal fait de tubules et glomérules réguliers chez les rats témoins. H&E ( $\times 100$ ).

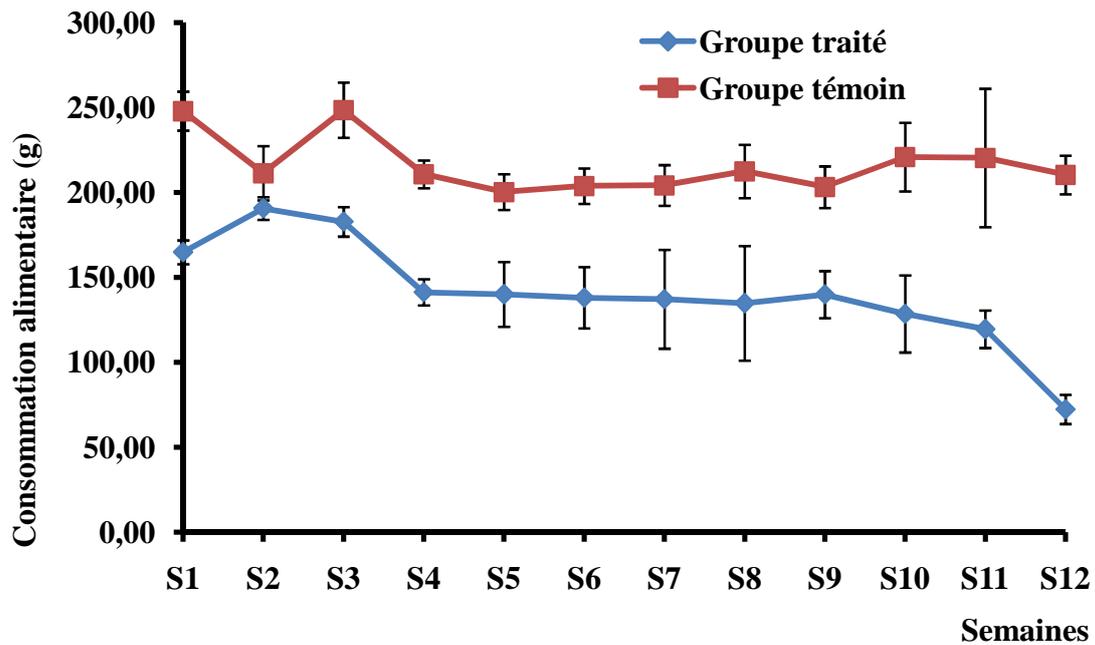
### III.3.4. Toxicité subchronique chez les rats mâles

#### III.3.4.1- Evolution du Poids corporel, de la prise alimentaire et de la masse relative des organes des rats mâles

Dans l'étude de toxicité sub-chronique, l'extrait administré par voie orale pendant 90 jours, n'a pas produit de mortalité chez les animaux pendant la période expérimentale, cependant, la diarrhée et l'hypoactivité ont été observées. Des réductions significatives du poids corporel des rats traités ont été observées et qui étaient de l'ordre de 9.92%, 3.23% et 10.95% au cours du premier, du deuxième et du troisième mois du traitement respectivement (**Fig. 52**). La consommation alimentaire a également enregistré une réduction significative chez les animaux traités (**Fig. 53**).



**Fig. 52.** Effet de l'administration orale l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis* (131 mg/kg) pendant trois mois sur le poids corporel des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$  ; ns :  $P > 0,05$ .



**Fig. 53.** Effet de l'administration orale l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis* (131 mg/kg) pendant trois mois sur la prise alimentaire des rats mâles. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$  ; ns :  $P > 0,05$ .

La masse relative des organes des rats traités étaient différents de ceux du groupe témoin. La masse relative du foie, des reins et des testicules était significativement inférieure à celle des organes du groupe témoin avec des taux de réductions de 31.61%, 14.51% et 13.93% respectivement (**Tableau 17**).

**Tableau 17:** Masse relative des organes de rats mâles traités par voie orale avec une dose de 131mg/kg de l'extrait méthanolique des fruits de *Citrullus colocynthis* pendant trois mois.

Groupe Organe	Témoin	Groupe Traité (3 mois)
Foie	0,0427 $\pm$ 0,0014	0,0292 $\pm$ 0,0008*
Reins	0,0062 $\pm$ 0,0001	0,0053 $\pm$ 0,0003*
Cerveau	0,0066 $\pm$ 0,0002	0,0064 $\pm$ 0,0002 <sup>ns</sup>
Testicules	0,0122 $\pm$ 0,0002	0,0105 $\pm$ 0,0005*
Poumons	0,0063 $\pm$ 0,0003	0,0063 $\pm$ 0,0004 <sup>ns</sup>
Cœur	0,0030 $\pm$ 0,0001	0,0028 $\pm$ 0,0001 <sup>ns</sup>
Rate	0,0024 $\pm$ 0,0001	0,0025 $\pm$ 0,0001 <sup>ns</sup>

Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin.  
\* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

### III.3.4.2- Etude de quelques paramètres hématologiques

L'analyse du profil hématologique a révélé une diminution significative du nombre de globules rouges (16.29%), du nombre de globules blancs (15.51%) et du contenu en HCT (16.97%) et en HGB (6.51%) chez les animaux traités comparativement aux témoins (Tableau 18).

**Tableau 18:** Les changements hématologiques enregistrés chez des rats males traités par voie orale avec une dose de 131mg/kg de l'extrait méthanolique du fruit de *Citrullus colocynthis*

pendant  
mois.

trois

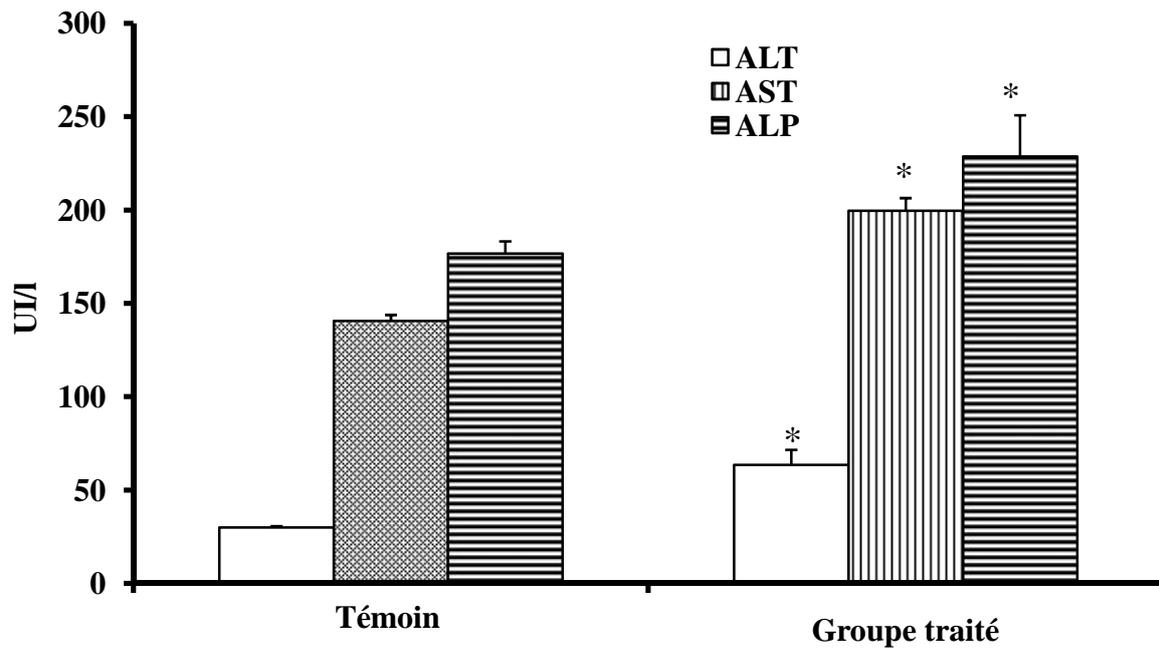
Paramètre	Témoin	Groupe Traité (3 mois)
Erythrocyte (GR, $10^{12}/L$ )	11,090±0,150	9,283±0,202*
Hémoglobine (g/dl)	17,100±0,302	15,986±0,230*
Hématocrite (%)	58,538±2,304	48,600±1,202*
VGM ( $\mu m^3$ )	54,713±0,628	49,563±0,806*
TCMH (pg)	15,388±0,188	17,613±0,378*
CCMH (g/dl)	28,175±0,236	35,538±0,332*
Leucocyte (GB, $10^9/L$ )	11,883±0,590	10,039±0,437*
PLT ( $\mu m^3$ )	644,750±37,037	612,600±19,400 <sup>ns</sup>

Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin.

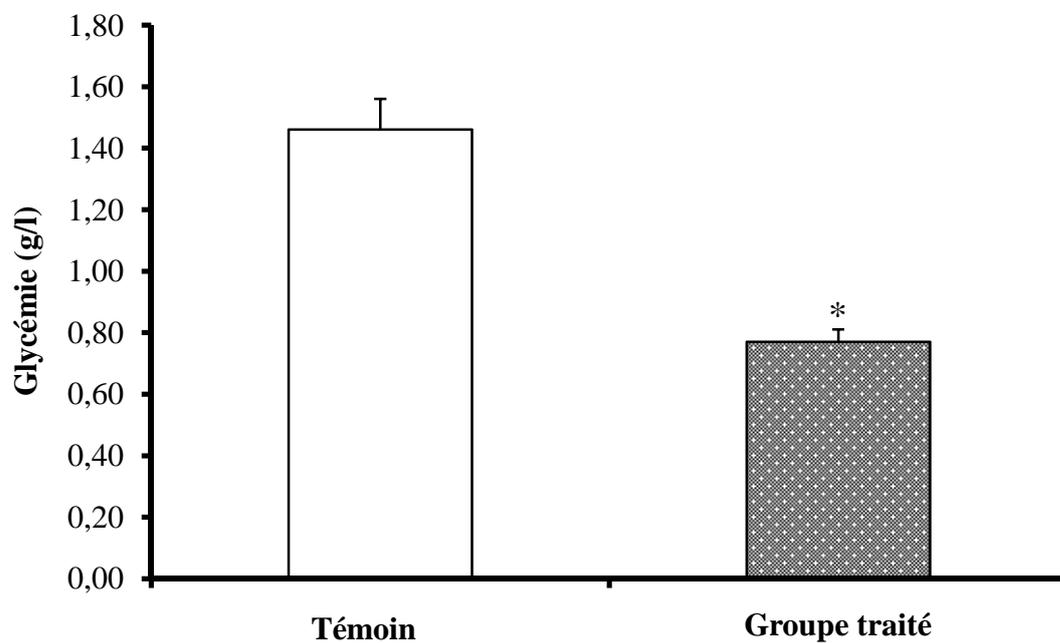
\* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

### III.3.4.3- Etude des paramètres Biochimiques

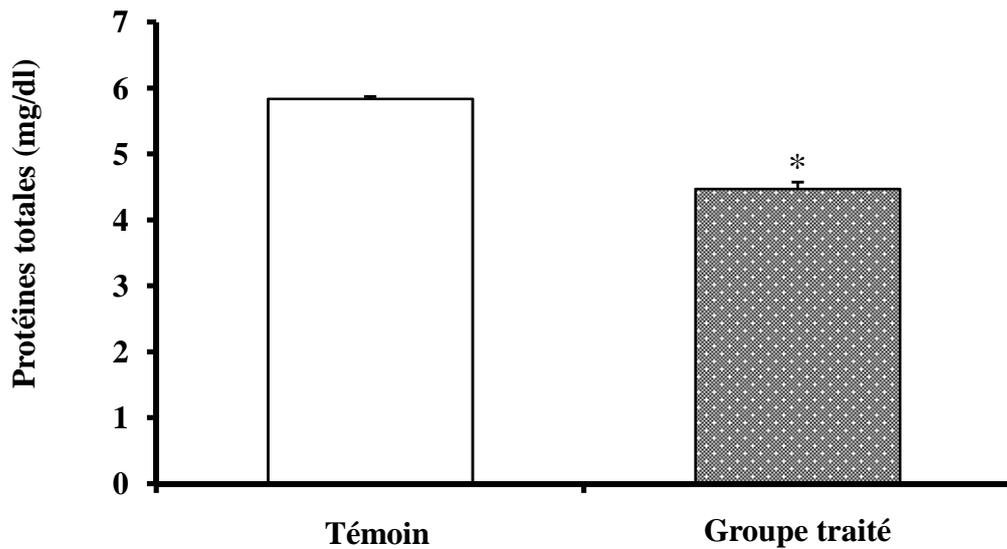
L'analyse des paramètres de la fonction hépatique des rats traités a montré une élévation significative des activités de la GOT (41.90%), du GPT (110.46%) et de l'ALP (29.32%) par rapport à celles du groupe témoin (Fig. 54). Des diminutions significatives des taux de glucose sanguin (47.26%) et de protéines totales (2.33%) étaient également enregistrées chez les rats traités par rapport aux rats témoins (Fig. 55 et 56). Les paramètres de la fonction rénale de leur part ont révélé une augmentation significative des niveaux d'urée (60.40%), de créatinine (23.44%), d'acide urique (40.47%), du sodium (12.24%) et du potassium (46.83%) avec une réduction significative des taux de calcium (12.056%) et de phosphore 21.89% (Fig. 57 et 58).



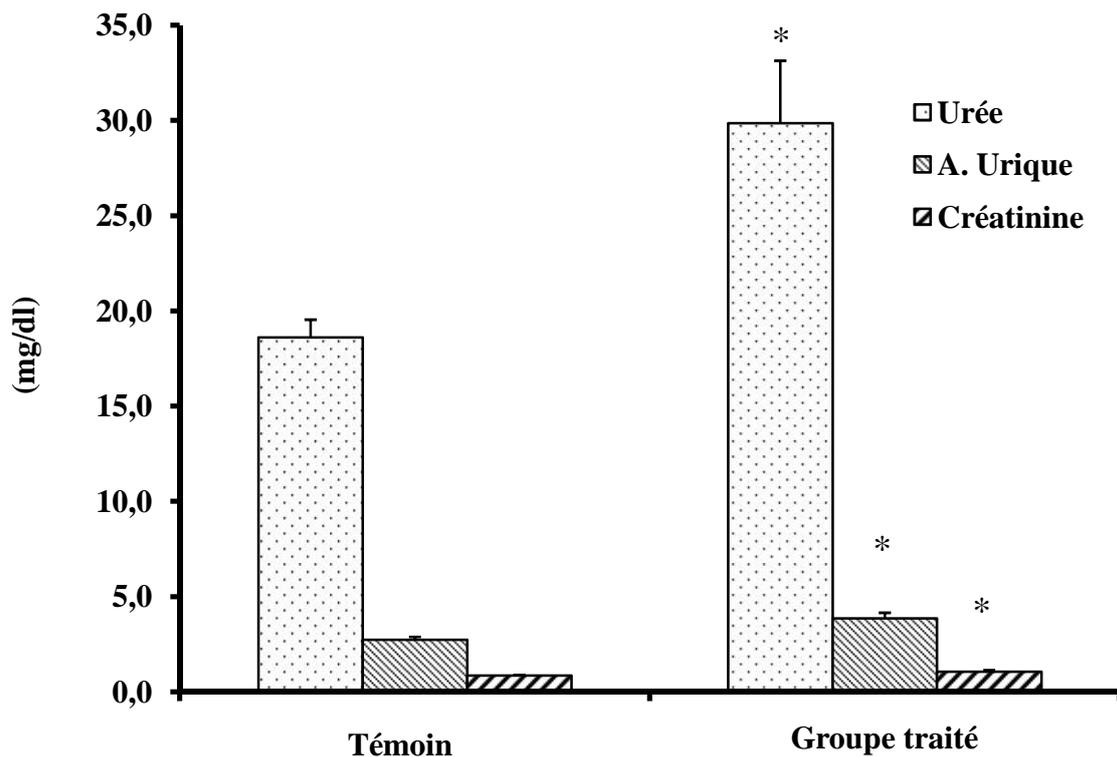
**Fig. 54.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de *Citrullus colocynthis* (131 mg/kg) pendant trois mois sur l'activité de l'ALT, l'AST et l'ALP chez des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



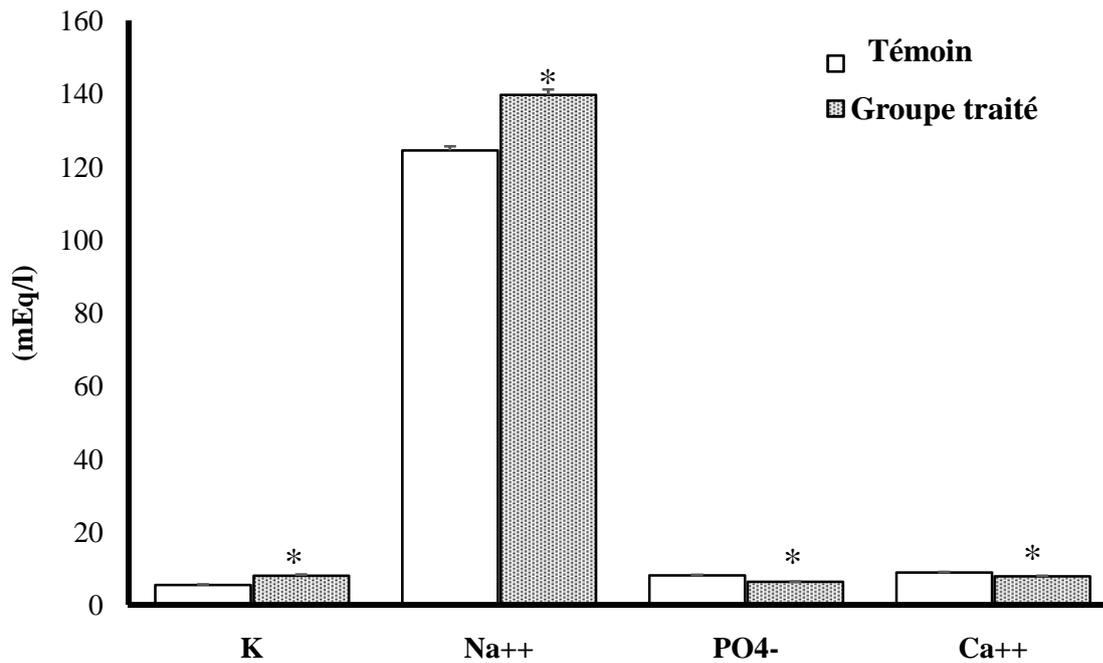
**Fig. 55.** Effet de l'administration orale de l'extrait méthanolique des fruits de *Citrullus colocynthis* (131 mg/kg) pendant trois mois sur le taux de glycémie des rats males. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



**Fig. 56.** Taux moyen en protéines totales chez des rats mâles traités par voie orale avec de l'extrait méthanolique des fruits de *Citrullus colocynthis* (131 mg/kg) pendant trois mois. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



**Fig. 57.** Taux moyen d'urée, d'acide urique et de créatinine chez des rats mâles traités par voie orale avec l'extrait méthanolique des fruits de *Citrullus colocynthis* (131 mg/kg) pendant trois mois. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



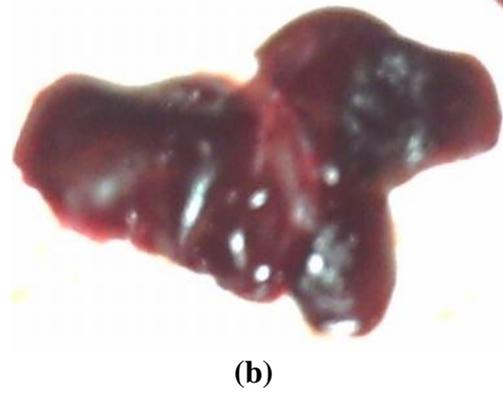
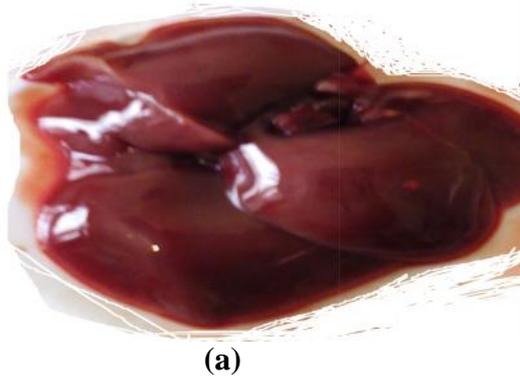
**Fig. 58.** Taux moyen en  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $PO_4^-$  et  $Ca^{++}$  chez des rats males après leur traitement par voie orale avec l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis* (131 mg/kg) pendant trois mois. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

#### III.3.4.4- Etude histologique

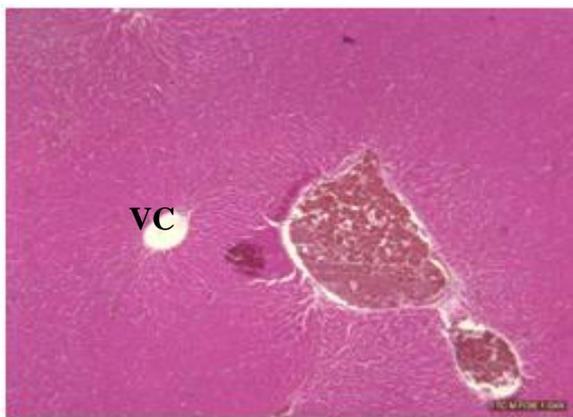
L'examen macroscopique du foie de rats traités, a montré des taches brunes très intenses à la surface par rapport au foie des témoins (Fig. 59 a et b).

L'examen microscopique du foie des rats traités a révélé un parenchyme hépatique d'architecture grossièrement conservée, siège d'une importante congestion vasculaire avec présence d'un foyer de fibrose qui dissocie les hépatocytes (Fig. 60, 61, 62, 63 et 64). Le foie des témoins était normal et d'une morphologie conservée (Fig. 65).

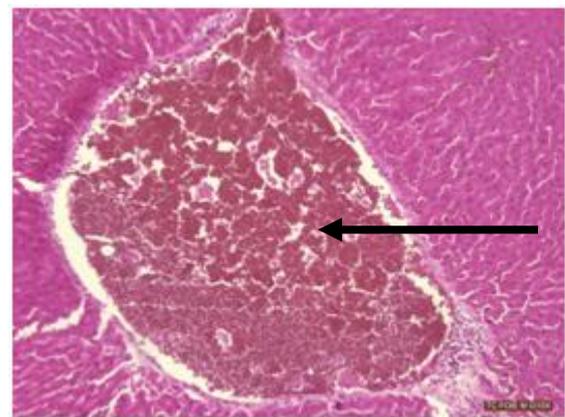
Le parenchyme rénal des rats traités (Fig. 66, 67 et 68) était le siège d'une congestion vasculaire plus importante que celle du foie. Le tissu interstitiel était le siège d'une inflammation subaiguë discrète faites de petits amas de lympho-plasmocytes. Les rats témoins n'ont présenté aucun changement au niveau de la structure de leurs reins (Fig. 69).



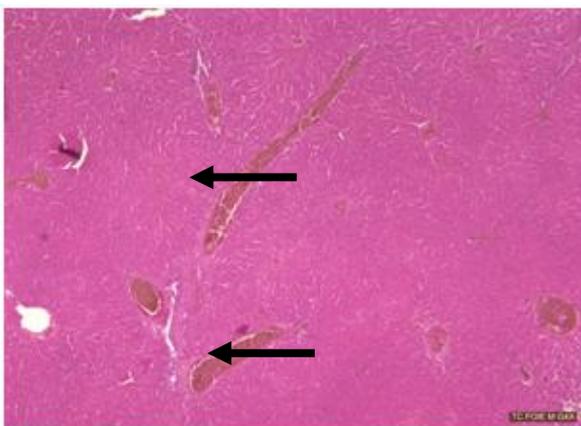
**Fig. 59.** Aspect macroscopique du foie des rats males témoins (a) et traités (b) par voie orale (pendant 3 mois) avec de l'extrait méthanolique des fruits de *Citrullus colocynthis* (131 mg/kg).



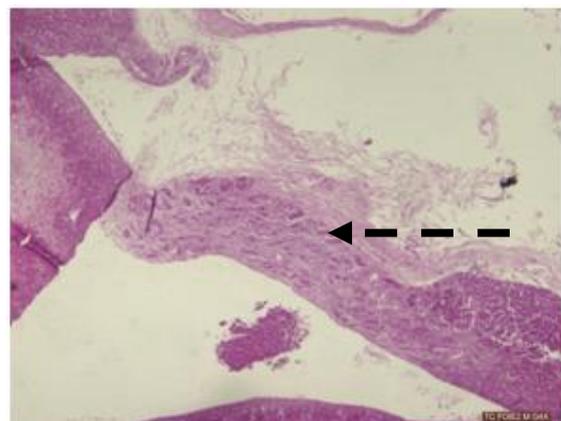
**Fig. 60.** Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 40$ ). VC : Veine centro-lobulaire.



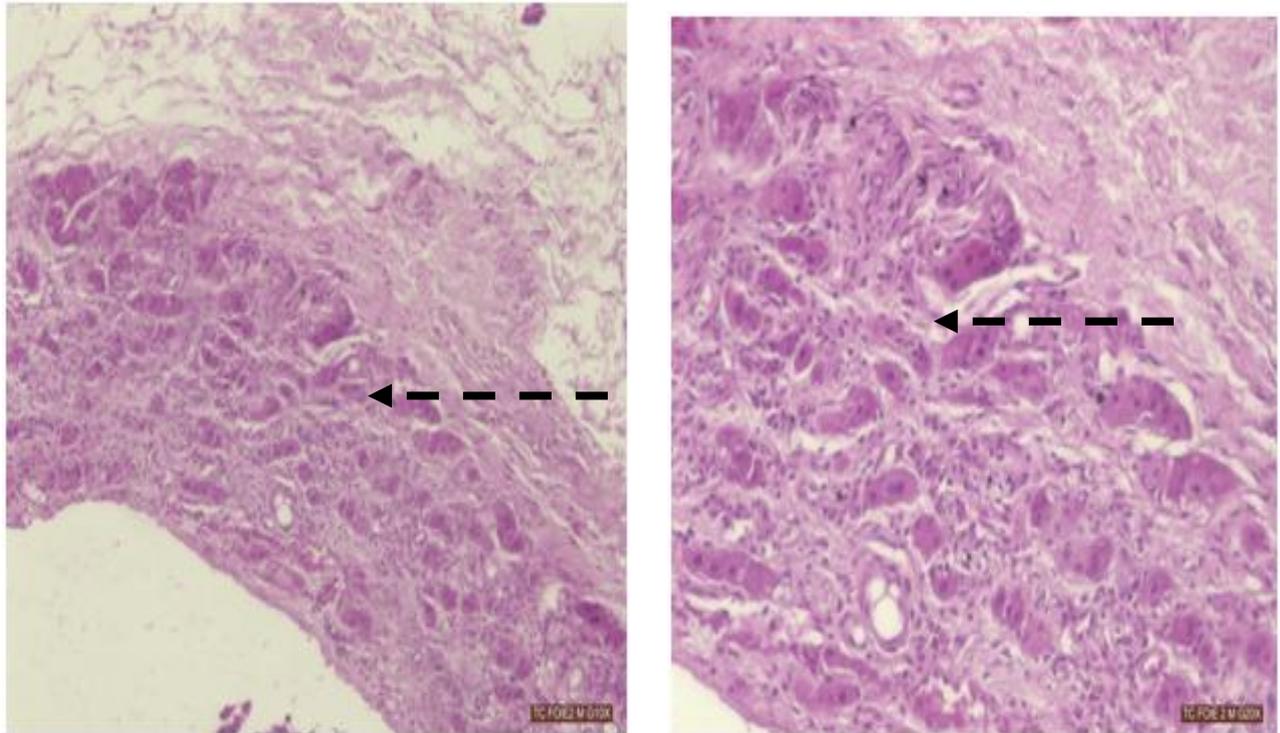
**Fig. 61.** Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 100$ ). Flèche : Congestion des vaisseaux sanguins hépatiques.



