

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche

جامعه محمد الصديق بن يحيى – جيجل-

Université Mohammed Seddik Ben Yahia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**

Option : Pharmacologie Expérimentale

Thème

**Évaluation de l'effet antioxydant d'un extrait éthanolique
de la plante *thapsia garganica* de la région de Jijel contre la
toxicité hépatique du diclofénac chez les souris NMRI.**

Membres de Jury :

Présidente : M^{me} ROUBAH. H

Examinatrice : M^{me} KEBSA. W

Encadreur : Dr BENGUEDOUAR. L

Présenté par :

M^{elle} : BOUHIDEL Ines

M^{elle} : BOURIDANE MOUNIRA

M^{elle} : KHELLAF Amira

Année Universitaire 2015-2016

Numéro d'ordre :.....

Remerciement

Avant tout nous remercions le bon Dieu, pour nous avoir aidé à accomplir ce travail dans des bonnes conditions.

Nous tenons le remerciement à L'encadreur Benguedouer Lamia d'avoir bien dirigé ce travail par ses conseils, sa documentation, sa compréhension, sa patience et ses encouragements.

Les membres de jury pour nous avoir honoré en acceptant de juger notre travail, ainsi que les enseignants qui ont contribué à notre formation.

Les personnels de laboratoire : Nassiha, Ratiba, Ines, Widad ...

Nous remercions aussi tous nos amis de la promotion qui nous ont aidés à élaborer ce travail.

En fin nous remercions tous les amis et toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Liste des abréviations	i
Liste des figures	iii
Liste des tableaux	v
Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I. Le stress oxydatif	
I.1. Définition du phénomène du « stress oxydatif »	5
I.2. Les radicaux libres.....	5
I.3. Les espèces réactives d’oxygène.....	5
I.4. Balance antioxydant et stress oxydatif.....	6
I.5. Sources biologiques de radicaux libres.....	6
5.1.1. Sources endogènes.....	6
5.1.2. Sources exogènes.....	7
I.6. Dommages biologiques du stress.....	8
I.6.1. L’Acide désoxyribonucléique (ADN).....	8
I.6.2. Les protéines	9
I.6.3. Les lipides membranaires	9
I.7. Système de défense antioxydant.....	10
I.7.1. Système enzymatique.....	10
I.7.2. Système non enzymatique.....	11
Chapitre II. Diclofénac sodique	
II.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens	14
II.2. Le diclofénac sodique	15
II.2.1. Données pharmaceutiques	15
II.2.2. Propriétés physicochimiques	15
II.3. Pharmacologie du diclofénac sodique	16
II.3.1. Pharmacocinétique.....	16
III.3.1.1. Absorption.....	16
III.3.1.2. Distribution.....	16
III.3.1.3. Métabolisme.....	16
III.3.1.4. Elimination.....	17
II.3.1. Pharmacodynamie du diclofénac sodique.....	17

II.4.	Toxicité du diclofénac sodique	17
II.4.1.	Hépatotoxicité	17
II.4.2.	Néphrotoxicité	18
II.5.	Diclofénac et stress oxydatif	19
Chapitre III. Thapsia garganica		
III.1.	Description de la plante étudiée : <i>Thapsia garganica</i>	21
III.1.1.	Données botaniques.....	21
III.1.1.1.	Les apiacées	21
III.1.1.2.	Taxonomie.....	21
III.1.1.3.	Présentation et description de la plante <i>Thapsia garganica</i>	22
III.1.2.	Distribution géographique et habitat.....	22
III.2.	Ethnopharmacologie de <i>Thapsia garganica</i>	23
III.2.1.	Usages médicaux	23
III.2.2.	Utilisations pharmacologiques.....	23
III.3.	Données phytochimiques et biologiques de <i>thapsia garganica</i>	24
III.3.1.	Les huiles essentielles.....	24
III.3.2.	Les sesquiterpènes lactones « la thapsigargine ».....	24
III.3.3.	Les polyphénols.....	25
III.4.	Toxicité de la plante.....	25
III.4.1.	Principes toxiques.....	25
III.4.2.	Circonstances de l'intoxication.....	25
III.4.3.	Symptomatologie.....	26
Partie pratique		
Chapitre I. matériels et méthodes		
I.	Matériel végétale	29
I.1.	Préparation de l'extrait éthanolique.....	29
I.1.1.	A partir de racine.....	29
I.1.2.	Partie aérienne.....	29
I.2.	Extraction des polyphénols (Séparation liquide-liquide).....	30
I.3.	Dosage des polyphénols totaux.....	30
I.4.	Dosage des flavonoïdes	31