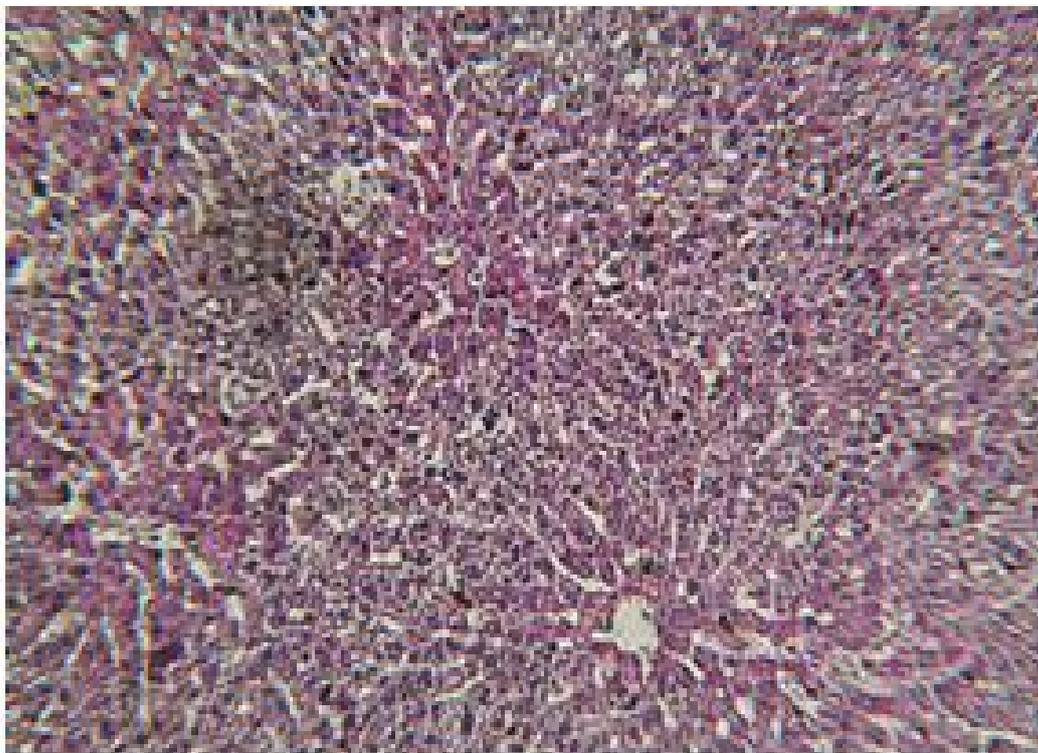
**Fig. 62.** Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 40$ ). Flèche : Congestion des vaisseaux sanguins hépatiques.



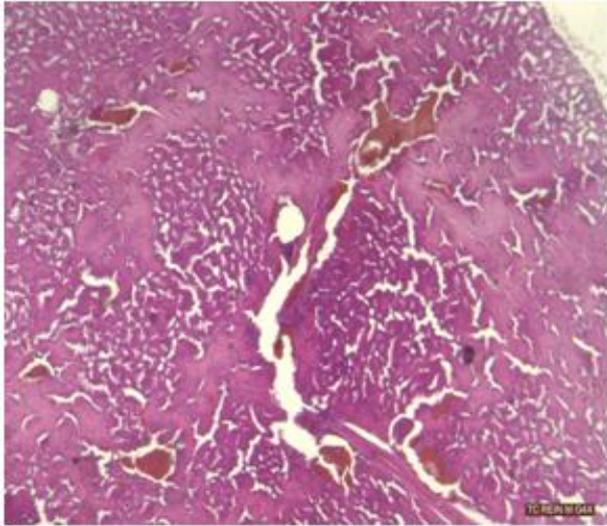
**Fig. 63.** Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 40$ ). Flèche : Présence de foyers de fibroses hépatiques.



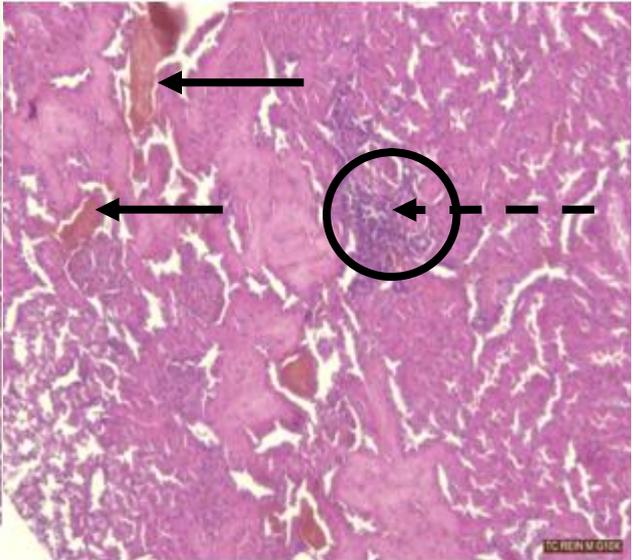
**Fig. 64.** Tissu hépatique des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 100$  et  $\times 200$ ). Flèche : Présence de foyers de fibroses hépatiques.



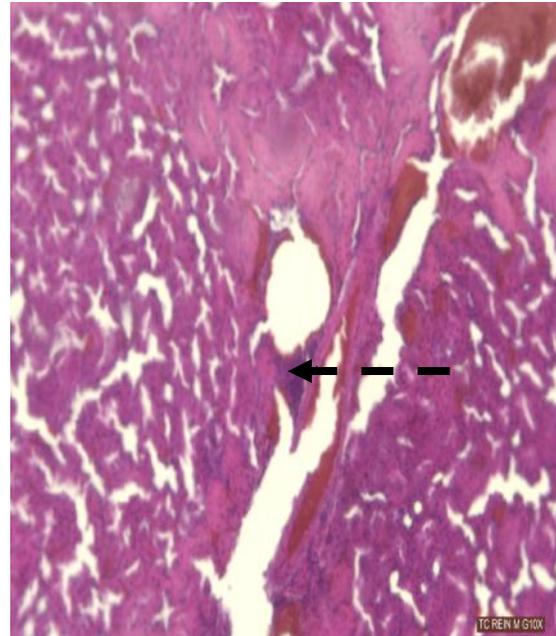
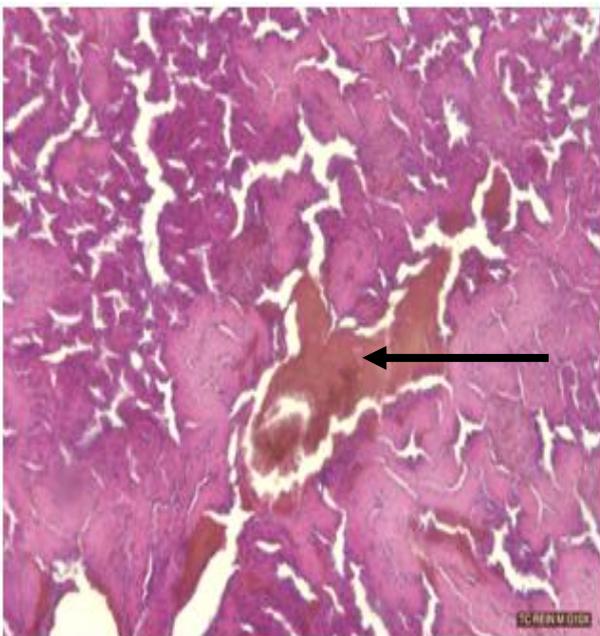
**Fig. 65.** Tissu hépatique des rats males Albino Wistar témoins. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 100$ ).



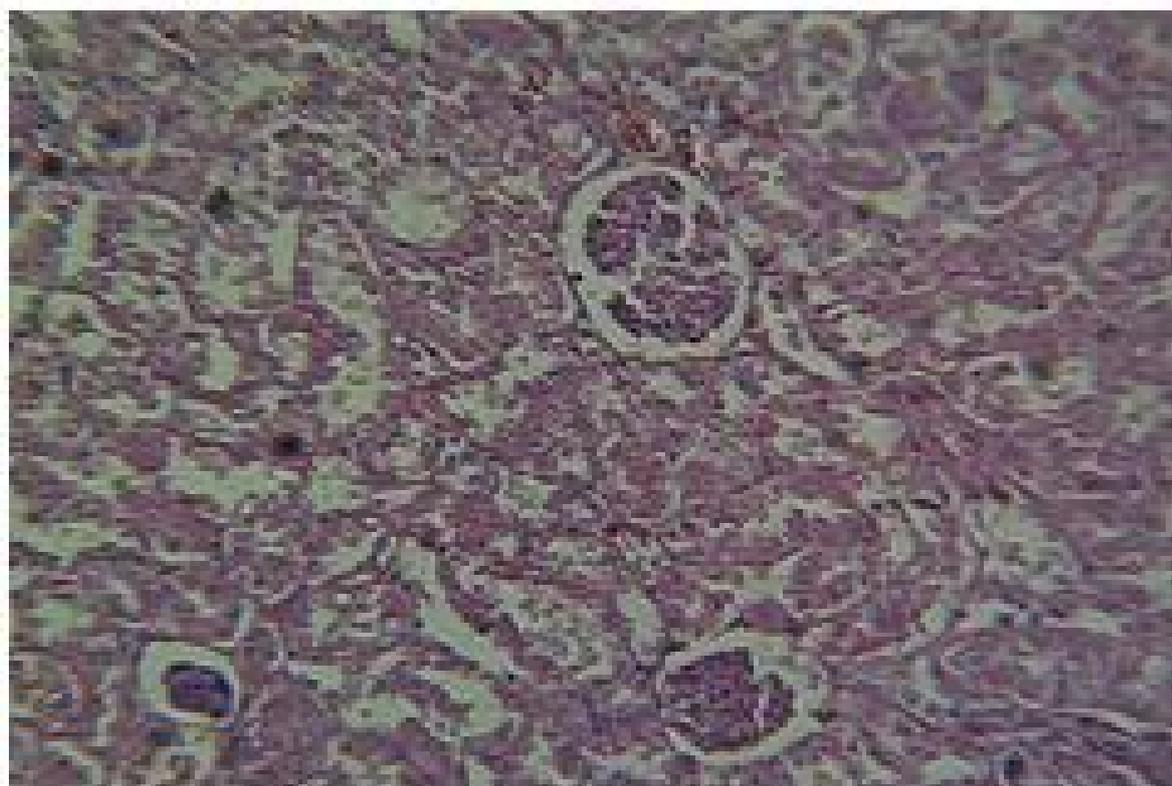
**Fig. 66.** Tissu rénal des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 100$ ). Présence de congestion vasculaire avec une discrète inflammation subaigue faite de petits amas de lympho-plasmocytes.



**Fig. 67.** Tissu rénal des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 100$ ). Flèche : Présence de congestion vasculaire ( $\leftarrow$ ) avec une discrète inflammation subaigue faite de petits amas de lympho-plasmocytes ( $\leftarrow$  - - - -).



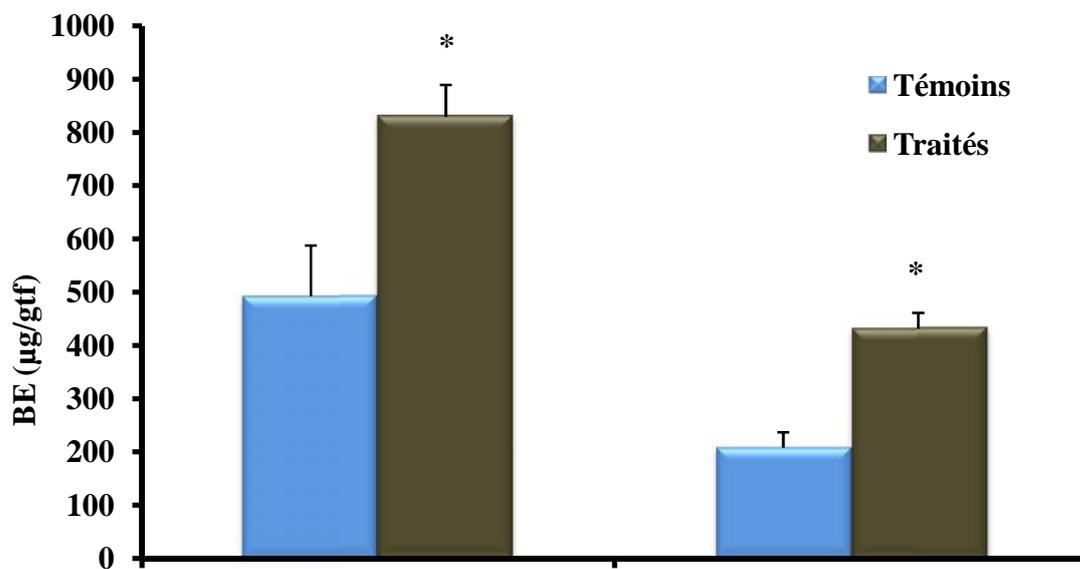
**Fig. 68.** Tissu rénal des rats males Albino Wistar traités par l'extrait méthanolique de la pulpe des fruits du CCT (131 mg/Kg, voie orale) pendant 3 mois. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 100$ ). Flèche: Présence de congestion vasculaire ( $\leftarrow$ ) avec une discrète inflammation sub-aigue faite de petits amas de lympho-



**Fig. 69.** Tissu rénal des rats males Albino Wistar témoins. Coloration à l'Hématoxyline Eosine ( $\times 100$ ).

### III.4- Perméabilité vasculaire au bleu Evans au niveau du foie et des reins des rats traités par l'extrait des fruits du *Citrullus colocynthis*

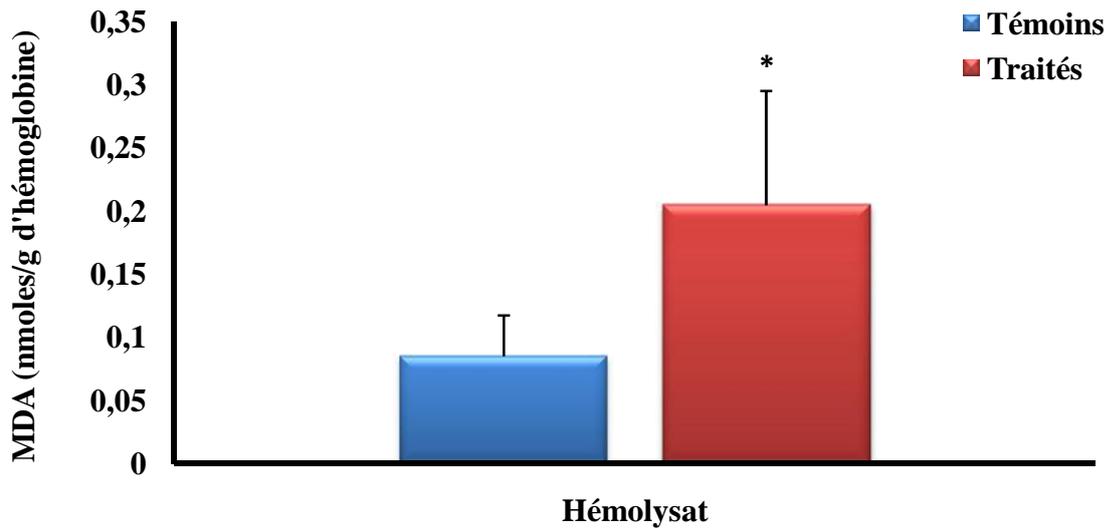
La **figure 70** indique les résultats de l'étude de la perméabilité vasculaire chez les rats males traités par l'extrait des fruits de la coloquinte pendant une semaine avec une dose de 265 mg/kg). Une augmentation significative dans la quantité bleu Evans qui a passé par extravasation au niveau du foie et des reins est notée chez les animaux traités comparativement aux rats témoins.



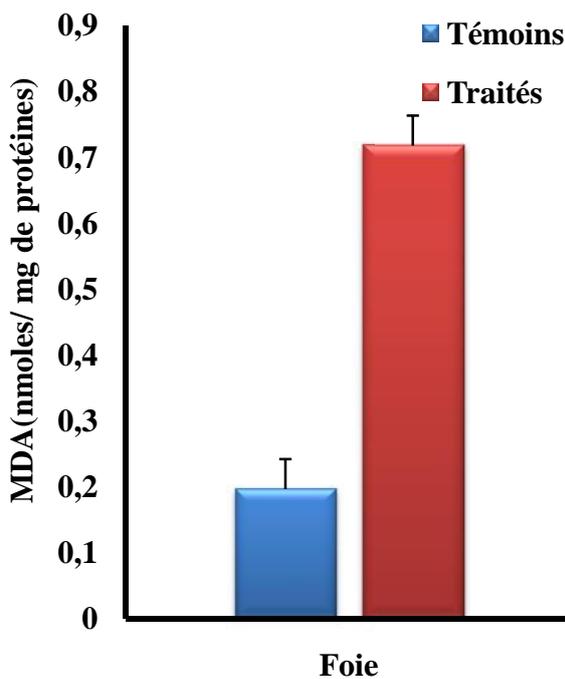
**Fig. 70.** Effet de l'administration de l'extrait méthanolique des fruits de CCT 265mg/kg par voie orale chez des rats males sur la perméabilité vasculaire du foie et des reins au bleu Evans. Les valeurs sont la Moyenne  $\pm$ SEM. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

### III.5- Taux de peroxydation lipidique au niveau de l'hémolysat des globules rouges, du foie et des reins de rats traités avec l'extrait des fruits de CCT

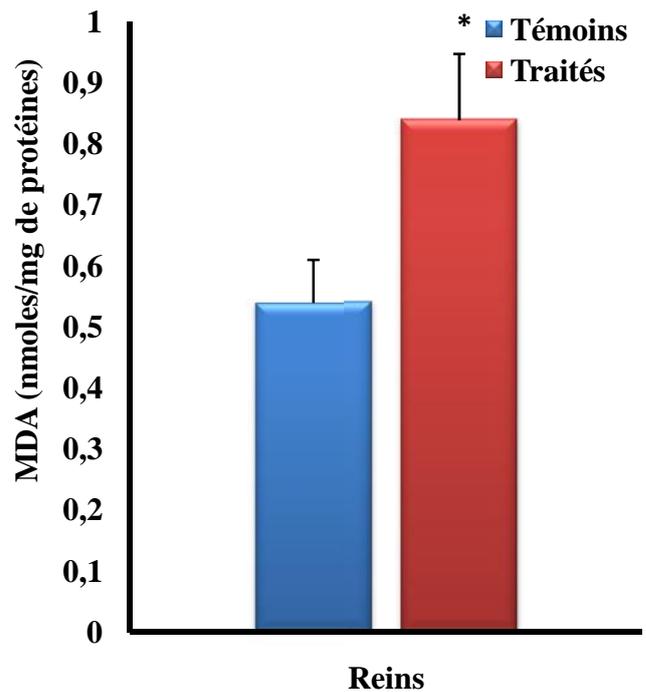
Le taux de peroxydation lipidique après traitement des animaux avec l'extrait des fruits de CCT au niveau de l'hémolysat des globules rouges, du foie et des reins est évalué par le dosage de malondialdéhyde (MDA). Une augmentation significative du taux de peroxydation lipidique est notée au niveau de l'hémolysat des globules rouges (**Fig. 71**), du foie (**Fig. 72**) et des reins (**Fig. 73**) des animaux traités en comparaison au groupe témoin.



**Fig. 71.** Taux de peroxydation lipidique enregistré au niveau de l'hémolysat de globules rouges de rats males traités pendant une semaine avec l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265mg/kg) par voie orale. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



**Fig. 72.** Taux de peroxydation lipidique enregistré au niveau du foie de rats males traités pendant une semaine avec l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265mg/kg) par voie orale. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .



**Fig. 73.** Taux de peroxydation lipidique enregistré au niveau des reins de rats males traités pendant une semaine avec l'extrait méthanolique des fruits de CCT (265mg/kg) par voie orale. Comparaison par rapport au témoin. \* :  $P \leq 0,05$ , ns :  $P > 0,05$ .

***CHAPITRE IV :***  
***Discussion générale***

Les plantes médicinales font partie du patrimoine culturel des populations et constituent actuellement une partie très importante des remèdes pour plusieurs maladies. Leurs avantages médicaux et leurs propriétés toxiques sont évalués au profit de l'humanité.

Le présent travail s'est intéressé à l'étude de l'espèce *Citrullus colocynthis*, une plante spontanée qui trouve une utilisation répandue dans la médecine traditionnelle algérienne.

### **Rendement d'extraction**

Plusieurs auteurs ont rapportés que l'extrait méthanolique constitue la meilleure méthode pour l'étude de la toxicité des fruits du CCT (Duke, 1983; Farzaneh et Mohammad, 2006).

Il est difficile de comparer les résultats d'extraction avec ceux de la littérature. Le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions de la réalisation de cette extraction.

Le rendement en extrait obtenu dans le présent travail est de 13,73%. Un rendement de 3% seulement en extrait méthanolique a pu être récupéré après extraction au soxhlet par Rahawi et Youkana (2012). Par contre, un rendement de 18.02% en extrait méthanolique a été obtenu par extraction au soxhlet pendant 6 heures par Merzouk *et al.* (2011). Ce rendement était la plus élevée comparativement à celui obtenu par extraction des fruits de CCT par le chloroforme (8.35%), l'acétone (6.55%), l'eau (2.94%), l'acétate d'éthyle (0.93%) et l'éther de pétrole (0.54%).

Les analyses phytochimiques des extraits des plantes médicinales est une étape préliminaire d'une grande importance, puisqu'elle révèle la présence des constituants bioactives responsables des propriétés biologiques. De ce fait, un criblage phytochimique est réalisé sur l'extrait de notre plante et ses différentes fractions (hexanique, chloroformique, éthylacétatique, n-butanolique et aqueuse) à la fois par des réactions de coloration et de précipitation en tubes et par analyse chromatographique sur couche mince.

Les résultats des tests phytochimiques en tubes effectués ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs phytoconstitués: alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, stérols, terpènes, saponines, glycosides et composés réducteurs.

Ces données se trouvent en accord avec des résultats publiés par plusieurs auteurs au cours des dernières années. Uma et Sekar (2014) ont rapporté la richesse des divers extraits préparés (aqueux, éthanolique, méthanolique, étherique, éthyl acétatique, butanolique et benzénique) des feuilles de la plante en alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, stérols, terpènes,

saponines, glycosides et carbohydrates. De même, des tests phytochimiques effectués sur les différents extraits (aqueux, hydrométhanolique, éthanolique et chloroformique) des graines de coloquinte collectée de la région d'Ain Sefra, Wilaya de Naâma ont révélé la présence d'alcaloïdes, de tanins, de flavonoïdes, de stérols, des triterpènes et des composés réducteurs à différentes proportions selon le mode de préparation (infusion ou décoction) et le solvant qui a servi à l'extraction (Azzi, 2012). De leur part, Najafi *et al.* (2010) ont noté la présence de: tanins, saponines, protéines et sucres réducteurs dans l'extrait aqueux et des alcaloïdes, glycosides et flavonoïdes dans l'extrait alcoolique des fruits de la coloquinte (*C. colocynthis*) récoltés en Iran. De même, la présence de tanins, de glycosides, de terpènes, de saponines, de flavonoïdes et d'alcaloïdes, suite à des tests phytochimiques réalisés sur un extrait à l'éther de pétrole préparé à partir des fruits de la coloquinte (*C. colocynthis*) récoltés en Inde a été rapporté par Jayaraman *et al.* (2009). Marzouk *et al.* (2009) ont enregistré la présence des alcaloïdes, flavonoïdes et stéroïdes et l'absence des coumarines, anthraquinones, saponosides, iridoïdes, glycosides et des tanins galliques, dans l'extrait aqueux et acétonique des graines mûres de la coloquinte récoltée en Tunisie.

D'après l'analyse qualitative effectuée par chromatographique sur couche mince, les fractions : hexanique, éthyle acétatique et butanolique semblent contenir un nombre plus important de spots comparativement aux fractions chloroformique et aqueuse sous les différents systèmes de migration utilisés. Les spots révélés sous irradiation UV 365 nm présentent des fluorescences bleue ou rose pour la plupart des fractions analysées.

Grâce aux systèmes d'élution, nous avons mis en évidence la présence dans les cinq fractions de l'extrait brut différentes classes de substances: triterpènes, stérols, phénols, tanins, alcaloïdes. Aux fins de spécification, des révélateurs spécifiques ont été employés pour les distinguer.

La révélation avec la vanilline sulfurique (un réactif polyvalent) a permis mettre en évidence des triterpènes (coloration violet, rose et orange), des stérols (coloration bleu) et des tanins (coloration rouge). Le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) révèle les flavonoïdes. Les différentes fractions de l'extrait brut analysées semblent être pauvres en constituants flavonoïdiques sous les divers systèmes de migration. La révélation par une solution aqueuse de trichlorure de fer a permis de visualiser les composés phénoliques et les tanins dans les fractions chloroformique, éthylacétatique, butanolique et aqueuse.

Il est à noter que la fraction hexanique renferme majoritairement des stérols et des terpènes. Les fractions: chloroformique, éthylacétatique et butanolique contiennent des stérols, des terpènes, des tanins, des alcaloïdes et des glycosides cardiotoniques.

Une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince a été effectuée par Azzi (2012) sur des extraits obtenus à partir des graines de la plante en utilisant une phase mobile formée d'un mélange de chloroforme/ Méthanol (17/3). Après migration, les deux extraits préparés (chloroformique et éthanolique) ont donné six et neuf taches respectivement.

La présence des tannins et des saponines est signalée dans le fruit de *Citrullus colocynthis* par Najafi *et al.* (2010), Gurudeeban *et al.* (2010) et Gacem (2011).

Trois alcaloïdes plus une choline ont été séparés, par chromatographie sur couche mince, à partir des graines de coloquinte récoltées dans la région de Marsa-Matrouh (Egypte) en utilisant une phase mobile contenant du chloroforme et du méthanol (9/1). Ces alcaloïdes ont été identifiés par la suite par la résonance magnétique nucléaire (RMN) comme étant des dérivés de la pyridine ( $C_{10}H_{15}NO_3$  et  $C_{20}H_{32}NO$ ), tandis que le troisième ( $C_{16}H_{24}NO_7$ ) a été suggéré d'être un dérivé de la quinoline (Darwish-Sayed *et al.*, 1973).

D'après, Natiq *et al.* (1989), quatre glycosides cucurbitacines : 2-O- -D glucopyranosyl-cucurbitacine I, 2-O- -D-glucopyranosyl- cucurbitacine E, 2-O- -D glucopyranosyl- cucurbitacine L et 2-O- -D-glucopyranosyl (22-27) hexano-cucurbitacine I ont été identifiés dans l'extrait chloroformique préparés à partir des parties aériennes et des fruits de la coloquinte récoltés dans la région de Basrah (Sud Iraq). Cependant, deux glycosides cucurbitacines : 2-O- -D-gluco-pyranosyl-cucurbitacine I et 2-O- -D-glucopyranosyl cucurbitacine L seulement ont été détectés au niveau de l'extrait éthanolique des mêmes parties utilisées. La phase mobile utilisés était constituée d'un mélange chloroforme/ méthanol (17/3).

#### **La dose léthale médiane (DL<sub>50</sub>)**

Le tableau clinique des rats mâles traités avec l'extrait de fruit de *C. colocynthis* est caractérisé par l'apparition relativement rapide de symptômes avec une intensité dose dépendante: redressement des poils, excitabilité, hypoactivité et diarrhée au début de la première heure. Cela pourrait être probablement dû à l'absorption rapide des principes actifs présents dans l'extrait des fruits de la plante.

La mort survient chez les rats présentant une diarrhée sévère. Les animaux survivants et qui ont présenté une diarrhée modérée étaient capables de tolérer les doses appliquées et de récupérer leurs activités biologiques. Ceci peut être attribué à la capacité de détoxification de leur organisme et d'élimination des principes actifs toxiques.

La symptomatologie observée (diarrhée, difficulté respiratoire, tachycardie, faiblesse) chez les rats traités est similaire à celle observée par Rezvani *et al.* (201) chez des personnes

hospitalisées après ingestion d'une décoction des fruits du *C. colocynthis*. De même, Marzouk *et al.* (2010) ont rapporté que l'utilisation des fruits de la plante dans la médecine traditionnelle par certaines personnes de la population de la commune de Sidi Makhoulouf en Tunisie était accompagnée d'une faiblesse et d'une insuffisance respiratoire.

Des signes de toxicité se caractérisent surtout par une accélération de rythme cardiaque avec une difficulté de respiration, une convulsion avec une forte agitation et un coma profond ont été rapportés par Elgerwi *et al.* (2013), Kingsbury (1964), Barri *et al.* (1983) et Elawad *et al.* (1984) chez des animaux traités. La tachycardie est probablement due à un blocage des récepteurs muscariniques M2 conduisant à une suppression du tonus vagal (Broadley et Kelly, 2001), alors que les autres symptômes peuvent résulter d'une atteinte de système nerveux central via le blocage de la libération de l'acétylcholine dans les synapses du système nerveux central (Batanouny, 1999).

Toutefois, des rats Wistar traités par voie sous-cutanée avec l'extrait du *C. colocynthis* pendant quatre semaines n'ont présenté aucun symptôme toxique (Ickert, 1980). Cette différence entre les résultats peut être attribuée à plusieurs facteurs: modes de préparation et d'administration des extraits, degré de maturité des fruits (pourcentage des ingrédients actifs dans le fruit) et lieu de la récolte de la plante et les souches de rat utilisées.

Les valeurs de la DL<sub>50</sub> de l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis* administré aux rats mâles par voie orale et calculées (1533,33 mg/kg et 1465 mg/kg) respectivement par les méthodes arithmétiques de Dragstedt et Lang (1957) et Karber et Behrens (1935) appartiennent à l'intervalle de confiance de 95 % de la DL<sub>50</sub> [1037.80 < DL<sub>50</sub> = 1311,45 mg/kg < 1657.27 mg/kg] déterminée par la méthode graphique de Litchfield et Wilcoxon (1949) ce qui montre la fiabilité de la méthode de détermination.

Au regard des résultats de la DL<sub>50</sub> (500 mg/kg < DL<sub>50</sub> < 5000 mg/kg), l'extrait méthanolique des fruits de *C. colocynthis* administré par voie orale peut être classé dans la catégorie des produits faiblement toxiques pour les rats mâles selon l'échelle de Loomis et Hayes (1996) et Pascoe (1983). Le calcul du coefficient de toxicité ( $K = 1 / DL_{50} * S$ ) a permis d'obtenir des valeurs inférieures à 0,1 ( $K < 0.1$ ) ce qui permet de conclure que l'extrait des fruits du *Citrullus colocynthis* est moins dangereux pour les espèces étudiées (Yalanova, 1970). Cependant, Al-Qura'n (2005) a classé les fruits de la coloquinte (*C. colocynthis*) parmi les plantes médicinales les plus toxiques utilisées par la population jordanienne, causant des diarrhées sévères et des inflammations intestinales. Pour les mêmes effets indésirables, N'mila *et al.*, (2000) ont rapporté que la plante est classée parmi les dix plantes les plus toxiques

Ces résultats semblent être différents de ceux rapportés par Rahawi et Youkana (2016) qui ont trouvé une  $DL_{50}$  de 383,8 mg/kg de l'extrait méthanolique du fruit entier (y compris les graines) administré par voie orale chez les rats Wistar. En outre, Marzouk *et al.* (2010) ont trouvé des valeurs de  $DL_{50}$  de 553,7 mg/kg et 487,6 mg/kg respectivement pour les extraits aqueux de fruits immatures et mûrs administrés par voie intrapéritonéale à des souris.

D'après les valeurs expérimentales des  $DL_{50}$  (1311.45mg/kg, 1746.46 mg/kg, 137.13mg/kg et 198.16 mg/kg), les rats et les souris males paraissent plus sensibles aux effets indésirables de l'extrait méthanolique des fruits du *C. colocynthis* que les rats et les souris femelles. Cette sensibilité liée au sexe pourrait être due aux différences physiologiques.

Le calcul et la comparaison des valeurs de rapport de pente (RS) et des rapports de  $DL_{50}$  (RP) et leurs facteurs  $f_{RS}$  et  $f_{RP}$  ont permis de révéler une différence significative de point de vue effet biologique entre rats et souris mâles et entre rats et souris femelles.

Le composant de l'extrait brut des fruits de la plante responsable des manifestations toxiques n'est pas connu. L'extrait végétal administré étant un totum de principes chimiques. La toxicité et la létalité de cet extrait peuvent être attribuables à l'un ou à plusieurs des produits phytochimiques qu'ils renferment (saponines, glycosides, alcaloïdes et cucurbitacines), dont certains ont été isolés et identifiés (Abdel-Hassan *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001; Delazar *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2007).

Les résultats actuels ont révélé que l'administration d'une forte dose (440 mg/kg) de l'extrait des fruits de CCT par voie orale entraîne des effets toxiques sans provoquer aucune mortalité chez le rat male. La carte clinique des animaux traités s'est caractérisée par: un redressement de poils, une diarrhée, un manque de vivacité avec tendance au regroupement et d'isolement des animaux dans un coin de la cage.

Les mêmes signes d'empoisonnement sont observés lorsque l'extrait des fruits du CCT est administré par voie orale aux animaux pendant six semaines (conditions de toxicité subaiguë) ou bien pendant trois mois (conditions de toxicité subchronique) sans production de mortalité tout au long des périodes de traitement. Ces symptômes sont accompagnés d'une réduction significative du poids corporel final et de la prise alimentaire chez les rats traités comparativement aux témoins

Les changements dans les excréments et la diarrhée sont des indicateurs de perturbations au niveau du tractus gastro-intestinal. Selon Al-Yahia *et al.* (2000), la diarrhée constitue un signe important de la phytotoxicité et pourrait être due à la présence de cucurbitacines dans les fruits du *C. colocynthis*. En effet les cucurbitacines B, D et E manifestent un effet purgatif important (Miro, 1995). De plus, il a été rapporté que le *C. colocynthis* possède la capacité

d'augmenter les mouvements péristaltiques des intestins et d'induire la diarrhée une fois consommé à forte concentration (Nwaogu, 2016). La tendance au regroupement des rats dans un coin de la cage peut être reliée à une hypothermie (Lompo *et al.*, 1995). L'effet hypothermisant et antipyrétique de l'extrait éthanolique des fruits de *Citrullus colocynthis* chez des rats males a été démontré par Prasanth Reddy *et al.*, (2012).

Le redressement des poils peut révéler des perturbations au niveau du système nerveux autonome. Le poids corporel et les données sur la consommation alimentaire sont considérés comme des indicateurs grossiers de la toxicité systémique générale. La réduction du poids corporel peut être directement liée à une réduction de la consommation alimentaire (Keller et Banks, 2006) ou indirectement à un effet inhibiteur de la sécrétion gastrique acide ou à des endommagements qui ont touché les organes vitaux (Tsuchiya *et al.*, 2002; Taufiq-Rahman *et al.*, 2005). En effet, Elgerwi *et al.*, (2013) ont rapporté que l'extrait glycosidique des fruits du CCT administré par voie orale entraîne des lésions au niveau de l'estomac et de l'intestin des rats traités ce qui laisse à suggérer une action irritante locale et directe de l'extrait de la plante sur les deux muqueuses.

#### **Effet de l'extrait sur la masse relative des organes**

Généralement, les altérations de la masse relative des organes reflètent la toxicité après l'exposition à une substance toxique. Le cœur, le foie, les reins, la rate et les poumons sont les premiers organes affectés par la réaction métabolique provoquée par le toxique (Jothy *et al.*, 2011).

L'examen macroscopique des différents organes *in situ* dans les conditions de la toxicité aigue révèle une réduction significative de la masse relative du foie, des reins et des poumons de la plupart des groupes traités en comparaison aux témoins. Après 14 jours du traitement, il semble qu'il y a récupération car aucun changement n'a pu être observée sur l'ensemble des organes de ce groupe comparativement aux témoins.

Après six semaines de l'administration de l'extrait, les animaux de cette étude ont présenté une diminution significative de la masse relative du foie, des reins, des poumons et du cœur par rapport au groupe témoin. Dans les conditions de la toxicité sub-chronique, les masses relatives du : foie, des reins et des testicules étaient significativement inférieures à celles des organes du groupe témoin.

Ces modifications peuvent être le résultat d'un effet toxique direct de l'extrait de la plante sur les organes étudiés ou bien peuvent être indirectement reliées à la diminution du poids corporel enregistrée chez les animaux traités.

### **Effet de l'extrait sur les paramètres hématologiques**

Le système hématopoïétique est l'une des cibles les plus sensibles aux composés toxiques et un indice important de l'état physiologique et pathologique de l'homme et l'animal (Mukinda et Syce, 2007). De nombreux produits chimiques peuvent nuire au système sans endommager la moelle osseuse par des mécanismes tels que l'hémolyse et des réactions immunotoxiques avec les composants sanguins (Irons, 1985).

Dans l'étude de la toxicité aigue, les effets sur le système hématopoïétique se sont traduits par une réduction significative du nombre de globules rouges, des taux d'hématocrite et d'hémoglobine depuis le premier jour jusqu'au dixième jour du traitement. Les mêmes paramètres ont montré une réduction dans les conditions de la toxicité subaigüe et subchronique. Cette réduction est un indicateur d'une anémie qui semble être hypochromique (faibles valeurs de CMH) et microcytaire (valeurs faibles de VGM) chez les rats traités. Le taux d'hématocrite mesure le pourcentage par volume des globules rouges dans un échantillon de sang complet après centrifugation. Dans notre étude, les niveaux d'hématocrite ont chuté chez les rats traités probablement suite à une hémolyse des globules rouges circulants d'où une diminution de leur nombre ou à une augmentation du volume plasmatique.

Les faibles niveaux de globules blancs indiquent une leucopénie qui peut résulter d'une inflammation, d'une destruction des leucocytes périphériques, d'une toxicité de la moelle osseuse, d'un stress (Kram et Keller, 2006) ou d'une neutropénie (AlYahia *et al.*, 2000).

Ces résultats, se trouvent en concordance avec les résultats obtenus par Amamou *et al.* (2011) qui ont remarqué une diminution du nombre d'érythrocytes et du taux d'hématocrite suite au traitement des animaux avec l'huile du colocynth. Cependant, ils ne sont pas conformes avec l'augmentation significative du nombre de globules rouges, de la concentration d'hémoglobine et du volume cellulaire trouvés par Elgerwi *et al.* (2013) après administration de l'extrait glycosidique.

D'un autre côté, les changements remarquables sur le poids de la rate chez les rongeurs peuvent être un indicateur sensible d'une hypoproduction ou d'une hyperproduction des cellules sanguines (Keller et Banks, 2006). Dans le présent travail, une réduction significative du poids relatif de la rate a été remarquée jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour de traitement qui peut également expliquer l'origine de l'anémie observée chez les animaux traités.

Les résultats hématologiques obtenus indiquent que l'extrait du CCT pourrait être toxique pour les globules rouges circulants, interférer avec leur production et celle des plaquettes.

La réduction du nombre de globules rouges pourrait être due à un effet hémolytique direct de l'extrait sur les hématies. En effet, des composants présents dans l'extrait peuvent interférer avec certains constituants de la membrane cellulaire des érythrocytes modifiant ainsi leurs propriétés physiques et réduisant par conséquent leur flexibilité et leur durée de vie (Weed, 1970). C'est le cas des saponines dont la présence a été vérifiée dans l'extrait et qui sont dotées d'une forte activité hémolytique (Apers *et al.*, 2001). Le mode d'action des saponines sur la membrane des globules rouges a été étudié par plusieurs auteurs. Les saponines agissent sur le cholestérol membranaire en formant un complexe stérol-glycoside causant des perturbations de la perméabilité membranaire (Likhatskaya *et al.*, 1985). Les saponines peuvent également agir par une augmentation de la microviscosité de la bicouche lipidique (Aminin *et al.*, 1989) et l'inhibition de l'activité d'enzymes membranaires suite à des modifications de leur interaction avec les lipides (Gorshkova *et al.*, 1999).

De même, l'effet hémolytique peut être indirect résultant d'une peroxydation lipidique. L'augmentation de la production des peroxydes lipidiques entraîne l'hémolyse des globules rouges induisant de nombreuses conséquences pathologiques. Les conséquences pathologiques majeures de la peroxydation des lipides membranaires induite par les ROS est l'augmentation de la rigidité membranaire, la diminution de la déformabilité cellulaire et la réduction de la durée de vie des érythrocytes (Kolanjiappan *et al.*, 2002). La mesure du taux de TBARS dans le plasma aide à mesurer (estimer) le taux de destruction des globules rouges (Gutteridge, 1995).

Dans ce contexte, le taux des TBARS est mesuré au niveau des globules rouges chez les rats mâles traités par voie orale avec l'extrait méthanolique des fruits du CCT pendant une semaine avec une dose de 265 mg/kg. L'augmentation du taux de TBARS plasmatique observée chez les rats traités pourrait être ainsi reliée à une surproduction des sous produits de la peroxydation lipidique au niveau des globules rouges et peut ainsi expliquer la diminution du nombre de globules rouges constatées chez ces animaux.

#### **Effet de l'extrait sur les paramètres biochimiques**

Le foie, connu pour être un organe clé dans le métabolisme et la désintoxication des xénobiotiques, est vulnérable aux dommages induits par une grande variété de produits chimiques. Ceci est dû au fait que la plupart des produits chimiques sont métabolisés dans le

foie avant d'être éliminés du corps. Un signe évident d'une lésion hépatocellulaire est une fuite d'enzymes cellulaires dans le plasma. Lorsque la membrane de la cellule du foie est endommagée, une variété d'enzymes normalement situées dans le cytosol seront libérées dans la circulation sanguine. L'estimation des taux de GPT (glutamate pyruvate transaminase) et de GOT (glutamate oxaloacétate transaminase) dans le sérum constitue un marqueur utile pour estimer l'étendue des lésions hépatocellulaires induites (Udem *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2004). La phosphatase alcaline (PAL) est une enzyme liée à la membrane qui est libérée dans le sérum suite à un phénomène pathologique (Batt et Siest, 1980). Une forte augmentation de la phosphatase alcaline sérique est un indicateur de la cholestase, alors qu'une faible augmentation est révélatrice d'une maladie hépatocellulaire chronique (Wilkinson, 1976).

Dans l'étude de la toxicité aigue, le traitement des rats mâles traités avec l'extrait des fruits du *C. colocynthis* avec une dose forte (440 mg/kg) a entraîné une augmentation significative de l'activité du GOT et du GPT depuis le 3<sup>ème</sup> jours jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour du traitement. Les taux de PAL montrent une augmentation significative chez l'ensemble des groupes traités. De même, les animaux traités par l'extrait pendant six semaines ou pendant trois mois ont enregistré des changements significatifs des taux des transaminases sériques et du PAL. En outre, la gravité des changements a augmenté avec l'augmentation de la durée du traitement, ce qui suggère un effet cumulatif de cet extrait. Une augmentation de ces activités enzymatiques reflète des dommages au foie et des troubles inflammatoires hépatocellulaires (Foreston *et al.*, 1985).

Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Al Ghaithi *et al.* (2004) qui ont enregistré une augmentation significative de l'activité des enzymes hépatiques AST, ALP et non significative de l'ALT, chez les rats normaux soumis à une administration quotidienne par voie orale de d'extrait aqueux des graines de coloquinte (*C. colocynthis*).

Par ailleurs, une diminution de la concentration en protéines sériques est enregistrée chez les rats traités avec l'extrait du CCT. Ce résultat est similaire à celui obtenu par Dallak *et al.* (2009) après traitement des rats pendant un mois avec l'extrait hydroéthanolique.

Cette diminution du taux protéique pourrait être due à une microprotéinurie, et/ou à une augmentation du catabolisme protéique (Almdal et Vilstrup, 1988). De plus, vu que la plupart des protéines plasmatiques peuvent servir d'indicateurs de la capacité synthétique du foie, ces changements pourraient être interprétés comme étant le résultat d'un dysfonctionnement hépatique résultant de l'effet toxique de l'extrait. En effet, à la suite d'un endommagement cellulaire, la capacité de synthèse protéique est réduite et, à mesure que l'étendue des dégâts

augmente, les niveaux de ces protéines dans le plasma ont tendance à diminuer (Shafaei *et al.*, 2012).

Les résultats obtenus montrent également une réduction significative de la glycémie des rats traités. Ce résultat est conforme à celui rapporté par Benmehdi *et al.*, (2011), qui ont testé l'effet de l'extrait brut préparé à partir de graines du *Citrullus colocynthis* sur le taux de glycémie chez le rat. De même, Dallak *et al.* (2009) ont remarqué que le traitement des rats males avec l'extrait hydro-éthanolique de la pulpe des fruits de CCT pendant un mois conduit à une diminution significative du taux de glucose sanguin et à une augmentation du taux d'insuline plasmatique avec réduction de l'activité du glucose-6-phosphatase et du fructose-1,6- diphosphatase.

Les mécanismes possibles pour cette action hypoglycémiant impliquent probablement une stimulation du transport du glucose sanguin vers les tissus périphériques, ou bien une potentialisation de la sécrétion pancréatique d'insuline. Cette hormone conduit ainsi à une augmentation de l'activité de l'enzyme glycolytique l'hexokinase et une réduction de l'activité du glucose-6-phosphatase et du fructose-1,6-diphosphatase, deux enzymes de la gluconéogenèse (Mayes, 1983; Dallak *et al.*, 2009).

Les effets hypoglycémiant pourraient aussi être dus à des lésions au niveau des intestins et des tubules proximaux rénaux avec une réduction subséquente de la régulation du transport du glucose (Shafaei *et al.*, 2012).

Le rein est la deuxième cible commune de lésions chimiques (Hook et Goldstein, 1993; Commandeur et Vermeulen, 1990). Ceci est dû au fait que de nombreux produits chimiques sont excrétés dans les urines. Cet organe vital exerce une influence majeure dans la régulation de la composition du sang pour maintenir les mécanismes homéostatiques internes.

Les reins possèdent la capacité de filtrer, par l'intermédiaire des glomérules, toute une gamme de substances endogènes du plasma, telles que: la créatinine, l'urée, les électrolytes et les protéines. Puisque la créatinine et l'urée sont normalement filtrées du plasma et réabsorbées ou sécrétées seulement par le tubule proximal dans une moindre mesure, ces deux marqueurs sont utilisés comme indices de dépurabilité rénale. L'élévation du taux de créatinine et d'urée dans le sang témoigne d'une atteinte rénale (Wurochekke *et al.*, 2008). La créatinine plasmatique est généralement considérée comme un meilleur marqueur de la fonction glomérulaire comparativement à l'urée (Evans, 1986; Grottsch et Hadju, 1987).

L'élévation significative des taux sériques de certains indices de la fonction rénale : acide urique, urée, créatinine et certains électrolytes après traitement aigu et subaigu avec de

l'extrait des fruits du colocynth, révèle une altération de la fonction rénale due à l'extrait alcoolique des fruits.

La toxicité de *C. colocynthis* à des doses importantes a été rapportée dans les études expérimentales chez les animaux et chez hommes (Elawad *et al.*, 1984 ; Goldfain *et al.*, 1989; Al-Faraj, 1995; Bakhiet et Adam, 1995). Cette toxicité est marquée par une hépatotoxicité, repérée par une inhibition de la synthèse des protéines dans le foie, augmentation des taux des transaminases hépatiques, du lactate déshydrogénase (LDH) et de la phosphatase alcaline, ainsi qu'une diminution de la concentration d'albumine dans le sérum, et une néphrotoxicité repérée par une augmentation des taux de créatinine et d'urée.

Al-Yahya *et al.* (2000) ont constaté un effet toxique, non fatal, des fruits de la coloquinte (*C. colocynthis*) utilisés à 10% dans un régime alimentaire donné aux rats durant 6 semaines. Cette toxicité est confirmée par une diminution significative du poids corporel, du taux de consommation alimentaire et une atteinte hépatique (marqué par une augmentation de l'activité enzymatique d'AST, ALT et ALP) et rénale (augmentation significative d'urée plasmatique).

### Résultats des études histologiques

Les résultats de l'étude histopathologique du foie révèle que l'administration orale de l'extrait du fruit de CCT à des rats dans les conditions de la toxicité aiguë et subaiguë cause des endommagements hépatiques essentiellement traduits sous forme d'une congestion sanguine. Dans l'étude de la toxicité subchronique, en plus d'une importante congestion vasculaire, l'extrait brut administré pendant trois mois conduit à l'apparition de foyer de fibrose qui dissocie les hépatocytes.

Ces données se trouvent en accord avec les résultats trouvés par Khatibi (2012) qui a observé de petits foyers hémorragiques au niveau de plusieurs lobes avec congestion des veines centrales et des sinusoides hépatiques après l'administration intrapéritonéale de l'extrait alcoolique du *C. colocynthis*. La congestion était également accompagnée d'une inflammation légère avec infiltration mixte de neutrophiles et de lymphocytes avec constatation de nécrose hépatocellulaire. En outre, l'administration de l'extrait éthanolique des fruits de CCT par voie orale à des souris a induit des lésions caractérisées par une infiltration élevée de cellules mononucléaires dans le parenchyme hépatique en plus de la présence de lymphocyte entourant les vaisseaux sanguins (Jaafar, 2011).

Les résultats de l'étude histopathologique des reins révèlent que le parenchyme rénal est le siège d'une congestion vasculaire plus importante que celle remarquée au niveau du foie.

De même, le tissu interstitiel des reins est le siège d'une inflammation subaiguë discrète faites de petits amas de lympho-plasmocytaires.

Ces changements histologiques notés au niveau du foie et des reins indiquent l'action toxique de l'extrait brut du CCT et sont confirmé par des niveaux élevés de certains paramètres biochimiques tels les activités des transaminases (AST, ALT), le taux d'urée, de créatinine et de certains électrolytes.

Par ailleurs, la congestion sanguine observée au niveau des coupes histologiques du foie et des reins des animaux traités pourrait être le résultat d'une augmentation de la perméabilité vasculaire. Pour vérifier cette hypothèse, une évaluation de la perméabilité vasculaire au niveau du foie et des reins des rats males traités par l'extrait méthanolique de CCT (265 mg/kg) par voie orale pendant une semaine a été réalisée par l'injection intraveineuse du bleu d'Evans chez l'animal.

Le bleu d'Evans est un colorant qui lie l'albumine. Dans les conditions physiologiques, l'endothélium sain est imperméable à l'albumine et empêche l'extravasation du colorant dans les tissus vascularisés voisins de sorte que l'albumine liée au bleu Evans reste restreint dans les vaisseaux sanguins.

Dans les conditions pathologiques qui favorisent une perméabilité vasculaire accrue, les cellules endothéliales perdent partiellement leurs contacts étroits et l'endothélium devient perméable aux petites protéines telles que l'albumine. Cette condition permet l'extravasation du bleu d'Evans dans les tissus. Les organes avec une perméabilité accrue montreront une augmentation significative de la coloration bleue par rapport aux organes à endothélium intact.

Le dosage du bleu Evans révèle une augmentation significative des quantités de ce colorant au niveau du foie et des reins des animaux traités par l'extrait de CCT comparativement aux rats témoins. Cette augmentation indique l'extravasation de ce marqueur depuis les vaisseaux sanguins vers le tissu hépatique et rénal suite à une augmentation de la perméabilité vasculaire.