II.	Etude du pouvoir anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la plante <i>T.garganica</i> in vitro.....	31
III	Etude des effets de <i>T. garganica</i> in vivo : mesure des activités antioxydants.....	32
III.1.	Dosage du glutathion (GSH)	33
III.2.	Mesure de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)	34
III.3.	Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique..	35
III.4.	Dosage du Malondialdéhyde cytosolique (MDA).....	35
III.5.	Dosage des protéines totales.....	36
Chapitre II. Résultats et discussion		
II.1.	Etude phytochimique.....	38
II.2.	Evaluation de l'activité anti-radicalaire de <i>T. garganica</i> contre le radical DPPH.....	40
II.3.	Etude de l'activité anti-oxydante de la plante <i>T. garganica</i> in vivo.....	43
Conclusion.....		50
Références bibliographiques.....		52
Annexe		
Résumé		
Abstract		
ملخص		

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$:	oxygène singulet.
AINS :	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiennes.
BSA :	Bovin Serum Albumin.
CAT :	Catalase.
CDNB :	Chlorodinitrobenzène.
Cox :	Cyclo-oxygénase.
CYPs :	famille cytochrome P.
DTNB :	acide 5,5`-dithiobis-2-nitrobenzoïque.
EOA :	Espèces oxygénées activées.
GPx :	Glutathion peroxydase.
GR :	Glutathion réductase.
GSH :	Glutathion réduit.
GSSG :	Glutathion oxydé.
GST :	Glutathion-S-transférase.
H_2O_2 :	peroxyde d'hydrogène.
MDA :	Manoldialdéhyde.
NAD^{+} :	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé.
NADPH_o :	NADPH oxydase.
NADPH,H^+ :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
NO^o :	Monoxyde d'azote.
NO^o_2 :	Dioxyde d'azote.
SOD :	Superoxyde dismutase.
NOS :	Nitric oxyde synthase.
$\text{O}_2^{\cdot-}$:	Anion superoxyde.
ROS :	Réactive oxygen species.
TBA :	Acide thiobarbituric acétique.
TBARS :	Thiobarbituric acid-reactive substances.
TCA :	Trichloroacide acétique.
TNB :	Acide thionitrobenzoïque.
D	Diclofénac.

PA	Partie Aérienne.
R	Racine.
DMT	Dose Maximal Toxique.
AGPI	Acide Gras Polyinsaturé.
C	Contrôle.
EC	Extrait chloroformique.
NMRI	Naval Medical research Institute

Liste des figures

Figure 1 :	Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces.....	6
Figure 2 :	Schéma représentant la chaîne respiratoire mitochondriale source de production des EOA.....	7
Figure 3 :	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	8
Figure 4 :	Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	9
Figure 5 :	Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.....	10
Figure 6 :	Schéma de l'intérêt potentiel des inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase.....	14
Figure 7 :	Formule développée du diclofénac sodique.....	15
Figure 8 :	<i>Thapsia garganica</i> (Bordj T'har, Taghrast; 2016).....	22
Figure 9 :	Structure de la thapsigargine.....	24
Figure 10 :	Réaction d'Ellman.....	33
Figure 11 :	Effet scavenger in vitro de l'extrait partie aérienne de <i>Thapsia garganica</i> à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.	41
Figure 12 :	Effet scavenger in vitro de l'extrait chloroformique de <i>Thapsia garganica</i> à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.....	41
Figure 13 :	Effet scavenger in vitro de l'extrait racine de <i>Thapsia garganica</i> à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.....	42
Figure 14 :	Variation du taux cytosolique de GSH hépatique.....	44
Figure 15 :	Une voie possible de métabolisation du diclofenac au moyen d'un métabolite réactif : une quinoneimine de 5-OH-diclofénac.....	45
Figure 16 :	Variation de l'activités enzymatique de la GST hépatique	48
Figure 17 :	Variation de l'activité enzymatique de la catalase hépatique	50