L'augmentation de la perméabilité vasculaire peut être due à la présence des cucurbitacines dans l'extrait de la plante. En effet, il a été rapporté que la cucurbitacine D augmente la perméabilité vasculaire ce qui conduit à une diminution de la pression artérielle et l'accumulation du fluide dans la cavité abdominale des souris (Puri *et al.*, 2010).

Cette stase vasculaire peut être considérée comme une phase d'ischémie pendant laquelle la formation des radicaux libres peut être favorisée. En effet, une augmentation

significative du taux de peroxydation lipidique est notée dans le présent travail au niveau de du foie et des reins des animaux traités en comparaison au groupe témoin.

Cette peroxydation pourrait être le résultat d'une augmentation du taux de production de radicaux libres. En effet, il a été rapporté que le CCT était capable d'augmenter le dommage oxydatif (Shivakumar et Geoffrey, 2000). D'un autre coté, il a été rapporté que l'incubation de l'extrait de CCT en présence des microsomes hépatiques de rats stimule la peroxydation lipidique et la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Barth *et al.*, 2002).

***CHAPITRE V :***  
***Conclusion générale***

Les renseignements tirés à partir de l'ensemble des résultats présentés dans ce travail sur les données expérimentales de la toxicité aiguë chez les rats mâles *Albino Wistar* suggèrent de classer *Citrullus colocynthis* dans la catégorie des plantes modérément toxique par voie orale pour les rats mâles. L'extrait méthanolique de cette plante peut entraîner des symptômes de toxicité qui sont dépendante de la dose allant d'une simple somnolence, une perte d'appétit, des problèmes de respiration et une accélération du rythme cardiaque, arrivant jusqu'aux convulsions, tremblements, coma, paralysie puis la mort. Ces effets pourraient être du à la présence des de plusieurs substances toxiques : alcaloïdes, saponines, cucurbitacines et glycosides cardiotoniques. De plus, l'étude de la toxicité subaiguë démontre que l'extrait aqueux de la coloquinte agit sur la croissance normale des rats mâles et perturbe quelques paramètres hématologiques et biochimiques liés à la fonction hépatique et rénale. L'observation histologique s'est caractérisée essentiellement par des congestions sanguines au niveau du foie et des reins.

L'emploi continu de cette plante peut entraîner des effets secondaires pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu. Le risque causé serait en corrélation étroite avec la dose administrée.

En perspectives, ce travail constitue une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant:

- Des expériences ultérieures utilisant des extraits purifiés pour identifier précisément les composés responsables des effets toxiques;
- Isolement des alcaloïdes, des cucurbitacines, des saponines et des glycosides cardiotoniques de cette plante et leurs applications dans des essais de toxicité pour une identification plus précise du principe actif toxique de cette espèce.
- Des tests complémentaires de toxicité sur *Citrullus colocynthis* par d'autres voies que celle orale;
- L'augmentation de la peroxydation lipidique dans les globules rouges pourrait être également due à une inhibition ou à une modification de l'activité des composants non enzymatiques et enzymatiques du système antioxydant (le taux de glutathion réduit (GSH) et les activités du superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT)).
- Recherche des autres mécanismes possibles derrière la toxicité de la plante à travers des études *in vivo* et *in vitro*.

Par conséquent, une prudence est nécessaire dans l'utilisation de cette plante et des efforts doivent être exercés pour identifier les plantes utilisées dans la médecine traditionnelle ayant des indices thérapeutiques étroits car leur utilisation est dangereuse et devrait être soigneusement étudiée.

*Références*  
*Bibliographique*

## -A-

- Abdel-Hassan, I.A., Abdel-Barry, J.A., Mohammed, S.T. (2000): The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 325-30.
- Adam, S. E., Al-Yahya, M. A., Al-Farhan, A. H. (2001b): Combined toxicity of *Cassia senna* and *Citrullus colocynthis* in rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, **43** (2): 70-2. Avril
- Adam, S.E., Al Yahya, M.A., Al Farhan, A.H. (2001a): Response of Najdi sheep to oral administration of *Citrullus colocynthis* fruits, *Nerium oleander* leaves or their mixture. *Small Rumin. Res*, **40**:239-244.
- Afifi, M.D, Sayed, M.S, Balbaa, S.I. (1973): Nitrogenous bases of different organ of *Citrullus colocynthis*. *Planta Med*, **24**: 260-265.
- Aggel, A. M., Mossa, J. S., Tariq, M., Al-Yahia, M. A., Al-Said, M. (1987): Plants used in Saudi folk medicine. Riyadh: KACST, King Saudi University Press.
- Al-Faraj, S. (1995): Haemorrhagic colitis induced by *Citrullus colocynthis*. *Ann Trop Med. Parasitol*, **89** (6): 695-696.
- Al-Ghaithi, F., El-Ridi, M.R., Adeghate, E., Amiri, M.H. (2004): Biochemical effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **261**:143–149.
- Al-hejjaj, MY., Alhurba, Y.A., Mohamad, S.A. (2010): Study of alkaloid extract from *Citrullus colocynthis* fruit and its antimicrobial activity screening. *Journal of Basrah Researches (Sciences)*, **36**(4): 42- 47.
- Ali, A.A., Alian, M.A., Elmahi, H.A. (2013): Phytochemical analysis of some chemical metabolites of Colocynth plant (*Citrullus colocynthis* L.) and its activities as antimicrobial and antiplasmodial. *Journal of Basic and Applied Scitific Research*, **3**: 228–236.
- Ali, A.A.N., Al-rahwi, K., Lindequist, U. (2004): Some medicinal plants used in Yemeni herbal medicinal to treat Malaria. *Afr. J. Trad. CAM.*, **1**:72-76.
- Almdal, J.P, Vilstrup, H. (1988): Strict insulin therapy normalizes organ nitrogen contents and the capacity of urea nitrogen synthesis in experimental diabetes in rats. *Diabetologia*, **31**: 114-118.
- Al-Qura'n, S. (2005): Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. *Toxicol.*,**46**: 119-129.
- Al-Snafi, A.E. Medicinal plants with anticancer effects (part 2)-plant based review. (2016): *Sch Acad J Pharm*. **5**(5): 175- 93.
- Al-Yahia, M.A., Al-Farhan, A. H., Adam, S. E. I. (2000): Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *Citrullus colocynthis* and *Nerium oleander* in rats. *Fitoterapia*, **71**: 385- 391.
- Amamou, F., Bouafia, M., Chabane-Sari, D., Meziane, R.K., Nani,A. (2011) : *Citrullus colocynthis*: a desert plant native in Algeria, effects of fixed oil on blood homeostasis in Wistar rat. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, **1**(3): 1-7.
- Ambi, A.A., Abdurrahman, E.M., Sule, M.I., Pateh, U.U., Abdurrahman, Y.R., Ibrahim, N.D.G. (2007): Phytochemical screening and histopathological Studies on the Seeds of *Citrullus colocynthis* in Albino Rats. *Nig Journ Pharm Sci*, **6**(2): 7-13.

Aminin, D.L., Osipov, A.N., Korepanova, E.A., & Anisimov, M.M. (1989): Effect of holotoxin A1 on microviscosity of model and biological membranes. *Biofizika, Mar*; 34(2): 318-9.

Angiosperm Phylogeny Group (1998): An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **85**: 531–553.

Angiosperm Phylogeny Group (2003): An update of the angiosperm phylogeny classification for the families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **141**: 399–436.

Angiosperm Phylogeny Group (2009): An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGIII. *Bot. J. Linn. Soc.*, **161**:105-121.

Apers, S., Baronikova, S., Sindambiwe, J.B., Witvrouw, M., De Clercq, E., Vanden Berghe, D., Van Marck, E., Vlietinck, A., Pieters, L. (2001): Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure-activity relationships. *Planta Med.*, **67**(6):528-32.

Asyaz, S., Khan, F.U., Hussain, I., Khan, M.A., Khan, I.U. (2010): Evaluation of chemical analysis profile of *Citrullus colocynthis* growing in Southern area of Khyber Pukhtunkhwa, Pakistan. *World Applied Sciences Journal*, **10**: 402–405.

Azzi, R. (2012) : Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien : enquête ethnopharmacologique ; Analyse pharmaco-oxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse de doctorat en Biochimie, Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen, 214p.

**-B-**

Baba Aissa, F. (1999) : Encyclopédie des plantes utiles. Edition : Librairie Moderne-Rouiba,

Badifu, G.I.O. Ogunsua, A.O. (1991) : Chemical composition of kernels from some species of Cucurbitaceae grown in Nigeria. *Plants Food for Human Nutrition*, **41**: 35-44.

Bahorun, T. (1997) : Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*: 83-94.

Bakhiet, A.O., Adam, S.E.I. (1995): An estimation of *Citrullus colocynthis* toxicity for chicks. *Veterinary and Human Toxicology*, **37**: 356-8.

Banerjee, S. P., Dandiya, P. C. (1967): Smooth muscle and cardiovascular pharmacology of - elaterin-2-D-glucopyranoside glycoside of *Citrullus colocynthis*. *Journal of pharmaceutical science*, **56**(12): 1665–1667

Barceloux, D. G. (2008): Chapter 60: Colocynth [*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad.]. In Medical toxicology of natural substances. Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals. Wiley & Sons, Inc., (pp: 443-445), Hoboken, New Jersey; USA.

Barri, M.E., Onsa, T.O., Elawad, A.A., Elsayed, N.Y., Wasfi, I.A., Bari, E.M., Adam, S.E.(1983):Toxicity of five Sudanese plants to young ruminants. *Journal of Comparative Pathology*. **93**: 559 – 575.

Bartik, M., Piskac, A. (1980): Veterinary Toxicology. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam, Oxford, New York.

- Barth, A., Muller, D., Durriling, K. (2002): In vitro investigation of a standardized dried extract of *Citrullus colocynthis* on liver toxicity in adult rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **54** (3): 223-30.
- Batanouny K.H., Abou Tabl S., Shabana M., Soliman F. (1999): Wild medicinal plants in Egypt, An Inventory to Support Conservation and Sustainable Use. Chapitre 2: Pharmacopoeial Wild Medicinal Plants in Egypt Academy of Scientific Research and Technology, Egypt International Union for Conservation (IUCN). p: 613.
- Batt, A.M., Siest, G. (1973): Drug and reference values in clinical enzymology. CR 5<sup>th</sup> international Symposium on Clinical Enzymology, Burlina ed. Milan; 1:173-181.
- Behrens, B., Karber, C. (1935): How arrange most convenient series of biological tests for evaluations. *Archiv. Für. Exp. Pathol. und Pharmak.*, **177**: 379–388.
- Ben Hsouna, A., Alayed, A.S. (2012): Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis and in vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) roots to control pathogen and spoilage bacteria. *African Journal of Biotechnology*, **11**(47): 10753-10760.
- Benariba N., Djaziri R., Bellakhdar W., Belkacem N., Kadiata M., Malaisse W. J., Sener A. (2013): Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pac J Trop Biomed.* **3**(1): 35-40.
- Benhsain, N. (2005): *Lymantria dispar* (L): Etude de la diapause. Impact des ennemis naturels et effets des extraits de deux plantes: *Citrullus colocynthis* et *Peganum harmala*. Faculté des sciences de Rabat, Maroc.
- Benmehdi, H., Azzi, R., Djaziri, R., Lahfa, F., Benariba, N., Tabti, B. (2011): Effect of saponosides crude extract isolated from *Citrullus colocynthis* (L.) seeds on blood glucose level in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5** (31): 6864-6868.
- Berrut, C., Bisetti, A., Widgren, S., Tissot, I.D., Loizeau, E. (1987): Colite pseudo-membraneuse causée par l'ingestion de coloquinte. *Schweiz Med Wschr*, **117**: 135-138.
- Bharate, S.B., Olier, G. (2006): Antidiabetic Medicinal Plants. In: Medicinal Plants: Ethnobotanical Approach (Eds. P.C. Trivedi), Agrobios Publisher, Jodhpur; 85-106.
- Bireche M., Gherib A., Bakchiche B., Berrabah M., Maatallah M. (2017) : Positional distribution of fatty acids in the triglycerides of *Citrullus Colocynthis* seed oil growing in Algeria. *JMES*, **8**: (2): 622-627.
- Blacow, N.W., Wade, A., (1972): Martindale The Extra Pharmacopoeia. 26<sup>th</sup> ed. London: The Pharmaceutic Press, p. 1627–1628.
- Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., Sebti, SM. (2003): Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res.* **63**: 1270–9.
- Bnyan, I., Hasan, H., Ewadh, M. (2013): Antibacterial Activity of *Citrullus Colocynthis* against different types of bacteria. *Advances in Life Science and Technology*, **7**: 48 -51.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001): Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, **161**: 839 -851.

Bouزيد, W. (2009) : Etude de l'activité Biologique des extraits du fruit de *Crataegus monogyna jacq.* Mémoire de Magister. Université Elhadj Lakhder -Batna.

Broadley, K.J., Kelly, D.R. (2001): Muscatine Receptor Agonists and Antagonists. *Molecules*, **6**: 142-193.

Bruneton, J. (1999) : Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. pp: 659-718. 3<sup>ème</sup> Edition, *Tec et Doc*, Paris.

-C-

Chen, J.C., Chiu, M.H., Nie, R.L., Cordell, G.A., Qiu, S. (2005) : Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.*, **22**:386-399.

Chenni, M. (2010) : Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale: *Bryonia dioica Jacq.* Mémoire de Magister en Chimie. Université d'Oran ES-SENIA, pp: 1- 138.

Commandeur, J.N.M., Vermeulen, N.P.E. (1990) : Molecular and biochemical mechanisms of chemically induced nephrotoxicity: a review. *Chem Res Toxicol.*, **3**:171.

Cronquist, A. (1988): The evolution and classification of flowering plants. 2<sup>nd</sup> ed. Bronx, N.Y., USA: New York Botanical Garden.

-D-

Dafni, A., Lev, E. (2002) : The doctrine of signatures in present day Israel. *Economic Botany*, **56**(4): 328-334.

Dahmén, J., Leander, K. (1976): The structure of parishin, a glucoside from *Vanda parishii*. *Phytochemistry*, **15**: 1986-1987.

Dallak, M., Bashir, N., Abbas, M., Elessa, R. Haidara, M., Khalil, M., AL-Khateeb, M. A. (2009): Concomitant Down Regulation of Glycolytic Enzymes, Upregulation of Gluconeogenic Enzymes and Potential Hepato-Nephro-Protective Effects Following the Chronic Administration of the Hypoglycemic, Insulinotropic *Citrullus colocynthis* Pulp Extract. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **5** (4): 153-161.

Dallak, M. (2011): In vivo, hypolipidemic and antioxidant effects of *Citrullus colocynthis* pulp extract in alloxan-induced diabetic rats. *African Journal of Biotechnology*, **10**: 9898–9903.

Dane, F. Liu, J., Zhang, C. (2007): Phylogeography of the Bitter Apple, *Citrullus Colocynthis*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54** (2): 327–336.

Daniel, D. (2006) : Médicinal plantes, Etats Unis, p111.

Daradka, H., Almasad, M.M., Qazan, W.S., El-Banna, N.M., Samara, O.H. (2007) : Hypolipidamic effects of *Citrullus colocynthis* L. in rabbits. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **10**: 2768–2771.

Darwish-Sayed, M., Balbaa, S.I., Afifi, M.S.A. (1973): Nitrogenous base of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Medica*, **24** (3): 260-265.

Darwish-Sayed, M., Balbaa, S.I., Afifi, M.S.A. (1974): The glycosidal content of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Medica*, **26**: 293-298. 35.

Debnath, P.C., Das, A., Islam, A. (2013): Membrane stabilization: A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of a Bangladeshi medicinal plant: *Erioglossum rubiginosum* (Bara Harina). *Pharmacogn. J.*, **5**: 104–107.

Deghani, F., Panjehshahin, M.R. (2006): The toxic effect of alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* on rat liver. *J. Pharmacol. Ther.*, **5**: 117-119.

Delazar, A., Gibbons, S., Kosari, A.R., Nazemiyeh, H., Modaresi, M., Nahar, L., Satyajit, D.S. (2006): Flavone C-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *DARU*, **14**:109-114.

De Smet, P. A. G. M., Keller, K., Hänsel, R., Chandler, R. F. (1997): *Citrullus colocynthis*. In Adverse Effects of Herbal Drugs. Springer (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 29- 36.

Dey, A. C. (1980): Indian medicinal plants used in Ayurvedic preparations. Bishen Sigh, Mahendra Pal Sigh, Dehra Dun-202p.

Diwan, F.H., Abdel-Hassan, I. A., Mohammed, S.T. (2000): Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. *Eastern Mediterranean Health Journal*, **2**(3): 345-351.

Dragstedt, A., Lang, B. (1957) : Etude de la toxicité par administration unique d'un nouveau médicament. *Annales Pharmaceutiques Français*, **11**.

Duke, J. A., Duke P. K. DuCellie J. L. (2008) : Duke's handbook of medicinal plants of the bible. Taylor & Francis Group, CRC Press, 6000 Broken, USA.

Duncan, K. L., Duncan, M. D., Alley, M. C., Sausville, E.A. (1996): Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, **52**: 1553–60.

Duncan, M. D., Duncan, K. L. (1997): Cucurbitacin E targets proliferating endothelia. *J Surg Res*, **69**:55–60.

-E-

Elawad, A.A., Abdel-Bari, E.M., Mahmoud, O.M., Adam, S.E. (1984) : The effect of *Citrullus colocynthis* on sheep. *Veterinary and Human Toxicology*, **26**: 481-485.

ElFennouni, M. (1985) : Les plantes réputées abortives dans les pratiques traditionnelles d'avortement au Maroc. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V. Casablanca, Maroc.

Elgerwi, A. A., Benzekri, Z., El-Magdoub, A., ElMahmoudy A. (2013): Qualitative identification of the active principles in *Citrullus colocynthis* and evaluation of its teratogenic effects in albino rats. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, **2**(4): 438- 45.

Elgerwi, A., Benzekri Z., Awaidat S., El-Magdoub A., Abusnina1 A., El-MahmoudyA. (2013): Subchronic haemotoxicity and histotoxicity of *Citrullus colocynthis*. *Journal of American Science*, **9**(5): 79- 87.

Evans, G. O. (1986): The use of an enzymatic kit to measure creatinine in the mouse and three other species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **85B** : 93-5.

-F-

Farzaneh, D., Mohammad, R. (2006): The toxic effect of alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* on rat liver. *Iranian J. of Pharmacology and Therapeutics*, **5**: 117-119.

Felter, H.W. (1922): Monographs extracted from: The Eclectic Materia Medica, Pharmacology and Therapeutics. Reprinted and abridged by southwest school of botanical medicine, pp: 117-119. Bisbee, Arizona.

Fursa, T.B. (1972): Sistematike roda citrullus Schrad. Bot. Z. **57**(1): 31–41. Dans P. Nimmakayala, N. Islam-Faridi, Y.R. Tomason, F. Lutz, A. Levi, and U.K. Reddy. Chapter 5: Citrullus. Dans: C. Kole (ed.), Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Vegetables, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011. pp 59-66.

Foreston, W.C., Tedesco, F.J., Starnes, E.C. (1985): Marked elevation of serum transaminase activity associated with extrahepatic biliary tract disease. *J. Clin. Gastroenterol.*, **76**: 502–505.

**-G-**

Gacem, M.A., Aminata, O.K., Gacemi, B. (2013): Evaluation of antifungal effect of organic extracts of Algerian *Citrullus colocynthis* seeds against four strains of Aspergillus isolate from wheat stored. *J. Med. Plants. Res.*, **7**(12):727-733.

Goldfain, D., Lavergne, A., Galian, A., Chauveinc, L., Prudhomme, F. (1989) : Peculiar Acute Toxic Colitis after Ingestion of Colocynth a Clinicopathological Study of Three Cases. *Gut*, **30**: 1412-8.

Gorshkova. I.A, Kalinin, V.I., Gorshkov, B.A., & Stonik, V.A. (1999): Two different modes of inhibition of the rat brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase by triterpene glycosides, psolusosides A and B from the holothurian (Psolus fabricii). *Comp. Bioch. And Physiol. Part C*, **122**: 101–108.

Grotsch, H., Hadju, P. (1987): Interference by the new antibiotic cefiprome and other cephalosporins in clinical laboratory test, with specific regard to the Jaffe reaction. *J. Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **25**: 49- 52.

Gry, J., Soborg, I., Andersson, H.C. (2006): Cucurbitacins in plant food. Tema Nord. 556. Nordic Council of ministers, Copenhagen.

Gurudeeban, S., Rajamanickam, E., Ramanathan, T., Satyavani, K. (2010): Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* in gulf of mannar. *Inter. J. Curr. Res.*, **2**: 078-081.

Gurudeeban, S., Ramanathan, T., Satyavani, K. (2011): Characterization of volatile compounds from bitter apple (*Citrullus colocynthis*) using GC–MS. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, **2**:108–110.

Gurudeeban, S., Satyavani, K. Ramanathan, T. (2010): Bitter apple (*Citrullus colocynthis*): An Overview of Chemical Composition and Biomedical Potentials. *Asian Journal of Plant Sciences*, **9** (7): 394-401.

**-H-**

Habs, M., Jahn, S.A., Schmähl, D. (1984): Carcinogenic activity of condensate from coloquint seeds (*Citrullus colocynthis*) after chronic epicutaneous administration to mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **108** (1): 154-156.

Hammiche, V., Merad, R., Azzouz, M. (2013): Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Paris, Springer, 447P.

Hanifi, N. (1991): Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication de Actes éditions: 47-49.

Harborne, J. B. (1973): Phytochemical methods. pp: 49-188. London. Chapman and Hall, Ltd.

Harsh, M.L. (1989): Tropane alkaloids from *Lycium barbarum* Linn, in vivo and in vitro. *Current Science*, **58**: 817–818.

Hartwell, J. (1969): Plants used against cancer. A survey. *Lloydia*, **32**: 78- 107.

Hatam, N.A.R., Whiting, D.A., Yousif, N.J. (1990): Lipids and sterols of *Citrullus colocynthis*. *Int. J. Crude Drug Res.*, **28**: 183-184.

Heravi, M. (1992): Alabnya an al-Haghayegh al-Advia [in Persian]. Tehran, Iran: Tehran University.

Hook, J.B., Goldstein, R.S. (1993): Toxicology of the Kidney, 2<sup>nd</sup> edn. New York: Raven Press, pp. 61-97.

Husain, A., Virmani, O. P., Popli, S. P., Misra, L. N., Gupta, M. M., Srivastava, G. N. Abraham, Z. and Singh, A. K. (1992): Dictionary of Indian Medicinal Plants. CIMAP, Lucknow, India; 546p.

Huseini, H.F., Darvishzadeh, F., Heshmat, R., Jafariazar, Z., Raza, M., Larijani, B. (2009): The clinical investigation of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad fruit in treatment of Type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research*, **23**(8): 1186- 9.

Hussain, A.I., Rathore, H.A., Sattar, M.Z.A., Chatha, S.A.S., Ahmad, F., Ahmad, A., Johns, E.J. (2013): Phenolic profile and antioxidant activity of various extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) from the Pakistani flora. *Industrial Crops and Products*, **45**:416–422.

**-I-**

Ibn Sina. Al Qanun Fi al-Tibb. (2005): Persian translated by Sharafkandi A. Tehran, Iran: Soroush Press.

Ickert, G. Toxicology of Colocynth. (1980): ZentralblPharma. Pharmakother. Laboratoriums Diagn.; pp. 118.

Irons RD. (1985): Toxicology of the Blood and Bone Marrow. New York: Raven Press.

**-J-**

Jaafar, F.R. (2011): Toxicity of different doses of alcoholic extract for *Citrullus Colocynthis* fruits in mice. *Al-Anbar J. Vet. Sci.*; 4 (2): 108-115.

Jadhav, J.H., Balsara, J.J., Chandorkar, A.G. (1983) : Involvement of histaminergic mechanism in the cataleptogenic effect of clonidine in mice. *Pharm Pharmacol.*, **35**:671-673.

Jarret, RL, Newman, M. (2000): Phylogenetic relationships among species of *Citrullus* and the placement of *C. rehmii* De Winter as determined by internal transcribed spacer (ITS) sequence heterogeneity. *Genet Resour Crop Evol*, 47:215–222.

Javadzadeh HR<sup>1</sup>, Davoudi A, Davoudi F, Valizadegan G, Goodarzi H, Mahmoodi S, Ghane MR, Faraji M. (2013): *Citrullus colocynthis* as the Cause of Acute Rectorrhagia. *Case Rep Emerg Med*. 652192.

Jayaprakasam, B., Seeram, N. P., Nair, M. G. (2003): Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett*, **189**:11–6.

Jayaraman, R., Shivakumar, A., Anitha, T., Joshi, V.D., Palei, N.N. (2009): Antidiabetic effect of petroleum ether extract of *Citrullus colocynthis* fruits against streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *ROM. J. Biol. Plant. Biol.*, **54**(2): 127-134.

Jeffrey, C. (2001). Cucurbitaceae (citrullus). In: Hanelt P and IGCPR (eds) Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops. Springer, New York, NY, USA, pp 1533–1537.

Jeyanthi K.A. (2011): Antioxidant effect of *Citrullus colocynthis* on alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, **2**(2):696-701

Jigna, P., Sumitra, V. C (2007): In vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical: Analysis of Some Indian Medicinal Plants. *Turk. J. Biol.*, **31**: 53-58.

Joshi, S.G. (2000): Medicinal plants. Oxford & IBH publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi; 491.

Jothy, S. L., Zakaria Z., Chen, Y., Lau, Y. L., Latha, L. Y., Sasidharan, S. (2011): Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice. *Molecules*, **16**, 5268-5282.

**-K-**

Kalhor, M.A., Afza, N., Saleem, M., Malik, A. (2002): Pharmacochemical studies of the oil, aerial parts, pulp and peel of *Citrullus colocynthis*. *Journal of Chemical Society of Pakistan*, **24**: 274–276.

Keller K. A., Banks C. (2006): Chapter 7: Multidose general toxicology studies. In: Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation. Second Edition. pp 149- 184. Informa health care. New York, USA. Inc.

Khan, S. A., Shelleh, H. H., Bhat, A. R., and Bhat K. S. (2003): “Colocynth toxicity. A possible cause of bloody diarrhea,” *Saudi Medical Journal*, **24** (8): 904–906.

Khare, C. P. (2004): Indian medicinal plants. *Springer; New York, USA, ISBN:978-0-387-70637-5: 152.*

Khatibi R. (2012): Relationship between Alcoholics Extract of *CitrullusColocynthis* and Rat Liver (Case Study: Iran-south East of Iran). *Journal of Agricultural Science*, **4**(1): 219-222.