Figure 18 : Variation du taux cytosolique du MDA hépatique..... 53

Liste des tableaux

Tableau I :	Intervalle de différentes doses toxiques du diclofénac sodique.....	16
Tableau II :	Position systématique de <i>T. garganica</i>	18
Tableau III :	Rendement d'extraction de diverses fractions extraites à partir des racines et de la partie aérienne de la plante <i>Thapsia garganica</i>	32
Tableau IV :	Evaluation quantitatives des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits racines et partie aérienne de <i>T.garganica</i>	33

Introduction

Indispensable à la vie aérobie, l'oxygène est utilisé par les mitochondries pour produire de l'énergie. Les conséquences de l'activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, les mitochondries fournissent à la cellule, grâce à l'oxygène, une source d'énergie importante sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique. D'autre part, une faible fraction de l'oxygène (2 à 3%) n'est pas correctement convertie en eau suite à des imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale (Favier, 2003). L'oxygène donne alors naissance à des espèces oxygénées activées parmi lesquelles figurent des radicaux libres comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle. Ces radicaux libres réagissent avec de nombreux composés des cellules : protéines, lipides, ADN. Le stress oxydant ainsi généré a été au cours des dernières années de plus en plus impliqué dans diverses pathologies telles que les cancers, l'hypertension, le diabète de type 2, l'obésité...etc.

Bien que l'usage des substances pharmaceutiques naturelles ou synthétiques soit devenu primordial pour la santé de l'homme, la consommation de ces dernières doit être dans la norme, ne dépassant pas un certain seuil. Parmi les médicaments les plus commercialisés et les plus répons pour le traitement d'un grand nombre de pathologies (Bragança *et al.*, 2012); les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), de nombreux médicaments de cette classe sont utilisés à travers le monde notamment l'ibuprofène, l'acide acétylsalicylique, bien que le diclofénac (DCF) soit majoritairement consommé en raison de son utilisation intensive comme analgésique et antirhumatismale (Ahmad *et al.*, 2009). Les résidus du diclofénac peuvent aujourd'hui être détectés dans le foie conduisant à des toxicités sévères (néphrotoxicité et hépatotoxicité) dont le stress oxydant est impliqué (Karam-Allah *et al.*, 2009).

Les plantes médicinales sont actuellement à l'étude pour leurs propriétés pharmacologiques dans la régulation du stress oxydant. De nos jours, nous comprenons de plus en plus que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits de métabolites secondaires. Leurs propriétés sont actuellement pour un bon nombre reconnue et répertorié, et donc mises à profit dans le cadre de la médecine traditionnelle. Les plantes constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives à savoir les composés phénoliques, qui sont reconnus comme des antioxydants naturels (Chibani *et al.*, 2014).

Thapsia garganica, plante poussant spontanément en Algérie, est l'une des plantes médicinales les plus utilisées pour le traitement du stress, du cancer et de l'inflammation en vue de ses propriétés analgésique, anti-inflammatoire et antioxydante. Parfois, elle est considérée comme

toxique, en raison du pouvoir héritant et pro-oxydant de la Thapsigargine ; substance active de la plante.

Mis à part le fait que le diclofénac soit largement diffusé dans la pharmacopée mondiale en raison de sa prescription dans diverses maladies, il faut prendre en considération ses effets secondaires dont le stress en fait partie.

Au cours de la présente étude nous voulons vérifier si un traitement par le diclofénac entraîne vraiment une toxicité hépatique et rénale par son pouvoir pro-oxydant. Nous avons choisi la plante comme source d'antioxydants en vue de sa richesse en polyphénols.