King R. D., Onuora, O.J. (1984): Aspects of Melon Seed Protein Characteristics. *Food Chemistry*, **14**: 65-77.

Kingsbury, J.M. (1964): Poisonous Plants of the United States and Canada. Englewood Cliffs, New Jersey.

Kingsbury, J. M. (1980): Phytotoxicology. In: Doull, J., Klaassen, G. D., Amdour, M. O., eds. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. pp: 578-90. New York, MacMillan Publishing Company.

Kirtikar, KR, Basu, BD. (2001): Indian medicinal plants with illustration, Oriental enterprises. *Uttranchal*, **7**:1594-1598.

Kolanjiappana, K., Manoharana, S., Kayalvizhib, M. (2002): Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin Chim Acta.*, **326**(1-2): 143-9.

Kram, D. J., Keller, A. (2006): Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation. Second Edition. Informa healthcare. New York, USA. Inc.

Kumar, S., Kumar, D., Manjusha, Saroha K., Singh N., Vashishta B. (2009): Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmaceutica*, **58**:215-221.

Kumar, G., Sharmila Banu, G., Vanitha Pappa, P., Sundararajan, M., Rajasekara Pandian, M. (2004): Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *J. Ethnopharmacol.*, **92**: 37-40.

-L-

Lewin, L. (1962): Gifte und Vergiftungen. Lehrbuch der Toxikologie. Fünfte unveränderte Ausgabe. Ulm/Donau: Karl F. Haug Verlag, pp.722–723.

Li, G. X., Liu, Z. Q. (2008): The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food and Chemical Toxicology*, **46**(3): 886-892.

Likhatskaia, G.N., Iarovaia, T.P., Rudnev, V.S., Popov, A.M., Anisomov, M.M. (1985): Formation of the complex of the triterpene glycoside holothurin A with cholesterol in liposomal membranes. *Biofizika. Mar-Apr.*, **30**(2):358-9.

Lloyd, J. U., Cincinnati, O. (1898). *Citrullus colocynthis*, botanical description, habitat and cultivation. Reprinted from the Western Druggist, Chicago. pp: 1-11.

Litchfield, J.T., Wilcoxon F. (1949): A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol.* **96**: 99-113.

Liu, T., Zhang, M., Zhang, H., Sun, C., Yang, X., Deng, Y. J.W. (2008b): Effects of cucurbitacin B on cell proliferation and apoptosis in Hep-2 cells. *Lin Chung Er Bi Yan HouTouJing WaiKeZaZhi.*, **22**: 403–407.

Liu, T., Zhang, M., Zhang, H., Sun, C., Yang, X., Deng, Y.J.W. (2008a): Combined antitumor activity of cucurbitacin B and docetaxel in laryngeal cancer. *European Journal of Pharmacology*, **587**: 78–84.

Loiseleur, J. (1963) : Chapitre II : Techniques de laboratoire. Tome II. 3<sup>ème</sup> Edition. Ed. Masson, Paris, pp: 3389: 491.

Lompo, M., Guissou, I.P., Kabore, I.Z., Sawadogo M. (1995): Effet hypothermisant et toxicité générale aigue chez les souris des écorces de tronc de Kase. *Pharm. Med. Trad. Afr.*, pp: 73- 80.

Loomis, T.A., Hayes, A.W. (1996). Chapter 2: *Numbers in Toxicology*. In: Loomis's Essentials of Toxicology, p:17- 32. 4<sup>th</sup> Edition. Academic Press, California.

Lordal, M., Hallgren, A., Nylander, O., Hellstrom, P. M. (1996): Tachykinins increase vascular permeability in the gastrointestinal tract of the rat. *Acta Physiol Scand*, **156**: 489-494.

Louiz, I., Sellem, F., Tekitek, A., Langar, H., El Abed, A. (2003) : Etude des saponines isolées d'une espèce D'Holothurie holothuria tubulosa de la lagune de bizerte. *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô*, **30** : 115-120.

-M-

Maatoq, G.T., EL-Sharkawy, S.H., Afifi, M.S., Rosazza, J.P.N. (1997) : C-p- Hydroxy-benzoyl-glycoflavones from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry*. **44**: 187-190.

Mali, P.C., Chaturvedi, M., Ansari, A.S., Dixit, V.P. (2001): Antispermatic effects of an ethanol extract of *Citrullus colocynthis* root in male albino rats. *J. Pharmacognosy*, **39** (2): 113-119.

- Mansour, M.A., El-Din, A.G., Nagi, M.N., Al-shabanah, O.A. Al-Bekairi, A.M. (2003): Nomega-nitro-L-arginine methylester ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **36**(6): 593-596.
- Markham, K.R. (1982): Chapter. 1 and 2: Techniques of flavonoid identification. pp: 1-113. Academic press (London).
- Marzouk, B.; Marzouk, Z., Décor, R., Edziri, H., Haloui, E., Fenina, N., Aouni, M. (2009): Antibacterial and Anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. From Medenine. *J Ethnopharmacol*, **125** (2):344-349.
- Marzouk, B., Marzouk, Z., Haloui, E., Fenin, N., Bouraoui, A., Aouni, M. (2010). Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *Journal of Ethnopharmacology*, **128**: 15–19.
- Marzouk, Z., Marzouk, B., Mahjoub, M.A. (2010): Screening of the antioxidant and the free radical scavenging potential of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Mednine. *J Food Agric Environ.*, **8**:261–265.
- Marzouk, B., Marzouk, Z., Haloui, E., Turki, M., Bouraoui, A., Aouni, M. Fenin, N. (2011): Anti-inflammatory evaluation of immature fruit and seed aqueous extracts from several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. *African Journal of Biotechnology*, **10**(20): 4217-4225.
- Marzouk, B., Marzouk, Z., Fenina, N., Bouraoui, A., Aouni, M. (2011): Anti-inflammatory and analgesic activities of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruit and seed organic extracts. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, **15**(6): 665-72.
- Mathew, K.M., Jhon Britto, S. (1981): The flora of the Tamil Nadu Carnatic, First Edition, Trichy, The Rapinat Herbarium.
- Mayes, W.M. (1983): Regulation of Carbohydrates and Lipid Metabolism. In: Harper's Review of Biochemistry, Martine, J.R., V. Rodwell and W. Lange (Eds.), 19th Edn., Medical Publication, pp: 248-264.
- Meena, M.C., Patni, V. (2008): Isolation and identification of flavonoid" quercetin" from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. *Asian J Exp Sci.*, **22**(1): 137-42.
- Mehrzadi, Saeed., Shojaii A., Pur S. A., Motevalian M. (2015): Anticonvulsant Activity of Hydroalcoholic Extract of *Citrullus colocynthis* Fruit Involvement of Benzodiazepine and Opioid Receptors. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, **21** (4): NP 31-NP35.
- Memon, U., Brohi, A.H., Ahmed, S.W., Azhar, I., Bano, H. (2003): Antibacterial screening of *Citrullus colocynthis*. *Pak J Pharm Sci.*, **16** (1): 1-6.
- Metcalf, R. L. (1985). Coevolutionary adaptations of a root-worm beetles (Coleopter: chrysomelidae) to cucurbitacins. *J. Chem. Ecol.*, **12** (5): 1561-1573.
- Meziane, R. K., Khemmar, L., Amamou, F., Yazit, M., Didi, A., Chabane-Sari, D. (2012). Anti-obesity and anti-hyperlipidemic effect of *Citrullus colocynthis* oil in the offspring of obese rats. *Annals of Biological Research*, **3**(5): 2486-2490.
- Milller, R., Auterhoff, H. (1968): Uber Inhaltsstoffe der pharmazeutisch verwendeten Koloquinthen.

- Milovanović, M., Jovanović, K. P. (2007) : Characteristics and composition of melon seed oil. *Journal of Agricultural Sciences*, **50**(1): 41- 47.
- Miro, M. (1995): Cucurbitacins and their pharmacological effects. *Phytotherapy research.*, **9**: 159- 68.
- Mitaliya, K.D., Bhatt, D.C. (2003): Rare and endangered medicinal plants of Gujarat In: Ethnobotany and Medicinal plants of India and Nepal. Volume: 2 (Eds. V., Singh and A.P., Jain), Scientific publishers, Jodhpur; 847.
- Molavi, O., Shayeganpour, A., Somayaji, V., Hamdy, S., Brocks, D.R., Lavasanifar, A. (2006): Development of a sensitive and specific liquid chromatography/mass spectrometry method for the quantification of cucurbitacin I (JSI - 124) in rat plasma. *J Pharm Pharmaceut Sci*, **9**: 158 - 164.
- Mukherjee, A., Patil, S.D. (2012): Effects of alkaloid rich extract of *Citrullus colocynthis* fruits on Artemia Salina and Human Cancerous (MCF-7 AND HEPG-2) cells. *Journal of PharmaSciTEch.*, **1**:15-9.
- Mukinda, J.T., Syce, J.A. (2007): Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**: 138–144.
- N-
- Nadkarni, K.M. (1954): Indian Materia Medica, vol. I. Popular Book Depot, Bombay, pp. 516-518.
- Nadkarni, K. M. (1998): Indian Medicinal Plants and Drugs- with their Medicinal Properties and Uses, pp.450. Asiatic Publishing House, New Delhi.
- Nafisi, S., Rezazadeh, L., Hosseini, E., Shamsi, M., Mousavi, A. B., Bahrami, A. M. (2016): *Citrullus colocynthis* fruit extract as an anti-depressant in mice. *J. Bas. Res. Med. Sci.*, **3**(4):49-55.
- N'guessan, H.A., Evelyne Dago, D.C., Békro, J.A. M., Békro, Y.A. (2011). CCM d'extraits sélectifs de 10 plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'hypertension artérielle en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research, EuroJournals*, **66** (4): 575-585.
- Najafi, S., Sanadgol, N., Nejad, B.S., Beiragi, M.A., Sanadgol, E. (2010): Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Plants Res.*, **4** (22): 2321-2325.
- Nargas, J., Trivedi, P.C. (2004): Plant abortifacients used by tribals of Rajasthan state, India. In: Herbal drugs and Biotechnology (Eds. P.C. Trivedi), Pointer publishers, Jaipur; 240-249.
- Natiq, A.R.H., Donald, A.W., Nahia, J.Y. (1989): Cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry*, **28**: 1268-1271.
- Nayab, D., Ali, D., Arshad, N., Malik, A., Choudhary, M.I., Ahmed, Z. (2006). Cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*, Pakistan. *Dtsch Apoth Ztg* , **108**: 1191-1192
- N'mila, R., Gross, R., Rchid, H., Roye, M., Manteghetti ,M., Petit, P., Tijane, M., Ribes, G., Sauvaire, Y. (2000):. Insulinotropic effect of *Citrullus colocynthis* fruit extracts. *Planta Med*, **66**:418-423.
- Nwaogu, L.A. (2016): Toxicopathological evaluation of *Citrullus colocynthis* seed and pulp aqueous extracts on Albino rats. *World J. Biol. Med. Science*, **3**(2): 76-85.

**-O-**

Oguyemi, A.O. (1979): Proceedings of a Conference on African Medicinal Plants. Ife-Ife: Univ Ife, pp. 20-22.

Ozenda, P. (1991) : Flore et végétation du Sahara. 2<sup>ème</sup> édition. Ed. C.N.R.S. Paris. 662p.

**-P-**

Pascoe, D. Toxicology. (1983): Edward Arnold Limited; London, pp: 1-60.

Patrick, R.L., Willey, E.N., Feter, B.F. (1960): Bitter apple (*Citrullus colocynthis*) poisoning. A discussion of its use as an abortifacient . *N Carolina Med J*, **21**: 23-27.

Pawan, K., Kasera, S.M., Shukla, J.K. (2004): Plants of medicinal value from Thar desert, India. In: Medicinal Plants utilization and conservation (Eds. P.C. Trivedi). Aavishkar publishers, Jaipur; 431.

Perveen, U.B., Roy, S., Kumar, A. (2007): Traditional uses of medicinal plants among the rural communities of Churu district in the Thar desert, India. *Journal of Ethnopharmacology*, **113**: 387-399.

Pottier-Alapetite, G. (1981) : Flore De La Tunisie, Angiospermes-Dicotylédones: Gamopétales. Tunisia: Imprimerie officielle de la république tunisienne.

Power, F. B. Moore, C.W. (1910) : The constituents of colocynth. *Journal of the Chemical Society*. Transactions (London). **97**: 99-110.

Prasanth Reddy, V., Sudheshna, G., Afsar, S.K., Sai Saran, S., Raja Ram, C., Mahaboob basha, K., Mallikarjuna Reddy, M. (2012): Evaluation of Antipyretic Activity of *Citrullus colocynthis* Fruit Extract Against Yeast Induced Pyrexia Model in Wistar rats. *V. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, **4** (2): 446- 451.

Puri, R., Sud, R., Khaliq, A., Kumar, M., Jain, S. (2011): Gastrointestinal toxicity due to bitter bottle gourd (*Lagenaria siceraria*)- a report of 15 cases. *Indian. J. Gastroenterol.*, **30** (5) : 233-236.

**-Q-**

Quezel, P., Santa, S. (1962) : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. (1), p.552. CNRS, Paris.

Quezel, P., Santa, S. (1963) : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, p.902. Ed. CNRS, Paris.

Qureshi, R. Bhatti, G.R., Memon, R. A. (2010): Ethnomedicinal uses of herbs from Northern part of Nara Desert. *Pakistan. Pak. J. Bot.*, **42**(2): 839-851.

**-R-**

Radu, M., Chernoff, J. (2013): An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*. **16**(73): 50- 62.

Rahawi, A. M. Youkana, S.O. (2016): Pathological changes in liver and intestine of rats experimentally intoxicated by the alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* fruits. *Iraqian Revue for veterinary sciences*, **62**: 633-639.

Rahbar, A.R. Nabipour, I. (2010): The hypolipidemic effect of *Citrullus colocynthis* on patients with hyperlipidemia. *Pak J Biol Sci*, **13**(24): 1202-1207.

Rahimi, R., Amin, G., Ardekani, M.R.S. (2012): "A Review on *Citrullus colocynthis* Schrad: from traditional Iranian medicine to modern phytotherapy". *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **18**(6): 551–554.

Rahuman, A.A., Venkatesan, P., Gopsalankrishnan, G. (2008): Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Parasitology Research*, **103**:1383–1390.

Ramanathan, T., Gurudeeban, S., Satyavani, K. (2011): Local anesthetic effect of *Citrullus colocynthis* on *Rana hexadactyla*. *Res. J. Med. Plant.*, **5** (3): 338- 342.

Rasool, R., Ganai, B.A., Akbar, S., Kamili, AN, Masood, A. (2010): Phytochemical screening of *Prunella vulgaris*, An important medicinal plant of Kashmir. *Pak. J. Pharm. Sci.* **23**(4): 399-402.

Rayavara, K. Krishnapura, S. (2004): *British Journal of Nutrition.*, 93: 81-91.

Razi, M. Alhavi fi-al-tib [in Arabic]. (2000): Beirut, Lebanon: Dar Al\_Kotob Al-ilmiyah, pp:20–21.

Rezvani, M., Hassanpour, M., Khodashenas, M., Naseh, G., Abdollahi, M., Mehrpour, O. (2013): *Citrullus colocynthis* (bitter apple) poisoning: a case report. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, **5**: 25-27.

Ribérrreau, G.P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. p 254. Edition Dunod, Paris.

Rjamanickam, E. S., Gurudeeban, S., Ramanathan, T., Satyavani, K. (2010): Evaluation of anti-inflammatory activity of *Citrullus colocynthis*. *Int. J. Curr. Res*, **2**: 67- 69.

Robinson, R.W., Decker-Walters, D.S. (1997): Cucurbits. CABI, Wallingford, Oxfordshire.

Roy, R., Thakur, M., Dixit, V. (2007): Effect of *Citrullus colocynthis* on hair growth in albino rats. *Pharmaceutical Biology.*, **45**(10): 739- 44.

-S-

Sadou, H., Sabo, H., Alma, M.M., Saadou, M., Leger, C.L. (2007): Chemical content of the seeds and physico-chemical characteristic of the seed oils from *Citrullus colocynthis*, *Coccinia grandis*, *Cucumis metuliferus* and *Cucumis prophetarum* of Niger. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **21**: 323–330.

Sain, R.S., Joshi, P., Sharma, S.N. (2004): Etude cytomorphologique dans le genre *Citrullus* (cucurbitacées). Inde.

Salama, H.M. (2012): Alkaloids and flavonoids from the air dried aerial parts of *Citrullus colocynthis*. *J. Med. Plants Res.*, **6**: 5150–5155.

Sanagdol, N., Najafi, S., Vafadar Ghasemi, L., Mottaleb, G., Estakhr, J. ( 2011): A study of the inhibitory effects of *Citrullus colocynthis* (CCT) using hydro-alcoholic extract on the expression of cytokines: TNF- and IL-6 in high fat diet-fed mice towards a cure for diabetes mellitus. *Journal of pharmacognosy and phytotherapy*. **3**(36): 81-88.

Sawaya, W.N., Dagher, N.J., Khan, P. (1983): Chemical characterization and edibility of the oil extracted from *Citrullus colocynthis* seeds. *Journal of Food Science*, **48**: 104–106.

Sawaya, W. N., N. J. Dagher, Khalil, J.K. (1986): *Citrullus colocynthis* seeds as a potential source of protein for food and feed. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, **34**(2): 285-288.

- Sawaya, W.N., Dagher, N.J., Khalil, J.K. (1988): *Citrullus colocynthis* seeds as a potential source of protein for food and feed. *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 285-288.
- Sayed, D. M., Balbaa, S.I., Afifi, M.S.A. (1973): Nitrogenous base of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Medica*, **24** (3): 260-265.
- Sayed, M.D., Balbaa, S.I. Afifi, M.S. (1974): The glycosidal content of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Med.* **26**: 293-298.
- Schafferman, D., Beharav, A., Shabelsky, E., Yaniv, Z. (1998): Evaluation of *Citrullus colocynthis*, a desert plant native in Israel, as a potential source of edible oil. *Journal of Arid Environments*, **40**: 431-439.
- Sebbagh, N., Cruciani-Guglielmacci, C., Ouali, F., Berthault, M.F., Rouch, C., Sari, D.C., Magnan, C. (2009): Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sun flower and Olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes and Metabolism*, **35**:178-184.
- Seger, C., Sturm, S., Mair, M.E., Ellmerer, E.P., Stuppner, H. (2005): <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae). *Magn. Reson. Chem.* **43**: 489-491.
- Sen Gupta, A., Charkrabarty, M.M.J. (1963): The science of food and agriculture, Varanasi.
- Shafaei, H., Esmaeili, A., Soleimani Rad, J., Delazar, A. Behjati, M. (2012): *Citrullus colocynthis* as a medicinal or poisonous plant: A revised fact. *Journal of Medicinal Plants Research.*, **6**(35) :4922-4927.
- Shah, M.A.U. (2005): Ethnomedicinal plants of Bhakkar Tehsil in Punjabm Pakistan. *Ethnobotany*, **17**:171-175.
- Sharma, S.K. (1998): Medicinal Plants Used in Ayurveda. National Academy of Ayurveda, Ministry of Health and Family Welfare Govt. of India, New Delhi, India.
- Sharma, S.C. (2002): Indigenous phytotherapy among rural women of Shahjahanpur District, Uttar Pradesh In: Ethnobotany (Eds. P.C. Trivedi). Aavishkar publishers, Jaipur; 313.
- Sharma, A., Singh,S., Nag, T.N. (2010): Antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* and *Tribulus terrestris* against some pathogenic bacteria. *Asian Journal of Microbiology and Biotechnology and Environmental Sciences*, **12**: 633-637.
- Shivakumar, C., Geoffrey, C. F. (2000): Herbal hepatotoxicity : An expanding but poorly defined problem . *J Gastroenterol He-patol.*, **15**: 1093-1099.
- Sincich, F. (2002): Bedouin traditional medicine in the Serian steppe. Rome, FAO. pp:114-115.
- Singh, U., Wadhvani, A.M., Joshi, B.M. (1996): Dictionary of Economic Plants in India. ICAR; 1-918.
- Singh, V., Pandey, R.P. Economic and medicinal plants of Indian desert. In: Desert resources and technology. (Ed.) Singh, Alam. Vol.I. Jodhpur: Scientific publishers (1983); 307-368.
- Sofowara, A. (1993): Medicinal plants and traditional medicine in Africa. Spectrum Books Ltd., Ibadan, Nigeria. p: 289.

Soliman, M.A., El Sawy, A.A., Fadel, H.M., Osman, F., Gad, A.M. (1985): Volatile components of roasted *Citrullus colocynthis* var. colocynthoides. *Agric Biol Chern*, **49**:269-275.

Soulier H. (1979): Traité de thérapeutique et de pharmacologie, Tome II. [Handbook of therapeutics and pharmacology.] Paris.

Spichiger, R. E., Savolainen, V.V., Figeat, M., Jeanmoned, D. (2002): Botanique systématique des plantes à fleur. Presses polytechniques et Universitaires romandes, CH Lausanne.

Stevens, P.F. (2001): Angiosperm Phylogeny Website (APweb). [www.mobot.org/MOBOT/research/A\\_Pweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/A_Pweb/) (accessed 12 July 2015).

Sun, J., Blaskovich, M. A., Jove, R., Livingston, S. K., Coppola, D., Sebti, S. M. (2005): Cucurbitacin Q: a selective STAT<sub>3</sub> activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene*, **24**: 3236–45.

-T-

Tabani, K., Birem Z., Halzoune H., Saiah W., Lahfa, F., Koceir, E. A., Omari, N. (2015) : Effet hypolipémiant des alcaloïdes de la coloquinte chez le rat Wistar soumis à un régime Hyperlipidique. *Nutr. Santé*, **4**(2): 84-89.

Talabani, N.S., Tofiq, D.I. (2012) : *Citrullus colocynthis* as a bioavailable source of  $\beta$ -sitosterol, antihyperlipidemic effect of oil in rabbits. *International Journal of Medicinal Aromatic plants*, **2**: 536-539.

Talole, B.B., Baheti, D.G., More, P.A. (2011): Antihistaminic effect of *Citrullus Colocynthis* L-Schard Leaves. *Pharmacologyonline*, **1**: 468-472.

Tannin-Spitz, T., Grossman, S., Dovrat, S., Gottlieb, H.E., Bergman M. (2007a): Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochemichal pharmacology*, **73**: 56-67.

Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Fgrossman, S. (2007b). Cucurbitacin glycosides: Antioxidant and free-radical scavenging activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **364**: 181–186.

TaufiqUr-Rahman, M., Shilpi, M.A., Hossain, C.F. (2005): Preliminary pharmacological studies on piper cheba stem bark. *J. Ethnomarmacol.*, **99**: 203-209.

Thimothy, J. N. (1993): New opportunities in the cucurbitaceae. In: Jarala J. Simon J. E. (eds.), *New corps*. Wiley, New York. pp: 538-546.

Tiwari, G., Shrivastava, D.K., Gangrade, S.K. (2003): Status of medicinal plants diversity of Kymore Plateau and Satpura Hill Region of Madhya Pradesh and their utilization In: *Recent progress in medicinal plants volume 7 Ethnomedicine and pharmacognosy (II)* (Eds. V.K., Singh, J.N., Govil, Hashmi Shamima and Singh Gurdip). Studium press LLC, USA. (2003); p: 53

Tonkaboni, M.M. Tohfeh al-Momenin [in Persian]. (2007): Tehran, Iran: Shahid Beheshti University of Medical Sciences, p164.

Torkey, H. A-Yhaaz, (2009): Insecticidal effect of cucurbitacin E glycoside isolated from *Citrullus colocynthis* against aphid Craccivora. *Basic and Applied Sciences*, **3**: 4060-4066.

Taufiq-Ur-Rahman, M., J.A. Shilpi, M. Ahmed and C.F. Hossain. (2005): Preliminary pharmacological studies on piper chaba stem bark. *J. Ethnopharmacol.*, **99**: 203-209.

Trease, E., Evans, W.C. (1987): Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13<sup>th</sup> Edition. pp: 61-62. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ougduaja VO, 2004. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pomme). *Journal of Medicine and scientific. Nigeria*. **4**(3): 179-182.

Tsuchiya, S., S. Miyashita, M. Yamamoto, S. Horie and S. Sakai *et al.* (2002): Effect of mitragynine, devived from Thai folk medicine, on gastric acid secretion trough opioid receptor in anesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **443**: 185-188.

-U-

Udem, S.C., Obidoa, O. and Asuzu, I.U. (2009): Acute and chronic toxicity studies of *Erythrinasenegalensis* DC stem bark extract in mice. *Comparative Clinical Pathology.*, **19**: 275-282.

Uma, C., Sekar, K.G. (2014): "Phytochemical analysis of a folklore medicinal plant *Citrullus colocynthis* L. (bitter apple)". *Journal of Pharmacognosy and Photochemistry*, **2**: 195-202.

-W-

Wagner, H., Bladt, S. (1984): Plant drug analysis. A thin layer chromatography. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Wasfi, I. A. (1994): Some Pharmacological Studies on *Citrulluscolocynthis*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, **2**: 2, 65-79.

Wasfi, I.A., Bashir, A. K., Abdallah, A. A., Banna, N. R., Tanira, M. O. M. (1995): Antiinflammatory activity of some medicinal plants of the united Arab Emirates. *International J. of Pharmacol.* **33** (2): 124-128.

Watt, J.M., Breyer-Brandwijk, M.G. (1962): The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. 2<sup>nd</sup> ed., Edinburgh: E & S Livingstone Ltd.

Weed, R.I. (1970): *American Journal of Medicine*, **49**: 147-150.

Wilkinson, J. H. (1976): Alkaline phosphatase (IEC. 3.1.3.1). In The Principles and Practice of Diagnostic Enzymology, pp. 129-141. Edward Arnolds, London.

Wurochekke, A. U., Anthony, A. E., Obidah, W. (2008): Biochemical effects on the liver and kidney of rats administered aqueous stem bark extract of *Xemenia Americana*. *African Journal of Biotechnology*, **7**(16): 2777-2780.

-Y-

Yadav, J.P., Kumar, S., Siwach, P. (2006): Folk medicine used in gynecological and other related problems by rural population of Haryana. *Indian journal of Traditional Knowledge*, **5**(3):323-326.

Yagi, K. (1976): Simple fluorimetric essay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**: 212-216.

Yalanova, I.P. (1970): Les degrés de nuisibilité des substances industrielles, les different aspects de sensibilité et les coefficients de sécurité au cours de la fixation. CMT. Medicina, Moscou, 65-76.

Yamaguchi, M. (1983): World Vegetables: Principles, Production and Nutritive Values. 415 Seiten, 112 Abb., 68 Tab. AVI Publ. Company, Westport, Connecticut/USA, and Ellis Horwood Limited, Publishers, Chichester, England.

Yaniv, Z., Shabelsky, E., Schafferman, D. (1999): Colocynth: Potential arid land oil seed from an ancient cucurbit. Journal of Janich(ed) Perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA. pp: 257-p261.

Yin, D., Wakimoto, N., Xing, H., Lu, D., Huynh, T., Wang, X., Black, K.L., Koeffler, H.P. (2008): Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. *International Journal of Cancer*, **123**: 1364–1375.

Yoshikawa, M., Morikawa, T., Kobayashi, H., Nakamura, A., Matsuhira, K., Nakamura, S., Matsuda, H. (2007): Bioactive saponins and glycosides. XXVII. Structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides and antiallergic constituents from *Citrullus colocynthis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**: 428-434.

-Z-

Zaini, N.A.M., Anwar, F., Hamid, A.A., Saari, N. (2011): Kundur [*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.]: a potential source for valuable nutrients and functional foods. *Food Research International*, **44**: 2368–2376.

Zamani, M., Alireza, O.R., Reza, M., Mohammed, N., Morteza, V.J., Hassan, R., Abbas, D., Lutfun, N., Satyajit D.S. (2007): Assessment of anti-hyperlipidemic effect of *Citrullus colocynthis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **17**(4), 492-496.

Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H, Dassouli A., Serhrouchni M., Benjelloun W. (1997): Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, **58**: 45-54.

Zohary, D. Hopf, M. (2000): Domestication of Plants in the Old World. Oxford University Press, Oxford, UK.

# ***Annexe***

## Evaluation of Acute and Subacute Toxicity of Fruit Methanolic Extract from *Citrullus colocynthis* in male Albino rats

S Soufane<sup>1\*</sup>, A Bouzidi<sup>2</sup>, N Mahdeb<sup>2</sup>, S Krache<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic studies. Faculty of natural sciences and life. Ferhat Abbas University, Sétif 19000. Algeria

<sup>2</sup>Department of Biochemistry. Faculty of natural sciences and life. Ferhat Abbas University, Sétif 19000. Algeria

<sup>3</sup>Laboratory of Anatomopathology. Saadna Abdennour Hospital, Sétif 19000. Algeria.

Received: 18<sup>th</sup> Feb, 17; Revised 28<sup>th</sup> March, 17, Accepted: 16<sup>th</sup> April, 17; Available Online: 25<sup>th</sup> April, 2017

### ABSTRACT

In this study, we investigated the effects of acute and subacute administration of the methanolic fruit extract of *Citrullus colocynthis* (CCT) in male Albino Wistar rats. The acute toxicity study was undertaken firstly to determine the acute median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of the fruit extract. Then, the second step aimed to evaluate its toxic effects when administered at single daily oral dose 440mg/kg (1/3 of the LD<sub>50</sub>) after one, three, five, seven, ten and fourteen days on liver function indices (AST, ALT, ALP, total proteins), kidney function parameters (uric acid, urea and creatinine), haematological parameters and electrolyte concentrations (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, P, Ca<sup>+2</sup>) using standard methods. The sub-chronic toxicity was undertaken to evaluate the toxic effects of the same extract and the target organs after its oral administration for six weeks (265 mg/kg) to male rats. The median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of the extract was found to be 1311.45 mg/kg. After acute oral administration of the methanolic extract a dose of 440mg/kg (1/3 of the LD<sub>50</sub>), there were remarked a loss in body weight and a significant reduction in the relative weights of liver, kidney, lungs, spleen and testis of treated rats. The RBC, WBC count, HCT and HGB concentration were also significantly lower in treated groups than control one. The liver enzymes ALT and AST activities were higher for the main treated groups and significantly elevated in the group sacrificed after three days of the treatment. The ALP has enregistered a significant elevation for the majority of the tested groups. The analysis of kidney function parameters revealed a significantly high creatinine levels for all treatment group (exceptely for the group sacrificed after 14 days), a significant increase in urea level for the group sacrificed after three days of treatment with no remarkable changes in uric acid concentrations. Electrolyte concentrations (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>) were not significantly affected by CCT alcoholic extract, but the levels of PO<sub>4</sub><sup>-</sup> have shown a significant reduction for the main treatment groups. Histo-pathological examination revealed a discreetly congestion in hepatic and renal parenchyma in groups sacrificed after one and five days of treatment. The present study showed that the intake of extract of ripe *Citrullus colocynthis* fruit induced a characteristic signs of poisoning: diarrhea, ruffled hair, loss in organ weight and feed intake. The effects on the functions of the liver, kidney and bone marrow in rats resulted in alterations in serum AST, ALT and ALP activities, in the levels of total proteins, urea, uric acid, creatinine and electrolytes as well as in organ lesions.

**Keywords:** Acute toxicity, *Citrullus colocynthis*, LD<sub>50</sub>, Methanolic extract, subacute toxicity.

### INTRODUCTION

Medicinal plants are widely used for the treatment and prevention of various diseases in Africa and other developing countries of the world<sup>1</sup>. One of these traditional medicines is the cucurbitaceous plant, *Citrullus colocynthis* or Colocynth very common in many places from the north to the arid habitats of Algeria. This plant, is locally known as «Handhal» «Hdej» «Tifersit» «Taferzizt» «Tatoor» «Alqam» «Mararet Essahra» and usually matures between September and October. In folklore, the fruits and, in particular, the pulp of this plant are wellknown natural cathartics since ancient times. The leaves of this herb are used to treat asthma and jaundice, whereas the root is a traditional treatment for amenorrhea, breast inflammation, arthralgias and ophthalmic diseases. Other medicinal uses include the treatment of seizures, tuberculosis, syphilis, and parasitic

infections<sup>2</sup>. *C.colocynthis* is mostly used by many diabetics in developing countries<sup>3,4</sup>. In the south of Algeria, the fruit of *Citrullus colocynthis* in its dried or fresh forms is widely used singly or in combination with other plants by rural communities of several regions for its antidiabetic, antijaundice, antirheumatic, antihaemorrhoids activities without considering its safety. Colocynth (CCT) contains active substances such as saponins, alkaloids and glycosides<sup>5</sup>. The main constituents of the plant are highly oxygenated tetracyclic triterpene compounds called cucurbitacins<sup>6</sup>. There are a variety of cucurbitacin compounds including cucurbitacin A, B, C, D, E, F, I, L and glucosides<sup>7</sup>. Fruit contains α-glucosides, colocynthin, its aglycone α-elaterin, citrullin, citrullene and citrullinic acid. Unripe fruits contain p-hydroxy benzyl ester. Roots contain α-elaterin and hentriacontane<sup>8</sup>.

Case reports associate the use of extracts of this plant with the development of bloody diarrhea, vomiting, colicky abdominal pain, and dehydration<sup>9</sup>. Pathologic lesions primarily involve edema, erythema, superficial erosions and inflammatory exudates of the mucosa in the sigmoid and descending colon. Ulcerations and pseudopolyps are unusual features of this toxic colitis. Symptoms typically resolve within 3-6 days, and the pathological lesions resolve within 14 days without sequelae. The older medical literature suggests that 0.6- 1 g of colocynth extract can produce bloody diarrhea<sup>10</sup>.

Despite the fact that the fruit of *Citrullus colocynthis* is well reputed for its therapeutic activity in folklore, there are few data on the dose response of the toxin in colocynth, in part because of the lack of identification of the specific compound associated with the toxic effects. Furthermore, in order to develop and establish the safety and efficacy level of a new drug, toxicological studies are very essential in animals under various conditions. No drugs is used clinically without its clinical trial as well as toxicity studies. Toxicological data help to make decision whether a new drug is adopted for clinical use or not<sup>11,1</sup>. This led to the present study where we investigated the acute and the subacute of *C. colocynthis* methanolic extract on haemogram, biochemical functional biomarkers of liver and kidney and on histo-pathological changes in the visceral organs of male Wistar Albino rats.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material

*Citrullus colocynthis* (CCT) plant were collected during August from the desert area of Maârif (35,5°W and 5,25°N) in province of Boussaâda, Wilaya of M'sila (South east of Algeria). The plant has been identified based on morphological aspects. CCT Fruits were washed and shade dried (Fig. 1). Seeds were separated manually from the pulp of the fruits and then minced with electrical grinder (Muleinex) into a powder and finally stored in airtight containers prior to use.

### Plant extraction

One hundred grammes of air dried powdered fruits were extracted to exhaustion with 600ml methanol, using a soxhlet apparatus for 18 h. The resulting extracts were evaporated at reduced pressure to obtain crude extract. The yield of this extract was approximately 13.73± 0.02% (w/w).

### Animals

Male Albino-Wistar rats clinically healthy (180- 210 g) were purchased from animal center of Pasteur's Institute (Algiers – Algeria). Rats were housed in hanging transparent polypropylene plastic cages (55 × 33× 19 cm) lined with husk and maintained in Animal house of Faculty of natural sciences and life, University Ferhat Abbas Setif-1, Algeria. They were let to accommodate to standard environmental laboratory conditions for 3 weeks prior to experiment. The litter was renewed every 3 days. They were fed with a standard pellet and tap water *ad libitum* throughout the experimental period. All experimental procedures were conducted in accordance with the guide for care and use of laboratory animals and in accordance

with the scientific council of the Faculty of Natural Sciences and Life of the University Ferhat Abbas, Sétif -1, Algeria.

### Determination of oral median lethal dose (LD<sub>50</sub>)

The oral median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of *C. colocynthis* and its range was determined according to the graphic method of Litchfield and Wilcoxon<sup>12</sup>.

The fruit extract of *C. colocynthis* to be tested is dissolved in 600µl of ethanol, diluted by normal saline solution (0.9% v/v) and administered at different doses, via intragastric intubation at a dose per group. Male rats were weighed (186.25 ±2.80 g), identified by labeling with an aqueous solution of picric acid and divided into groups of 10 animals each and fasting overnight before oral administration of single dose of the fruit *C. colocynthis* extract.

Five groups of rats are treated with simple application and successively with the following doses: 500, 1000, 1800, 2000 and 3000 mg/kg. The control group received physiological saline with 600µl of ethanol. After administration of the fruits extract, animals were kept under close observation every hour during the first day and every day for 14 days. Behavior and clinical symptoms of animals are noted throughout the duration of the experiment. Dead animals were subjected to post-mortem examination.

### Acute oral toxicity

The male rats were allotted randomly to six groups of 10 animals and were given orally a single dose of 440 mg/kg (1/3 DL<sub>50</sub>) body weight of the fruit of *C. colocynthis*, but not lethal dose to try to investigate the target organs. The control group (10 rats) received saline water. Animals were observed and recorded systematically 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h and daily after test substance administration. The visual observations included changes in skin and fur (hair), eyes and mucous membranes, and also respiratory, circulatory, autonomic and central nervous system. The treatment groups were sacrificed after 24 h, 3, 5, 7, 10 and 14 days of the treatment. In humans, after acute poisoning by *C. colocynthis*, hospitalization and recovery takes between 3 to 6 days<sup>10</sup>.

### Subacute toxicity

Thirty healthy albino male rats were used to study the subacute toxicity of *C. colocynthis* fruit extract (divided into three groups of 10 rats each). The extract was administered daily *per os* at dose of 265 mg/kg (1/5 LD<sub>50</sub>) body weight for six weeks (first group) followed by one week of recovery (second group). The control group (10 rats) was given saline water. The animals were observed daily for abnormalities. Average feed intake and body weight were determined weekly for each group.

### Hematological examination and clinical chemistry analysis

At the end of all experimental periods, after overnight fasting, rats were anaesthetized with urethane at the dose 760 mg/kg. Blood samples for haematological and biochemical analysis were collected from the retro-orbital vein into tubes with or without EDTA, respectively. Red blood cells count (RBC) and white blood cells (WBC) count, haemoglobin concentration (HGB), hematocrit



Figure 1: *Citrullus colocynthis* ripe fruit in its dried and fresh forms with cut section.

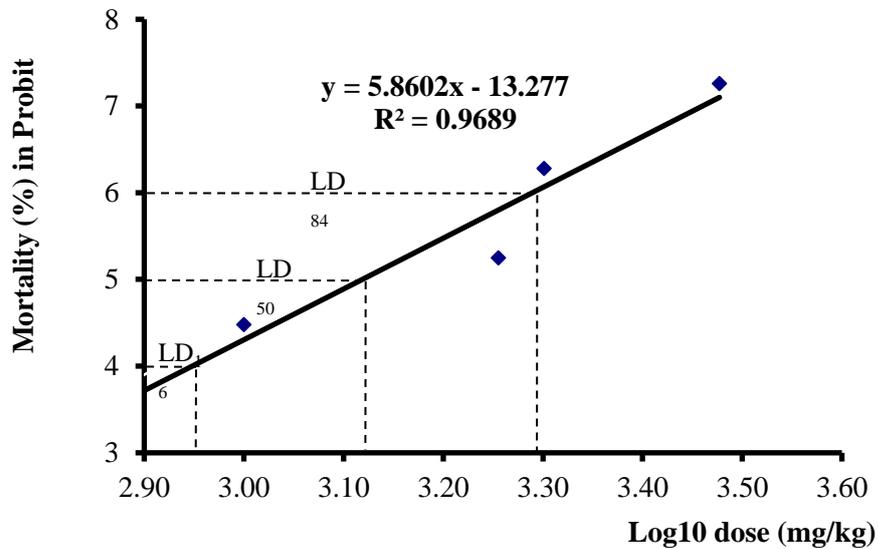


Figure 2: Median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of the fruit *C. colocynthis* methanolic extract administered per os to male albino rats.

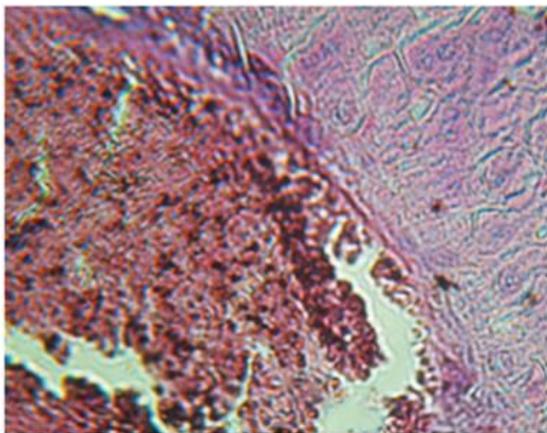


Figure 3a: Liver parenchyma traversed by congestive blood vessels in male rats treated with fruit CCT extract at a dose of 3000 mg/kg. H&E (× 400).

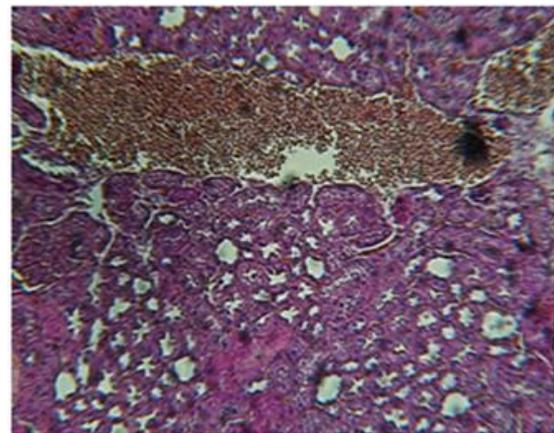


Figure 3b: Renal parenchyma traversed by blood vessels with distended lumen engorged with blood in male rats treated with fruit CCT extract at a dose of 3000 mg/kg. H&E (× 100).

(HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), platelet count (PLT) were determined using automatic counter MEDONIC

(Beckman Coulter – USA). The biochemical parameters: Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic-Pyruvic Transaminase (GPT) (using commercial Kits – SGM Rome-Italy), alkaline phosphatase (ALP) (using

Table 1: Effect of acute per os administration of CCT fruit methanolic extract (440 mg/kg) on body weight of male rats. Values are mean ± SEM.

Group	1 <sup>st</sup> day	3 <sup>rd</sup> day	5 <sup>th</sup> day	7 <sup>th</sup> day	10 <sup>th</sup> day	14 <sup>en</sup> day
Control	244.82±6.72					258.24±9.96
1 <sup>st</sup> day	238±14.30					
3 <sup>rd</sup> day	244.40±12.04	237.86±9.10				
5 <sup>th</sup> day	255.40±5.65		247.34±6.05			
7 <sup>th</sup> day	237.60±8.32			231.20±9.30		
10 <sup>th</sup> day	242.54±10.48				237.40±9.34	
14 <sup>en</sup> day	242.88±10.15					240.46±9.39

Table 2: Relative organ's weight of male Albino Wistar rats treated orally with 440 mg/kg of methanolic CCT fruit extract. Values are mean ± SEM.

Organ/ Group	Liver	Kidney	Brain	Testes	Lungs	Heart	Spleen
Control	0.0391 0.0003	±0.0075±0.0002	0.0075±0.0002	0.0103±0.0006	0.0074±0.0004	0.0031±0.000030	0.0038±0.0002
1 <sup>st</sup> day	0.0341±0.0015*	0.0056±0.0005*	0.0073±0.0005 <sup>n</sup>	0.0083±0.0003*	0.0056±0.0007*	0.0026±0.0002*	0.0033±0.0005*
3 <sup>rd</sup> day	0.0354±0.0018*	0.0049±0.0007*	0.0073±0.0002 <sup>n</sup>	0.0069±0.0002*	0.0057±0.0003*	0.0027±0.0002 <sup>ns</sup>	0.0033±0.0002*
5 <sup>th</sup> day	0.0356±0.0022*	0.0053±0.0002*	0.0075±0.0003 <sup>ns</sup>	0.0084±0.0011 <sup>ns</sup>	0.0063±0.0002*	0.0028±0.0002 <sup>ns</sup>	0.00020.0031±0.0002*
7 <sup>th</sup> day	0.0357±0.0025*	0.0054±0.0002*	0.0073±0.0003 <sup>ns</sup>	0.0093±0.0006 <sup>ns</sup>	0.0060.0065±0.0006*	0.0029±0.0002 <sup>ns</sup>	0.00010.0034±0.0003 <sup>ns</sup>
10 <sup>th</sup> day	0.0359±0.0014*	0.0061±0.0002*	0.0075±0.0003 <sup>ns</sup>	0.0093±0.0006 <sup>ns</sup>	0.0080.0065±0.0003*	0.0029±0.0002 <sup>ns</sup>	0.00020.0035±0.0005 <sup>ns</sup>
14 <sup>en</sup> day	0.0378±0.0005 <sup>ns</sup>	0.0067±0.0007 <sup>ns</sup>	0.0077±0.0001 <sup>ns</sup>	0.0099±0.0012 <sup>ns</sup>	0.0068±0.0006 <sup>ns</sup>	0.00050.0030±0.0002 <sup>ns</sup>	0.00010.0035±0.0001 <sup>ns</sup>

Table 3: Effect of oral administration of CCT fruit methanolic extract (440 mg/kg) on some haematological parameters in male rats. Values are mean ± SEM.

Parameter	Control	1 <sup>st</sup> day	3 <sup>rd</sup> day	5 <sup>th</sup> day	7 <sup>th</sup> day	10 <sup>th</sup> day	14 <sup>en</sup> day
RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.703±0.112	7.881±0.348*	7.619±0.069*	7.665±0.095*	7.993±0.172*	8.301±0.132*	8.416±0.075*
HGB (g/dl)	14.818±0.34	12.863±0.240*	11.250±0.378*	12.171±0.261*	12.535±0.197*	13.038±0.309*	13.825±0.207 <sup>ns</sup>
HCT (%)	47.700±0.80	43.313±1.711*	41.975±0.515*	42.271±0.662*	42.513±1.009*	43.388±0.436*	45.713±0.505*
MCV (µm <sup>3</sup> )	56.138±1.04	51.438±0.713*	41.963±0.851*	52.125±0.578*	52.475±0.678*	54.125±0.767 <sup>ns</sup>	55.1±0.798 <sup>ns</sup>
MCH(pg)	17.450±0.27	17.275±0.264*	17.163±0.115*	17.343±0.251*	16.674±0.356*	17.775±0.281*	18.888±0.418*
MCHC(g/dl)	36.038±0.48	33.563±0.668*	30.55±0.351*	31.375±0.730*	31.00±0.477*	33.391±0.408*	35.20±0.140 <sup>ns</sup>
WBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	11.315±0.58	9.363±0.729*	8.258±0.060*	8.50±0.274*	8.604±0.242*	9.729±0.244*	9.893±0.243*
PLT (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	818.00±11.75	669.00±66.311*	593.50±41.386*	697.875±17.898*	745.625±17.274*	762.125±13.57	780.909±14.780*

commercial Kits – CYPRESS DIAGNOSTIC Langdrop – Belgium), concentrations of total protein, urea, glucose, creatinine, sodium, potassium, calcium and phosphorus were determined using apparatus TECHNICON RA-1000-USA. The biochemical parameters were determined in serum obtained after centrifugation of total blood without anticoagulant, at 2500 rpm for 15 min.

*Histo-pathological examinations*

After blood collection, the animals were sacrificed by cervical dislocation. After autopsy, all tissues were examined grossly in situ and major's organs (liver, brain, heart, kidneys, spleen, testicles, and lung) were weighted. The relative organ weight was calculated and compared with the value of the control. Tissues from liver and kidney of all animals were fixed in 10% neutral buffered formalin solutions then embedded in paraffin and cut with a microtome set at 5 µm, stained with hematoxylin and eosin

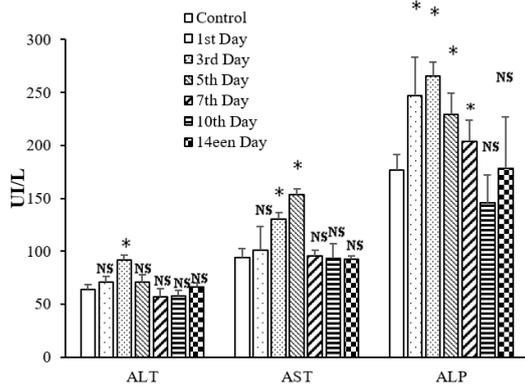


Figure 4 : Effect of acute administration of CCT fruit methanolic extract of CCT (440mg/kg) on some biochemical parameters in male rats. Values are mean $\pm$ SEM.

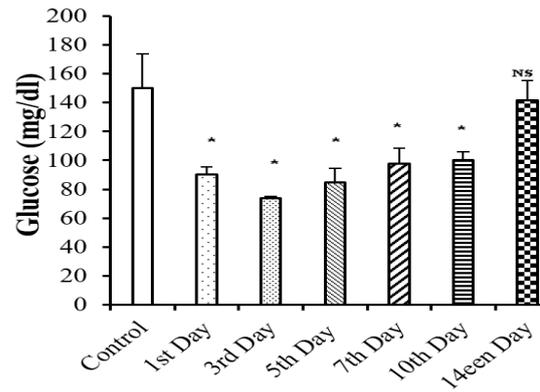


Figure 5 : Effect of acute administration of fruit CCT methanolic extract (440mg/kg) on glucose level in male rats. Values are mean  $\pm$  SEM.

and examined by light microscopy for histopathological evaluation.

#### Statistical analysis

All data were expressed mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Statistical significance of the differences between means was assessed using *t*-test and analysis of variance followed by Tukey's test for multiple comparison test. A probability level of  $p < 0.05$  was chosen as the criteria for statistical significance. All statistical analysis were carried out using Sigma Stat software (version 2.01).

## RESULTS

### The median lethal dose determination

The animals were kept under close observation for 72 hours after dosing to check for symptoms, behavioral changes and death. The doses tested produced, early within the first hour of treatment the following signs, which worsens with the passing of the time: loss of locomotion activity, ataxia and at the highest doses administered, inappetence, weakness of the hind limbs, lethargy, hypothermia, cyanosis and eventually death. Severe diarrhea was the most serious symptoms; after developing it, the experimental animals died. The animals that survived had some symptoms, including mild diarrhea, but were able to recover. The intensity of the toxic effects was dose-dependent. Rat's mortality after different doses of CCT methanol extract was plotted against probability values<sup>12</sup>.

The mortality rate in male rats was maximum (100%) in groups treated with 3000 mg/kg. The acute median lethal doses (LD<sub>50</sub>) of the extract were found to be 1311.45 mg/kg at 95% confidence limit: [1037.80 to 1657.27 mg/kg] for rats males. The DL<sub>16</sub> and DL<sub>84</sub> were respectively 825.61 mg/kg and 2083.19 mg/kg (Fig. 2). The post-mortem findings were in the form of congestion in the liver as well as in renal parenchyma (Fig. 3a, b).

### Acute toxicity study

The main signs of toxicity observed after oral administration of single dose tested (440 mg/kg  $\approx$  1/3 DL<sub>50</sub>) were: diarrhea, ruffled hair, acceleration of heart rate

breathing difficulty, soft feces and huddling together at one end of the cages. None of the rats in all treated groups died during the course of the experiment.

There were no statistically significant differences in average body weight of the control group and *Citrullus colocynthis* fruit-extract treated groups during the acute toxicity. Nevertheless, a slight loss in body weight was noted in CCT fruit extract treated rats as compared to control group (Table. 1).

Macroscopic examination of various organs *in situ* did not show any morphological changes in organs of treated animals compared with those of control rats. The effects of CCT fruit extract on relative organ weights (liver, kidney, lung, heart, brain, testis and spleen) are presented in table 2. Significant statistical reductions were noted on the relative weights of liver, kidney, lungs, spleen and testes among the treated groups. After fourteen days of the treatment, all treated groups have recovered the normal relative organ weight.

### Heamatological changes

The blood picture of *C. colocynthis* treated rats after acute administration of fruit alcoholic extract is shown in table 3. The total RBC count, WBC, HCT and HGB content were significantly lower ( $P < 0.05$ ) in the treated groups than the control one.