Les objectifs fixés dans ce cadre d'étude, sont les suivants :

- Analyse quantitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes de différentes fractions obtenues à partir de l'extrait brut de *Thapsia garganica*.
- Evaluation de l'activité anti-radicalaire des différents extraits de *Thapsia garganica* vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH°) : Etude *In vitro*.
- Induction d'un stress oxydant par l'administration d'une dose aiguë d'un anti-inflammatoire (Diclofénac, 100 mg/jour) par voie intrapéritonéale : Etude *In vivo*, chez les souris NMRI.
- Evaluation de l'effet préventif de l'extrait éthanolique de *Thapsia garganica*, administré chaque 24h pendant 4 jours à une dose de 10 mg/kg par voie intrapéritonéale, contre un stress oxydatif rénal et hépatique.

Partie
bibliographique

Chapitre I

Le stress oxydatif

I .Le stress oxydatif

I.1. Définition du phénomène du « stress oxydatif »

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN) avec, comme conséquence, une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés. En situation normale, les EOA sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydants (vitamines, enzymes, oligoéléments...) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif (Pincemail *et al.*, 1999).

I.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié sur ses orbitales électroniques externes. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant de ce fait d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient par la suite une réaction en chaîne (Halliwell, 2001).

I.3. Les espèces réactives d'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites d'une manière accrue lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée (stress oxydant). Ces dernières sont formées en tant que sous-produit naturel du métabolisme normal de l'oxygène et ont un rôle important dans la signalisation cellulaire. Paradoxalement, Ces espèces deviennent «pathologiques» lorsqu'elles sont formés en grandes quantités, Cette production radicalaire est dommageable si elle est prolongée ou incontrôlée, dépassant les capacités de neutralisation et donne lieu au stress oxydant (Favier, 2003).

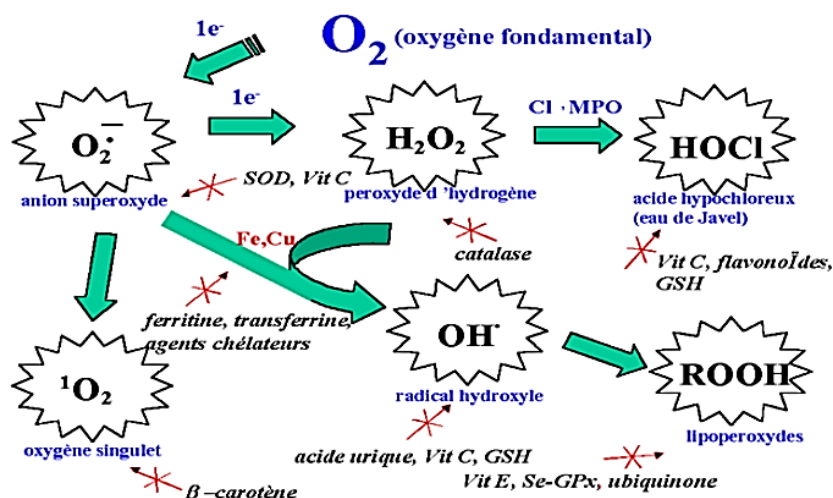


Figure 1. Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH : glutathion, Cl⁻ : anion chlorure ; MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxyde dismutase, Se-GPx : glutathion peroxydase sélénio-dépendante (Pincemail *et al.*, 1999).

I.4. Balance antioxydant et stress oxydatif

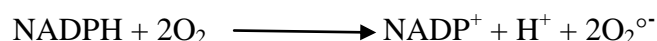
A l'état basal il existe un équilibre entre les radicaux produits et nos systèmes de défense antioxydants. En effet le bon fonctionnement de l'organisme dépend de l'équilibre de la balance entre la quantité de radicaux produits et la capacité de destruction des systèmes antioxydants (Haleng *et al.*, 2007).

I.5. Sources biologiques de radicaux libres

I.5.1. Sources endogènes

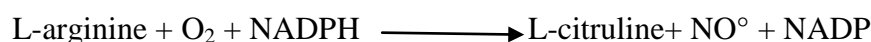
Dans l'organisme il y a de nombreuses sources de ROS dont l'importance varie selon les tissus. La réaction chimique de Fenton produit des ROS dans la cellule. Les sources des ROS sont enzymatiques et non enzymatiques (Dröge, 2001).

La NADPH oxydase est une enzyme présente dans la paroi vasculaire et qui génère en utilisant NADPH comme substrat (Salvayre *et al.*, 2003) selon la réaction suivante :



La xanthine-oxydase joue aussi un rôle important dans la production des ROS (particulièrement O_2 et H_2O_2) en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Harrison, 2012).