### Changes in serum constituents

The effects of CCT extract on liver function biomarkers in serum of albino rats after oral administration of (1/3 DL<sub>50</sub>): AST, ALT and ALP are given in figure 4. It was observed that the values of AST (GOT) and ALT (GPT) were higher but not significantly different in the main treatment groups compared with those of control group. However, the elevation of the levels of GOT (AST) and GPT (ALT) were significant ( $P < 0.05$ ) after 3 days of the treatment. In addition, the alkaline phosphatase values were significantly higher ( $P < 0.05$ ) almost in the majority of the tested groups (1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> day), and start to return to the normal values after 10 to 14 days of the treatment. However, total proteins levels were no significantly different in comparison to control group (Fig. 5). Finally, almost all treatment groups (except the group sacrificed

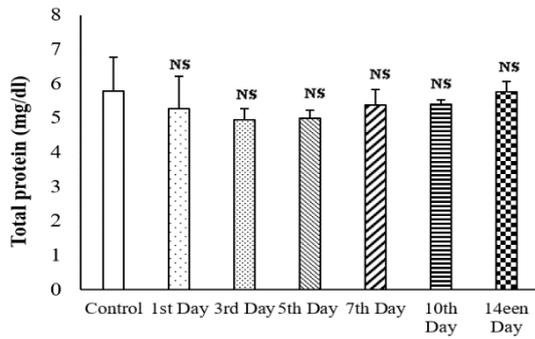


Figure 6 : Effect of acute administration of fruit CCT methanolic extract (440mg/kg) on total protein level in male rats. Values are mean ± SEM.

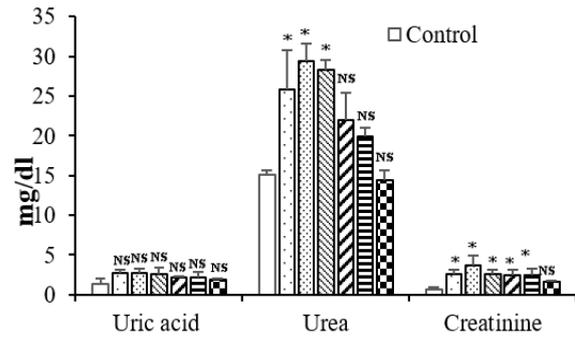


Figure 7 : Effect of acute administration of fruit CCT methanolic extract on some renal function parameter in male rats. values are mean ± SEM.

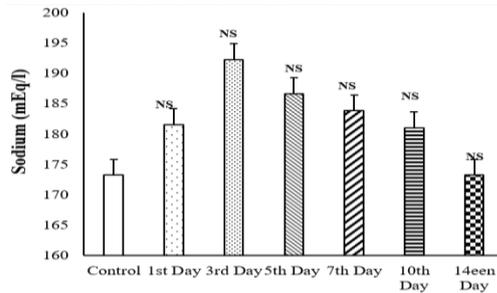


Figure 8a: Effect of acute administration of fruit CCT methanolic extract (440mg/kg) on sodium level in male rats. Values are mean ± SEM.

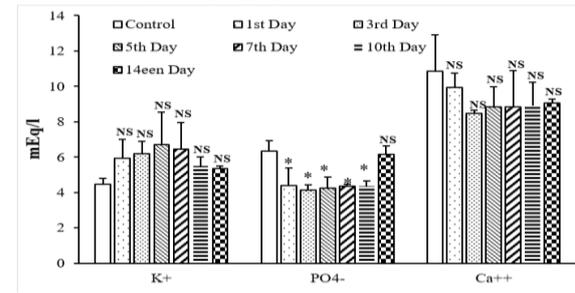


Figure 8b: Effect of acute administration of fruit CCT methanolic extract (440mg/kg) on some electrolyte's level in male rats. Values are mean ± SEM.

after 14 days) have enregistered a significant reduction in blood glucose level when compared with control (Fig. 6). The results of the effects of CCT-fruit-extract on the main kidney function parameters are shown in figure 7. From this figure, creatinine level was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in treatment groups compared with the control. The urea level has enregistered a significant elevation ( $P < 0.05$ ) in the three first groups and showed normal values for the other treatment groups. However, the uric acid has demonstrated a no significant variation for all treatment groups.

It appears from the figure 8a and b that CCT methanolic extract did not affect significantly the electrolyte concentrations, but it induced a non-significant elevation in sodium and potassium levels and a reduction in calcium level. Phosphorus was the single electrolyte which has presented a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in its level comparatively to control values.

**Pathological changes**

The histological examination of liver from male rats was performed in both control and treated groups. Hepatic parenchyma traversed by congestive blood vessels and a congestive renal parenchyma were observed in the group sacrificed after 24 hours (Fig.9a, b). The renal parenchyma becomes discreetly congestive in the group sacrificed after 5days (Fig.9c). Congestion disappears completely after 14 days of treatment in both the liver and kidneys (Fig.9d, e). Control group presented a liver parenchyma with preserved architecture made of Remack's radial spans converging towards a central vein and renal parenchyma

with a preserved architecture (Fig.9f, g). None of the rats had cardiac or splenic lesions.

**Sub-acute toxicity study**

For the result of the subacute toxicity test; in clinical evaluation, some changes in general behaviour and physiological activities of the animals such as: diarrhea, hypoactivity, ruffled hair, inappetence, huddling together at one end of the cage were observed after oral treatment with fruit CCT extract at a dose of 265 mg/kg (1/5 LD<sub>50</sub>) for six weeks. However, the treatment of rats with saline or CCT extract did not induce mortality during the whole study period.

Furthermore, the administration of CCT extract resulted in a significant reduction in the final body weight of the animals when compared with the control (Figure10) especially on the 4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> week of treatment. In parallel, a reduction in feed intake was also observed in the treated animals compared to control rats (Fig. 11).

A non-significant reduction were noted on the relative weights of liver, brain, kidney, testes, heart and spleen of the second treatment group, but it was significantly different for lungs. However, the first group has presented a significant decrease in relative weight of the liver, kidneys, lungs and heart in comparison with the control group (Table 4).

The haematological values of treated rats for six weeks were significantly different from those of control group (Table 5). RBC, HGB, HCT and PLT values of the control group were significantly higher than those of the treated group.

**Biochemical observation**

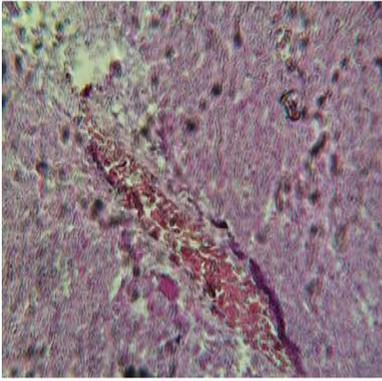


Figure 9a: Liver parenchyma traversed by congestive blood vessels after one day of acute treatment with CCT extract (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).

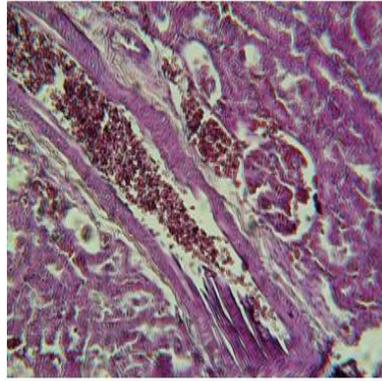


Figure 9b: Congestive renal parenchyma after one day of acute treatment with CCT extract (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).

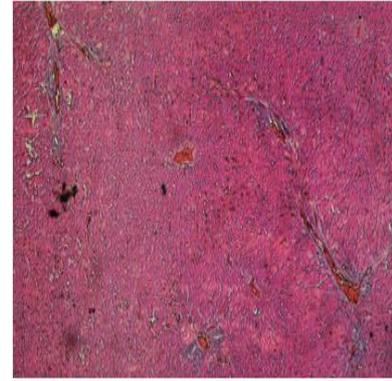


Figure 9c: Liver parenchyma with discretely congestive architecture after 5 days of acute treatment with CCT fruit extract (440 mg/kg). H&E ( $\times 40$ ).

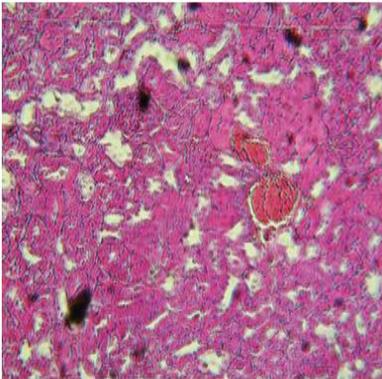


Figure 9d: Renal parenchyma with discretely congestive architecture after 5 days of acute treatment with CCT fruit extract (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).

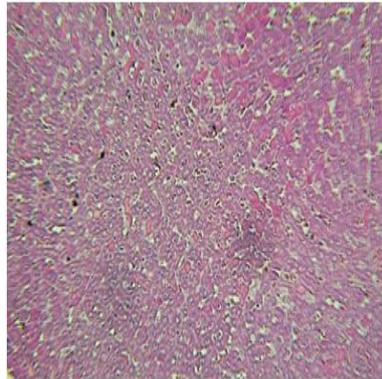


Figure 9e: Hepatic parenchyma without any particularity after 14 days of the administration of CCT fruit extract (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).

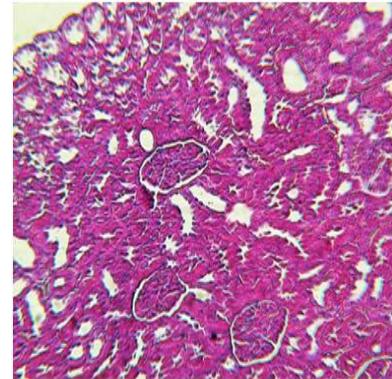


Figure 9f: Normal or discretely congestive kidney parenchyma after 14 days of the administration of CCT fruit extract (440 mg/kg). H&E ( $\times 100$ ).

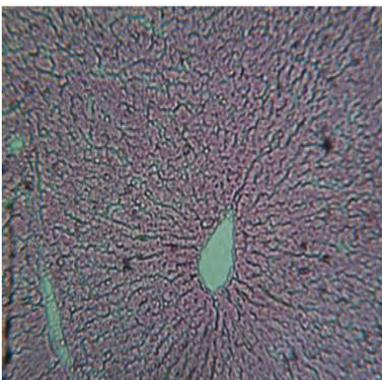


Figure 9g: Preserved morphology of control rat liver without any congestion. H&E ( $\times 100$ ).

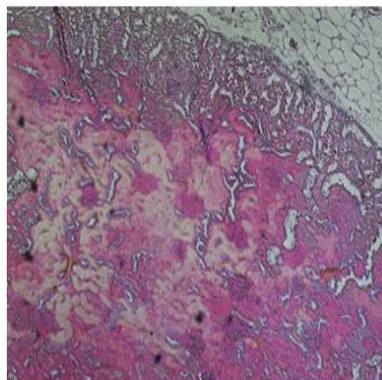


Figure 9h: Normal kidneys without any congestion in control rats. H&E ( $\times 100$ ).

The evaluation of various enzymes activities in the sub-acute toxicity revealed significant differences. The GOT, GPT and ALP exhibited a significant elevation, when compared with saline control (Figure 12). However, the

same enzymes did not enregistered a significant difference after one week recovery period following six weeks of treatment with CCT fruit extract. These changes were accompanied with a significant decrease in glucose and

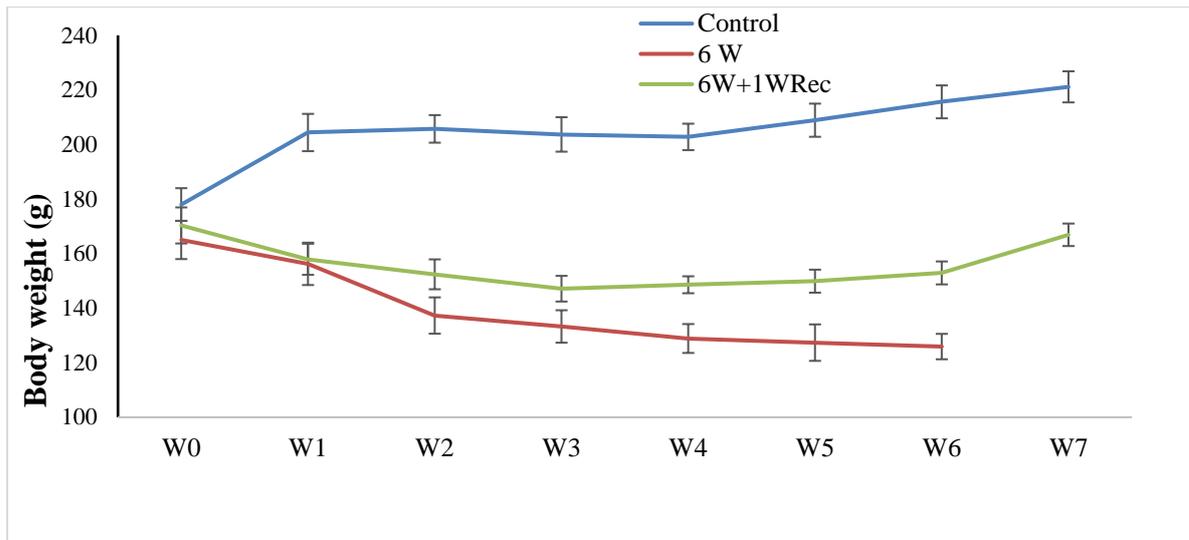


Figure 10: Effect of sub-acute administration of CCT fruit methanolic extract (265 mg/kg) for six weeks on body weight of male rats.

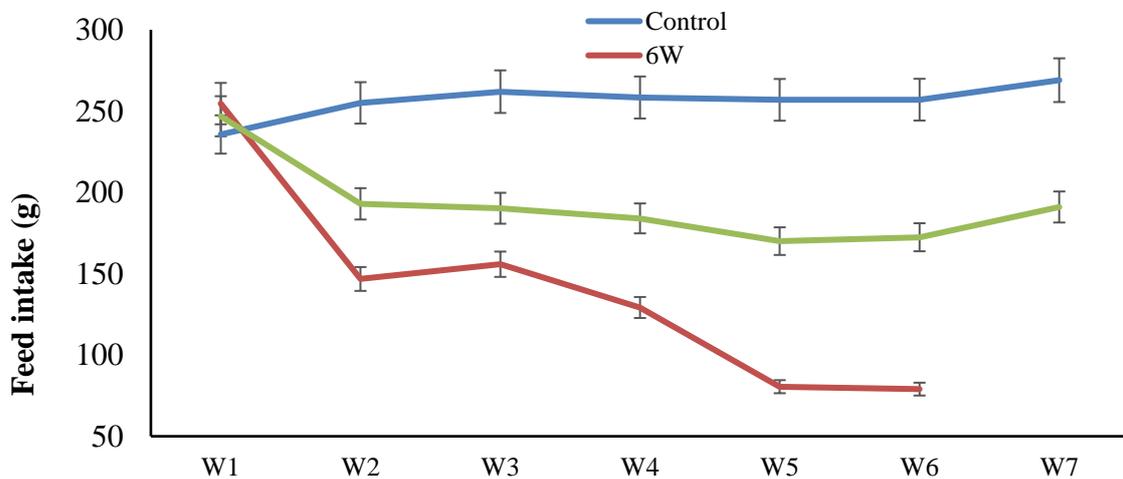


Figure 11: Effect of sub-acute administration of CCT fruit methanolic extract (265 mg/kg) for six weeks on feed intake of male rats.

total protein levels as compared to control group (Figure 13a, b).

A same picture is remarkable on the values of kidney function parameters where a significant elevation in urea, uric acid, creatinine,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  were enregistered in the first group versus a significant reduction in  $\text{PO}_4^-$  and  $\text{Ca}^{+2}$  levels (Figure 14, 15 a and b).

Observation and examination of the organs for gross pathological lesion immediately after dissection has demonstrated that the extract did not cause any gross morphological abnormalities in both treatment groups when compared with those of control rats. However, under the microscopic examination, the liver of the group treated for six weeks without recovery showed a congestive liver and kidneys with preserved architecture (Fig. 17, 18).

## DISCUSSION

*Citrullus colocynthis* find widespread use in folkloric medicine for treatment of various disorders. Many

diabetics in developing countries mostly use *C. colocynthis*. Livestock owners have suspected their toxicoses in grazing animals especially at time of drought<sup>4, 13, 14</sup>. The fruits and leaves of this plant contain cucurbitacins A, B, C, and D and  $\alpha$ -elaterin and probably other constituents<sup>7, 15</sup>.

The present work was conducted to study the acute and subacute toxicological effects of methanolic ripe fruit extract prepared from *C. colocynthis* plant developing in M'sila region in Algeria.

The clinical picture of male rats treated with the *C. colocynthis* fruit extract was characterized by relatively rapid appearance of symptoms including: mild diarrhea, ruffled hair and hypoactivity, early in the first hour. Probably, this is could be due to the rapid absorption of the active principles present in the fruit extract of the plant. Such signs of toxicity are in accordance with those reported and described by Elgerwi et al.<sup>16</sup>, Kingsbury<sup>17</sup>, Barri et al.<sup>18</sup> and Elawad et al.<sup>19</sup>: diarrhea with yellowish

Table 4: Relative organ weights of male rats treated per os with 265 mg/kg of fruit methanolic extract of *Citrullus colocynthis* for six weeks.

Group	Control	Group 6W	Group 6 W+1WRec.
Liver	0.0546 ± 0.0044	0.0341±0.0021*	0.0445±0.0046 <sup>ns</sup>
Kidneys	0.0082±0.0002	0.0064±0.0003*	0.0072±0.0007 <sup>ns</sup>
Brain	0.0081±0.0005	0.0081±0.0004 <sup>ns</sup>	0.0083±0.0005 <sup>ns</sup>
Testis	0.0146±0.0006	0.0118±0.0012 <sup>ns</sup>	0.0136±0.0009 <sup>ns</sup>
Lungs	0.0083±0.0005	0.0065±0.0004*	0.065±0.0006*
Heart	0.0038±0.0002	0.0030±0.0002*	0.0031±0.0003 <sup>ns</sup>
Spleen	0.0029±0.0001	0.0024±0.0003 <sup>ns</sup>	0.0027±0.0005 <sup>ns</sup>

Table 5: Haematological changes in male Albino Wistar rats treated orally with 265 mg/kg of methanol CCT fruit extract for six weeks.

Group Parameter	Control	Groupe 6 W	Groupe 6W+ 1W Rec.
RBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	10.514±0.132	8.509±0.164*	9.926±0.225 <sup>ns</sup>
HBG (g/dl)	16.700±0.327	15.225±0.158*	15.975±0.173 <sup>ns</sup>
HCT (%)	56.521±0.691	45.65±0.909*	54.850±1.511 <sup>ns</sup>
MCV (µm <sup>3</sup> )	56.317±1.079	52.925±0.212*	55.35±0.83 <sup>ns</sup>
MCH(pg)	15.500±0.152	18.686±0.237*	18.863±0.166*
MCHC(g/dl)	28.743±0.306	34.45±0.262*	29.550±0.620 <sup>ns</sup>
WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	11.750±0.193	8.450±0.856*	11.688±0.462 <sup>ns</sup>
PLT (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	632.429±22.104	537.143±25.544*	666.375±52.832 <sup>ns</sup>

green feces, anorexia, dyspnea, decreased body weight, colic and tremors, followed by general depression, excitability followed by convulsions and death. However, according to Scott *et al.*<sup>20</sup> rats fed with the oil extracted from *C. colocynthis* seeds didn't presented any toxicological effect. This could be due to absence of the toxic principles the in seeds' oil and its accumulation in the mesocarp layer of the fruits. Similarly, Wistar rats injected subcutaneously with *C. colocynthis* extract up to four weeks hasn't presented any effect<sup>21</sup>. This disagreement between studies may come from the source of the *C. colocynthis*, its environment, percent of the active ingredients in the fruit extract, the period of administration and the difference in rat strains.

The oral LD<sub>50</sub> in male rats in the present work was calculated as 1311.45mg/ kg, which is an indication that the extract is not completely safe. Given the results of the LD<sub>50</sub> (500mg/kg <LD<sub>50</sub><5000mg/ kg), the present fruit extract of *C.colocynthis* can be classified as moderately toxic products as classified by Loomis and Hayes<sup>22</sup> and Pascoe<sup>23</sup>. These calculations seem different from those reported by Rahawi et Youkana<sup>24</sup>, who have found that the oral LD<sub>50</sub> of the methanolic extract of the whole fruit (including seeds) determined by the up-and-down method in Wistar rats was to be 383.8mg/kg. Furthermore, Marzouk *et al.*<sup>25</sup> have found that the LD<sub>50</sub> of the aqueous extract of both immature and ripe fruits was to be 553.7mg/kg and 487.6mg/kg respectively when administered intraperitoneally to mice. Moreover, according to Marzouk *et al.*<sup>26</sup>, the LD<sub>50</sub> of the aqueous extract of the fresh immature fruits collected from seven states: Hammamet, Mehdiya, Kasserine, Sbeitia, Sidi-Bouid, Sfax and Medenine seem to be: 795.45 mg/kg, 749.97mg/kg, 750.03mg/kg, 799.64mg/kg, 795.49mg/kg, 385.54 mg/kg and 553.73 mg/kg respectively. These

differences could be attributed to the use of the whole fruit with or without seeds, modes of extract preparation and administration, degree of fruit maturity (percentage of the active ingredients in the fruit) and the locality of the plant. The symptoms and pathoanatomical features observed in our results may be attributed to the local effect of *C. colocynthis* on gastrointestinal tract.

The component(s) of the fruit plant extract responsible for the toxic manifestations after the oral dose are not known. The toxicity and lethality of the fruit-extract may be due to any one or more of the phytochemicals present in the crude methanol extract (saponins, glycosides, alkaloids and cucurbitacins), some of which have been isolated and identified<sup>5, 14, 27, 28, 29</sup>.

The present results suggest that at the oral dose, the C.C-fruit extract is not completely safe when administered at high concentration or in case of long term administration. In the acute toxicity, male rats given C.C-fruit extract orally at dose 440 mg/kg presented signs of toxicity: diarrhea, ruffled hair, huddling together, inappetence with a reduction in the body weight of the treated rats. The same signs of poisoning were observed when the CCT fruit extract was administered orally to rats for six weeks (subacute toxicity study). The changes in feces (soft stool, diarrhea) indicated disturbances of the gastrointestinal tract. According to Al-Yahia *et al.*<sup>30</sup>, diarrhea was the prominent sign of phytotoxicity and could be due to the presence of cucurbitacins in *C. colocynthis* fruits. Piloerection of the fur can be indicative of disturbances of the autonomic nervous system. The body weight and food consumption data are considered gross indicators of general systemic toxicity. Reduction in body weight may be directly related to reductions in food consumption<sup>31</sup> or to damage to vital organs. It's speculated that the mechanism of side effects such as anorexia and weight loss

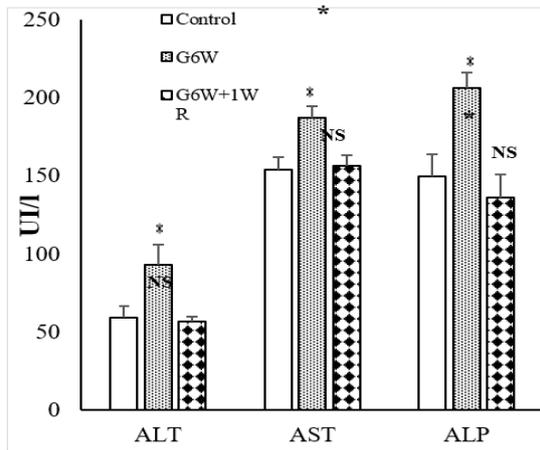


Figure 12: Effect of oral CCT fruit methanolic extract administration at a dose of 265 mg/kg for six weeks on some liver biochemical parameters in male rats.

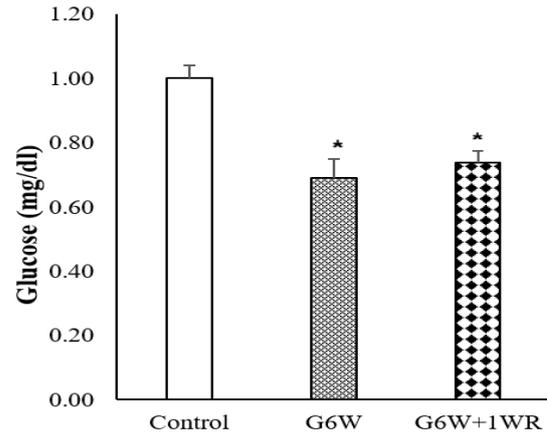


Figure 13a: Effect of oral CCT fruit methanolic extract administration at a dose of 265 mg/kg for six weeks on glucose level in male rats.

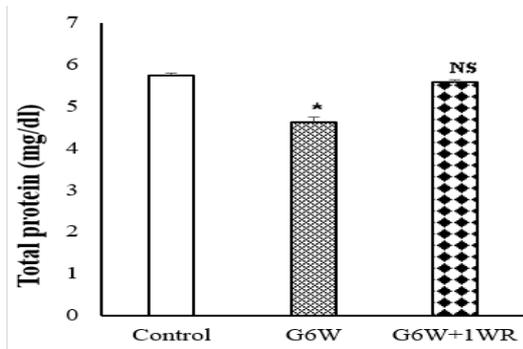


Figure 13b: Effect of oral CCT fruit methanolic extract administration at a dose of 265 mg/kg for six weeks on total protein level in male rats.

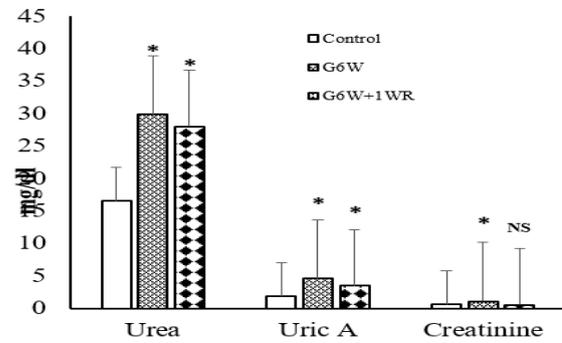


Figure 14: Effect of oral CCT fruit methanolic extract administration at a dose of 265 mg/kg for six weeks on some kidney indices in male rats

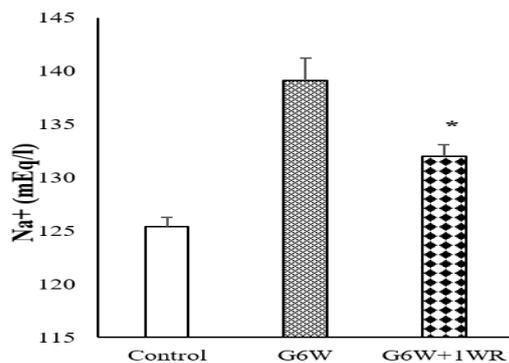


Figure 15a : Effect of oral CCT fruit methanolic extract administration at a dose of 265 mg/kg for six weeks on sodium level in male rats.