Beaucoup de cellules sont capables de produire le monoxyde d'hydrogène (NO^{\cdot}) à partir de l'arginine et de l'oxygène, par une réaction catalysée par la NO synthase :



Le peroxyosome est l'une des sources non enzymatiques importantes dans la production cellulaire de H_2O_2 car cet organelle contient de nombreuses enzymes générant du H_2O_2 (Servais, 2004).

Le réticulum endoplasmique contient des enzymes qui catalysent les réactions de détoxification des drogues liposolubles, la plus connue de ces enzymes ; le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques produisant ainsi les ROS (Servais, 2004). De plus, dans l'organisme, l'oxygène est réduit à 95% dans les mitochondries par voie enzymatique en molécule non toxique comme H_2O . Cependant, il peut subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'anion superoxyde (Favier, 2003).

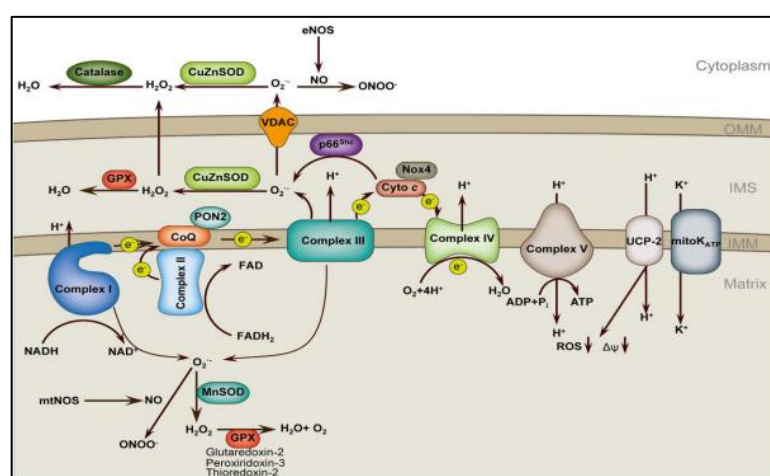


Figure 2. Schéma représentant la chaîne respiratoire mitochondriale source de production des EOA (Tang et al., 2014).

I.5.2. Sources exogènes

Les ROS peuvent être produits par des agents physiques comme les rayonnements (rayons ionisants X, gamma, ou des rayons ultraviolets) capables de produire des anions superoxyde ou de l'oxygène singulet après activation de photosensibilisants (Ghazi, 2011).

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes impliquant principalement la xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase qui peuvent oxyder le métabolite principal de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production de superoxyde. L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la transcription des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase et du cytochrome P 450 (Milane, 2004).

Des toxiques tels que le monoxyde d'azote (NO°) et le dioxyde d'azote (NO_2°), présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels...etc.), participent à la genèse de radicaux libres. Ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires. Le NO° et le NO_2° peuvent aussi réagir avec l'anion superoxyde et le

peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires pour former de puissant oxydant ; le peroxynitrite (ONOO^o) et le radical OH^o (Pincemail *et al.*, 1998).

Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides et herbicides) et médicaments (antibiotiques et anticancéreux) peuvent contribuer à la production des EOA qui se forment comme produits de leur métabolisme *in vivo* (Martínez -Cayuela, 1995).

I.6. Dommages biologiques du stress

Au cours d'un stress oxydatif, les EOA provoquent des dommages au niveau subcellulaire tels que la modification de la réponse des enzymes antioxydants (Aboul-Ela *et al.*, 2011), la peroxydation lipidique au sein de la membrane en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés, l'inactivation des protéines, l'induction des cassures au sein de l'ADN (Jain et Flora, 2012), ainsi que l'altération du message génétique et la dégradation des sucres et ceci en réagissant avec plusieurs résidus d'acides aminés en modifiant leurs structures et, par extension, les structures tertiaires des molécules de protéines (Pincemail *et al.*, 1999).

En raison de leurs réactivité élevée, les EOA interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme en provoquant des maladies multifactorielles telles que l'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le cancer et le processus de vieillissement prématuré (Manduzio *et al.*, 2005 ; Menveille, 2005).