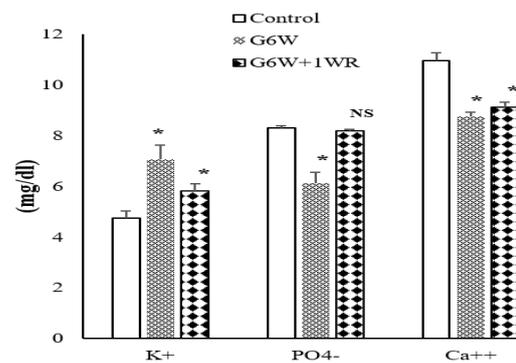


Figure 16 : Effect of oral CCT fruit methanolic extract administration at a dose of 265 mg/kg for six weeks on electrolytes level in male rats.

is related to an inhibitory effect of gastric acid secretion<sup>32,33</sup>.

The present study was designed to evaluate the effects of methanol extract of *C.colocynthis* fruit on the liver and kidney of male rats after acute and subacute treatment. The liver and the kidney are the most common targets of

chemical toxicity, due to their major metabolic and excretory functions.

The liver, known to be key organ in the metabolism and detoxification of xenobiotic, is vulnerable to damage induced by a huge variety of chemicals<sup>34</sup>. This is due to the fact that most chemicals are metabolized in the liver before being eliminated from the body, often through the bile. An

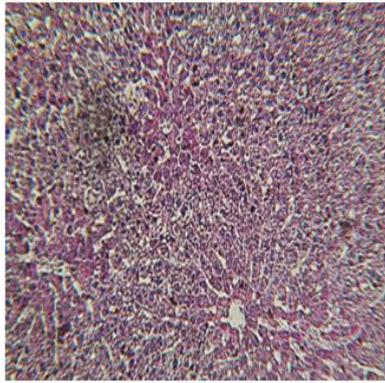


Figure 17: Hepatic parenchyma with preserved architecture made with radial span of Remack converging towards a central vein in control rats. H&E ( $\times 100$ ).

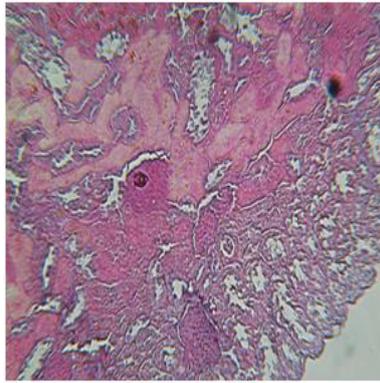


Figure 18: Renal parenchyma fact tubes and regular glomeruli in control rats. H&E ( $\times 100$ ).

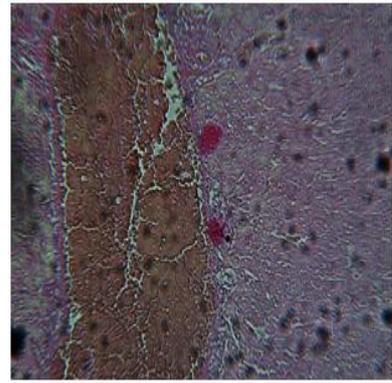


Figure 19: Congestive liver with architecture preservation of male rats after oral CCT fruit methanolic extract administration at a dose of 265 mg/kg for six weeks. H&E ( $\times 100$ ).

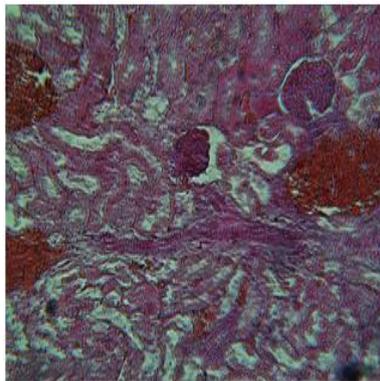


Figure 20: Congestive kidneys of male rats after oral CCT fruit methanolic extract administration at a dose of 265 mg/kg for six weeks. H&E ( $\times 400$ ).

obvious sign of hepatocellular injury is leakage of cellular enzymes into plasma. When the liver cell membrane is damaged, a variety of enzymes normally located in the cytosol are released into blood stream. The estimation of the GPT (glutamic-pyruvic transaminase) and GOT (glutamic- oxaloacetic transaminase) in the serum is useful quantitative marker for the extent and type of hepatocellular damage<sup>34,35</sup>. An increase in the level of ALP (Alkaline phosphatase) is an indication of biliary obstruction<sup>34, 36</sup>.

The male rats treated with 440 mg/kg of the methanol fruit extract of *C. colocynthis* showed changes in the level of these enzymes specially a significant increase in GOT and GPT activity after 3 days until the 5<sup>th</sup> day of the treatment. The level of ALP showed significant increase in groups sacrificed after 1, 3, 5, 7, 10 and 14<sup>en</sup>days of the treatment. This result is in line with changes noted in of serum transaminases and ALP levels of the intoxicated rats in subacute test. The significant increase in serum GPT activity that was observed could be an evidence of hepatotoxicity caused by the extract. Moreover, the

severity of the changes increased with increased of duration of the treatment, suggesting a cumulative effect of this extract. These findings seem to be in agreement with the work reported by Khatibi<sup>37</sup>, Dehghani and Pananjeshshahin<sup>38</sup> and Diwan *et al.*<sup>39</sup> in mice.

On the other hand, since the most plasma proteins can act as indicators of the synthetic capacity of the liver, the decrease in serum protein concentrations in rats treated with the CCT might be interpreted as a result of liver dysfunction. Indeed, following cellular damage, the capacity to synthesize protein is reduced, and as the extent of damage increases, the levels of these proteins in the plasma will tend to decrease. Furthermore, the results obtained showed a significant reduction in glycaemia in treated rats, this result is in line with the work reported by Benmehdi *et al.*<sup>40</sup>, who tested the effect of saponosides crude extract isolated from *Citrulluscolocynthis* seeds on blood glucose level in rats. According to Shafaei *et al.*<sup>41</sup>, the observed hypoglycemic effects of pulp extract may be due to wounded intestine and injured renal proximal tubules and their subsequent reduced ability to regulate

glucose transportation. In addition, impaired hepatic function and glucose metabolism may be a contributing mechanism for induced hypoglycemia.

The kidney is the second most common target of chemical injury<sup>42, 43</sup>. This is due to the fact that many chemicals are excreted through the urine. This vital organ exercises a major influence in regulating the composition of the blood to maintain the internal homeostatic mechanisms.

The kidneys possess the capacity to filter out, via the glomeruli, a whole range of endogenous substances from the plasma, e.g. creatinine, urea, electrolytes and proteins. Since creatinine and urea are normally filtered from the plasma and only reabsorbed or secreted by the proximal tubule to a minor extent, both have been used as indices of renal clearance. Renal diseases, which diminish the glomerular filtration, lead to urea retention. Additionally, creatinine retention in the blood is evidence of kidney impairment<sup>44</sup>. Plasma creatinine is generally thought to be a better marker than urea of glomerular function<sup>45,46</sup>.

Regarding, the significant elevation in serum levels of some renal indices (uric acid, urea, creatinine) after acute and subacute treatment with colocynth fruit extract, this indicated the impairment in the renal function due to the alcoholic extract of this plant. These results are in correlation with the congestive appearance of renal parenchyma. Followed the same trends as renal parameters, CCT intoxication revealed significant elevation in Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> values compared to those recorded from control rats.

Hematological analysis of plant extract in animals is one of the important methods of assessing the toxicity of plant extract in animals<sup>47</sup>. The hematopoietic system is often overlooked as a possible target for chemical injury<sup>48</sup>. Many chemicals can injure the system without damaging the marrow by such mechanisms as oxidative hemolysis within the circulation and immunotoxic reactions with blood components.

In this work, the effects on the hematopoietic system can be manifested as a significant reduction in RBC, HCT and HGB after the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days of the treatment which indicated anaemia. The same picture is observed for these parameters after long-term treatment with CCT extract. It seems that this anaemia is microcytic hypochromic in treated rats as indicated by the low MCV and MCH values. In addition, the low levels of WBC indicated leucopenia which may be the result of overwhelming inflammation, peripheral leukocyte destruction, bone marrow toxicity, loss of lymph, stress<sup>49</sup> or neutropenia<sup>30</sup>. Furthermore, the low HCT values can be due to decrease in the circulating RBC or to an increase in plasma volume. Moreover, a significant reduction in spleen relative weight was remarked until the 5<sup>th</sup> day of treatment. Changes in spleen weight in rodents can be a sensitive indicator of hypo- or hypercellularity of blood cells<sup>31</sup>. Then, CCT might be toxic to circulating red cells, interfered with their production and that of platelets. These findings are in disagreement with the significant increases in RBCs count, haemoglobin concentration and packed cell volume found by Elgerwi et al.<sup>16</sup> after administration of glucosidal principles CCT pulp fruit. However, the

results obtained by Amamou et al.<sup>50</sup> who have shown a decreasing on erythrocytes and hematocrit levels following colocynth oil treatment agrees with the present findings. These authors had explained such effects by the presence of phyosterols in this oil, which could replace cholesterol in cell membrane in erythrocytes and changes physics properties of erythrocytes membrane and reduced their flexibility. The reduction of flexibility of erythrocytes membrane can short cell life<sup>51</sup>.

The histopathological findings in the liver revealed that oral administration of CCT fruit extract to rats in acute and subacute toxicity studies caused hepatic damage as blood congestion. The present data are in partial accordance with Khatibi<sup>37</sup> who observed in the liver sections after intraperitoneal administration of alcoholic extract of *C. colocynthis* at higher doses (200 and 400 mg/kg); small hemorrhages in many lobules and congestion of central veins and sinusoids accompanied mild nonspecific inflammation with hepatocellular necrosis. Mixed neutrophil and lymphocyte infiltrate involving the parenchyma was observed but no bile duct injury.

## CONCLUSION

To sum up the above discussion, this study demonstrated that ripe fruit *C. colocynthis* extract produced a significant hepatorenal toxic effect in the case of long term administration or at high concentration evidenced by: low body weight and food consumption, anaemia, leucopenia, alterations in serum constituents, transaminases and ALP activities, tissue damage and death. Therefore, caution is needed in the use of this plant and effort must be exerted to identify plants utilized in folk medicine having narrow therapeutic indices as their use is dangerous and should be carefully researched. Further studies are in progress in order to evaluate modes of action.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank CNEPRU, for financial support of the project. We also thank Mr R. BENADDI and the staff of Central Analysis Laboratory, CHU of Sétif, Algeria. A special thanks are also addressed to Pr. D. Abdellouche, Dr. Krache and the staff of the laboratory of anatomopathology, CHU of Sétif, Algeria.

## REFERENCES

1. Islam, R., Khurshid Alam A.H.M., Salam B. M., Hossain A., Baki A., Sadik G. Toxicological studies of two compounds isolated from *Loranthus globosus* Roxb. *Pak. J. Biol. Sc* 2007; 10: 2073-2077.
2. Blaskovich, M. A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., Sebt, SM. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res* 2003; 63: 1270-9.
3. Errajraji A., Ouhdouch F., El-Ansari N. Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète de type 2 au Maroc: Use of medicinal plants for type 2

- diabetes treatment, in Morocco. *Médecine des Maladies Métabolique* 2010; 4(3): 301–304.
4. Ziyat A., Legssyer A., Mekhfi H, Dassouli A., Serhrouchni M., Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology* 1997; 58: 45-54.
  5. Abdel-Hassan I.A., Abdel-Barry J.A., Mohammeda S.T. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 71: 325-30.
  6. Seger C., Sturm S., Mair M-E., Ellmerer E. P., Stuppner H. 1 H and 13 C NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae). *Magn. Reson. Chem* 2005; 43: 489-491.
  7. Nayab D., Ali D., Arshad N., Malik A., Choudhary M.I., Ahmed Z. Cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*, Pakistan 2006.
  8. Husain, A., Virmani, O. P., Popli, S. P., Misra, L. N., Gupta, M. M., Srivastava, G. N. Abraham, Z. and Singh, A. K. Dictionary of Indian Medicinal Plants. CIMAP, Lucknow, India 1992: 546.
  9. Al-Faraj, S. Haemorrhagic colitis induced by *Citrullus colocynthis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol* 1995; 89 (6): 695-696.
  10. Goldfain D., Lavergne A., Galian A., Chauveinc L., Prudhomme F. Peculiar Acute Toxic Colitis after Ingestion of Colocynth a Clinicopathological Study of Three Cases. *Gut* 1989; 30: 1412-8.
  11. Khurshid Alam, B. M. Islam, R., Salam A.H.M., Moniruzzaman Manir K. A. Baki M., Aslam Hossain A., and Sadik G. Toxicological studies of N-transferuloyl-4-methyl dopamine isolated from *Achyranthes ferruginea*. *Pak. J. Biol. Sci* 2006; 9: 1052-1055.
  12. Litchfield J. T. and Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol* 1949; 96: 99-113.
  13. Nmila R., Gross R., Rchid H., Roye M., Manteghetti M., Petit P., Tijane M., Ribes G., Sauvaire Y. Insulinotropic effect of *Citrullus colocynthis* fruit extracts. *Planta Med* 2000; 66:418-423.
  14. Adam S.E.I., Al-Yahya M.A., Al-Farhan A.H. Combined toxicity of *Cassia senna* and *Citrullus colocynthis* in rats. *Veterinary and Human Toxicology* 2001; 43: 70-2.
  15. Bakhiet A.O., Adam S.E.I. An estimation of *Citrullus colocynthis* toxicity for chicks. *Veterinary and Human Toxicology* 1995; 37: 356-8.
  16. Elgerwi A., Benzekri Z., Awaidat S., El-Magdoub A., Abusninal A., El-Mahmoudy A. Subchronic haemotoxicity and histotoxicity of *Citrullus colocynthis*. *Journal of American Science* 2013;9(5): 79- 87.
  17. Kingsbury, J.M. Poisonous Plants of the United States and Canada. Englewood Cliffs.; New Jersey 1964.
  18. Barri, M.E., Onsa, T.O., Elawad, A.A., Elsayed, N.Y., Wasfi, I.A., Bari, E.M., Adam, S.E.(1963). Toxicity of five Sudanese plants to young ruminants. *Journal of Comparative Pathology*. 93: 559 – 575.
  19. Elawad, A.A., Abdel-Bari, E.M., Mahmoud, O.M., Adam, S.E. The effect of *Citrullus colocynthis* on sheep. *Veterinary and Human Toxicology* 1984; 26: 481-485.
  20. Scott, M.L., Nesheim, M.C., Young, R.J. Nutrition of the chicken. ML Scott and Associates, Ithaca, New York, 1976, pp. 541.
  21. Ickert, G. Toxicology of Colocynth. *Zentralbl Pharma. Pharmakother. Laboratoriums Diag* 1980; pp. 118.
  22. Loomis, T.A., and Hayes, A.W. Loomis's Essentials of Toxicology, 4th Edition, Academic Press, California 1996.
  23. Pascoe D. Toxicology. Edward Arnold limited. London 1983.
  24. Rahawi A. M. and Youkana S. O. Pathological changes in liver and intestine of rats experimentally intoxicated by the alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* fruits. *Iraqian Revue for veterinary sciences* 2016; 62: 633-639.
  25. Marzouk B., Marzouk Z., Halouib E., Fenina N., Bouraouic A., Aounia M. Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 128: 15–19.
  26. Marzouk B., Marzouk Z., Haloui E., Turki M., Bouraoui A., Aouni M. and Fenina N. Anti-inflammatory evaluation of immature fruit and seed aqueous extracts from several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10(20): 4217-4225.
  27. Chen J.C., Chiu M.H., Nie R.L., Cordell G.A., Qiu S. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep* 2005; 22:386-399.
  28. Delazar A., Gibbons S., Kosari A.R., Nazemiyeh H., Modaresi M., Nahar L., Satyajit D.S. Flavone c-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *DARU* 2006; 14:109-114.
  29. Yoshikawa M., Morikawa T., Kobayashi H., Nakamura A., Matsuhira K., Nakamura S., Matsuda H. Bioactive saponins and glycosides. XXVII. Structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides and anti-allergic constituents from *Citrullus colocynthis*. *Chem. Pharm. Bull* 2007; 55:428-434.
  30. Al-Yahia M.A., Al-Farhan A. H., Adam S. E. I. Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *Citrullus colocynthis* and *Nerium oleander* in rats. *Fitoterapia* 2000; 71: 385- 391.
  31. Keller K. A., Banks C. Multidose general toxicology studies. Chapter 7. In: Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation. Second Edition. Pp 149- 184. Informa healthcare. New York, USA. Inc 2006.
  32. Tsuchiya, S., S. Miyashita, M. Yamamoto, S. Horie and S. Sakai et al. Effect of mitragynine, derived from Thai folk medicine, on gastric acid secretion through opioid receptor in anesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol* 2002; 443: 185-188.
  33. Taufiq-Ur-Rahman, M., J.A. Shilpi, M. Ahmed and C.F. Hossain. Preliminary pharmacological studies on

- piper chaba stem bark. *J. Ethnopharmacol* 2005; 99: 203-209.
34. Udem, S.C., Obidoa, O. and Asuzu, I.U. Acute and chronic toxicity studies of *Erythrina senegalensis* DC stem bark extract in mice. *Comparative Clinical Pathology* 2009; 19: 275-282.
35. Kumar G., Sharmila Banu G., VanithaPappa P., Sundararajan M., Rajasekara Pandian M. Hepatoprotective activity of *Trianthemafortulacastrum* rats L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino. *J. Ethnopharmacol* 2004; 92: 37-40.
36. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. Academic, USA 1997; 285-302.
37. Khatibi R. Relationship between Alcoholic Extract of *Citrullus Colocynthis* and Rat Liver (Case Study: Iran-south East of Iran). *Journal of Agricultural Science* 2012; 4(1): 219-222.
38. Dehghani F., Panjehshahin M.R. The toxic effect of alcoholic extract of *Citrullus colocynthis* on rat liver. *J. Pharmacol. Ther* 2006; 5: 117-119.
39. Diwan F.H., Abdel-Hassan I. A., Mohammed S.T. Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2000; 6 (2/3): 345-351.
40. Benmehdi H., Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Benariba N., Tabti B. Effect of saponosides crude extract isolated from *Citrullus Colocynthis* (L.) seeds on blood glucose level in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; 5(31): 6864-6868.
41. Shafaei H., Esmaili A., Soleimani Rad J., Delazar A. and Behjati M. *Citrullus colocynthis* as a medicinal or poisonous plant: A revised fact. *Journal of Medicinal Plants Research* 2012; 6(35): 4922-4927.
42. Hook JB, Goldstein RS. Toxicology of the Kidney. New York: Raven Press, 1993.
43. Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Molecular and biochemical mechanisms of chemically induced nephrotoxicity: a review. *Chem Res Toxicol* 1990; 3:171.
44. Wurochekke A. U., Anthony A. E., Obidah W. Biochemical effects on the liver and kidney of rats administered aqueous stem bark extract of *Xemenia Americana*. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7 (16): 2777-2780.
45. Evans G. O. The use of an enzymatic kit to measure creatinine in the mouse and three other species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1986; 85: 193-5.
46. Grotsch H., Hadju P. Interference by the new antibiotic cefiprome and other cephalosporins in clinicallaboratory test, with specific regard to the Jaffe reaction. *J. Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1987; 25: 49- 52.
47. Ashafa A. O. T., Yakubu M. T., Grierson D. S., Afolayan A. J. Toxicological evaluation of the aqueous extract of *Felicia muricata* Thum. Leaves in Wistar rats. *Afr. J. Biotechnol* 2009; 6: 949-954.
48. Irons RD. Toxicology of the Blood and Bone Marrow. New York: Raven Press, 1985.
49. Kram, D. J., Keller, A. Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation. Second Edition. Informa healthcare. New York, USA. Inc 2006.
50. Amamou F., Bouafia M., Chabane-Sari D., Meziane R. K., Nani A. *Citrullus colocynthis*: a desert plant native in Algeria, effects of fixed oil on blood homeostasis in Wistar rat. *J. Nat. Prod. Plant Resou* 2011; 1 (3): 1-7.
51. Weed R.I. *American Journal of Medicine* 1970; 49: 147-150.

**المخلص :** سمح التحليل الكيميائي للمستخلص الميثانولي للفاكهة المجففة للحنضل *Citrullus colocynthis* بالكشف عن وجود: قلويدات ، دباغ ، فلافونويدات، ستيرويدات، تيربينات، صابونينات ومركبات جليكوسيدية.

قدرت الجرعة المتوسطة الفاتلة (LD<sub>50</sub>) للمستخلص المعطى عن طريق الفم بحوالي 1311.45 ملغ / كغ. لوحظ بعد إعطاء المستخلص بجرعة 440 ملغ/كغ انخفاض معنوي في الكتلة النسبية لبعض الأعضاء: الكبد، الكلى، الرئتين، الطحال والخصيتين وفي عدد كريات الدم الحمراء والبيضاء وفي مستويات الهيماتوكريت والهيموغلوبين. كانت نشاطية الانزيمات AST و ALT و الفسفاز القاعدي عالية لدى أغلب المجموعات المعالجة. سجلت مستويات عالية للكرياتينين وبشكل ملحوظ لدى جميع المجموعات المعاملة مع وجود زيادة كبيرة في مستوى اليوريا لدى المجموعة المقتولة بعد ثلاثة أيام من الحقن.

لوحظ في دراسة السمية الشبه الحادة و الشبه المزمنة، انخفاض كبير في الوزن النهائي للجسم والكتلة النسبية للأعضاء (الكبد، الكلى، الرئتين والقلب) لدى الحيوان. أظهرت تحاليل الدم انخفاضا كبيرا في عدد كريات الدم الحمراء والبيضاء وفي مستويات الهيماتوكريت والهيموغلوبين. كانت المستويات العالية في نشاطية الانزيمات ALT، AST و الفسفاز القاعدي وكذلك اليوريا، حمض اليوريك والكرياتينين لدى الجرذان المعالجة مصحوبة على المستوى النسيجي باحتقان دموي كبدي كبير مع وجود تليف ما بين الخلايا الكبدية وكذلك احتقان للأوعية الدموية للكلى مع تسجيل التهاب على مستوى الأنسجة البينية.

يمكن لناتج كل من زيادة نفاذية الأوعية الدموية على مستوى الكبد و الكلى وكذلك معدلات بيروكسيد الدهون في الدم، و على مستوى كل من جناسة الكبد و الكلى باعطاء تفسير جزئي للتغيرات الدموية والنسجية الملاحظة.

**الكلمات المفاتيح:** LD<sub>50</sub> ، *Citrullus colocynthis*، المستخلص الميثانولي، نفاذية الأوعية الدموية، بيروكسيد الدهون ، السمية.

**Résumé :** Le screening phytochimique de l'extrait méthanolique des fruits du *Citrullus colocynthis* et ses différentes fractions a permis de révéler la présence de: alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, stérols, terpènes, saponines et des glycosides cardiotoniques.

La DL<sub>50</sub> de l'extrait administré par voie orale est égale à 1311,45 mg/kg. L'administration orale de l'extrait avec une dose de 440 mg/kg a induit une réduction significative de la masse relative du foie, reins, poumons, rate et testicules ainsi que du nombre de globules rouges (GR), de globules blancs (GB), du taux d'hématocrite (HCT) et d'hémoglobine (HGB). Les activités de l'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) et de la phosphatase alcaline (ALP) étaient plus élevées pour les principaux groupes traités. Des niveaux de créatinine significativement élevés pour l'ensemble des groupes traités avec une augmentation significative du taux d'urée pour le groupe sacrifié après trois jours de traitement ont caractérisé le bilan de la fonction rénale. L'analyse des coupes histologiques a révélé la présence de congestion dans le parenchyme hépatique et rénal des groupes sacrifiés après un et cinq jours du traitement.

Dans les études de la toxicité subaiguë subchronique, une réduction significative du poids corporel final et de la masse relative des organes (foie, rein, poumons, cœur et testicules) est constatée. Le profil hématologique analysé a révélé une diminution significative du nombre de GR, de (GB) et du contenu en HCT et en HGB. L'élévation significative de l'activité des transaminases et de l'ALP, de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine chez les rats traités était accompagnée sur le plan histologique d'une importante congestion sanguine au niveau hépatique avec la présence de foyer de fibrose entre les hépatocytes ainsi qu'une congestion vasculaire dans le parenchyme rénal avec une inflammation discrète dans le tissu interstitiel.

L'augmentation de la perméabilité vasculaire enregistrée au niveau hépatique et rénal ainsi que du taux de peroxydation lipidique au niveau de l'hémolysat des GR, de l'homogénat du foie et des reins corroborent l'ensemble des résultats trouvés et peuvent expliquer en partie les changements hématologiques et histologiques observés.

**Mots-clés:** *Citrullus colocynthis*, DL<sub>50</sub>, l'extrait méthanolique, perméabilité vasculaire, peroxydation lipidique, toxicité.

**Abstract:** The phytochemical screening of the fruits methanolic *Citrullus colocynthis* crude extract and its different fractions revealed the presence of: alkaloids, tannins, flavonoids, sterols, terpenes, saponins and cardiotonic glycosides.

The LD<sub>50</sub> of the extract administered orally is 1311.45 mg/kg. Oral administration of the extract at a dose of 440 mg/kg induced a significant reduction in the relative weight of liver, kidneys, lungs, spleen and testes as well as the number of red blood cells (RBC), white blood cells (WBC), hematocrit (PCV) and hemoglobin (HG). The Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) activities were higher for the most treatment groups. A significantly elevated creatinine level for all the treatment groups with a significant increase in urea level for the group sacrificed after three days of treatment has characterized the renal function balance. Analysis of histological sections revealed the presence of congestion in the hepatic and renal parenchyma of especially for the groups sacrificed after one and five days of the treatment.

In the subacute and suchronic toxicity study, a significant reduction in final body and relative organ weights (liver, kidney, lung, heart and testes) was observed. The hematological profile analyzed revealed a significant decrease in the number of RBC, WBC, the content of PCV and HG. The significant elevation of transaminases and ALP activity, urea, uric acid and creatinine in treated rats were histologically accompanied by a significant hepatic blood congestion with the presence of focal fibrosis between hepatocytes as well as vascular congestion in the renal parenchyma with discrete inflammation in the interstitial tissue.

The the increase in hepatic and renal vascular permeability as well as the rate of lipid peroxidation in RBC hemolysate, liver and kidneys homogenate support the results found and could in partly explain the hematological and histological changes observed.

**Keywords:** *Citrullus colocynthis*, LD<sub>50</sub>, methanolic extract, vascular permeability, lipid peroxidation, toxicity.