I.6.1. L'Acide désoxyribonucléique (ADN)

L'ADN est une cible privilégié pour les ROS. La guanine, par exemple, peut réagir avec OH^o pour former la 8-hydroxy-2'-désoxyguano-cytosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliqué dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Haleng *et al.*, 2007).

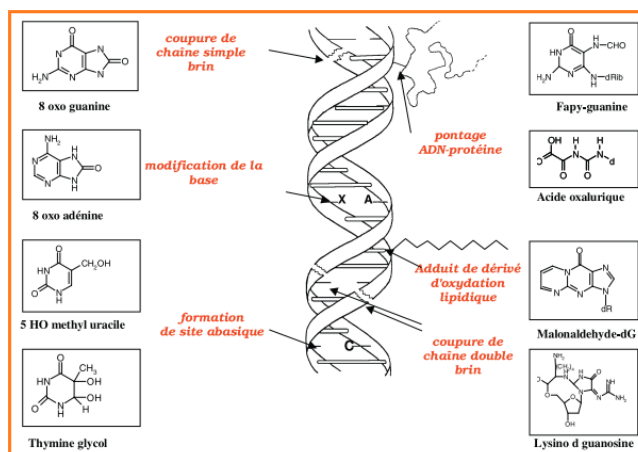


Figure 3. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

I.6.2. Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ROS. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquence, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (Non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Haleng *et al.*, 2007).

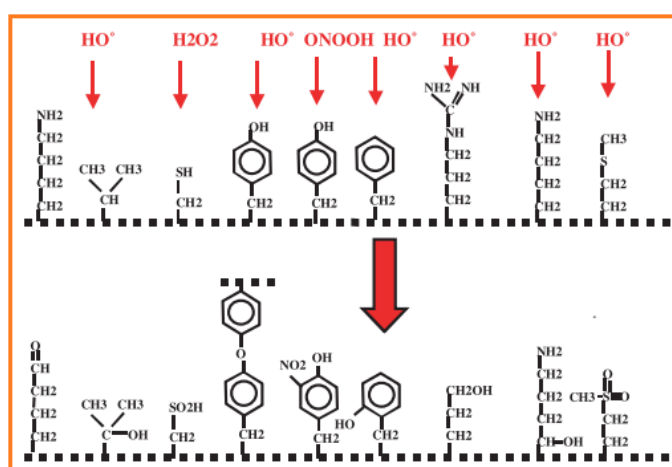


Figure 4. Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

6.3. Les lipides membranaires

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO°), suffisamment réactifs pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction.

Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (Malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues (Haleng *et al.*, 2007).

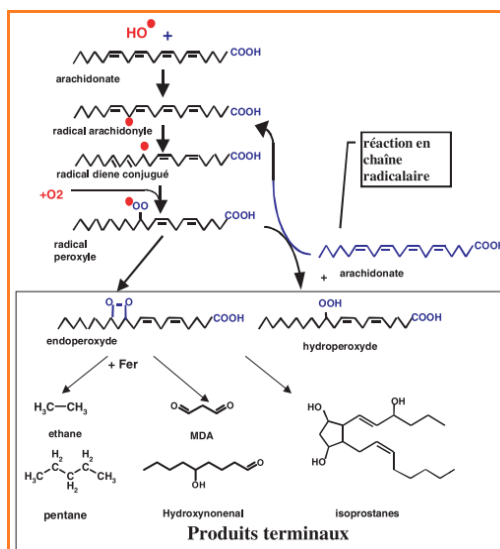


Figure 5. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

I.7. Système de défense antioxydant

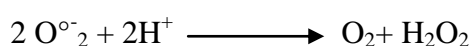
Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Haleng *et al.*, 2007).

Le système de défense contre le stress oxydatif est très large et inclut des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

I.7.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Ce sont des enzymes douées d'activité antioxydante qui leur permet de diminuer la quantité des ROS dans la cellule en présence de leurs co-facteurs. Parmi ces enzymes on cite :

Les superoxydes dismutases (SOD), constituent la première ligne de défense contre le stress oxydatif. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 . Ce dernier étant moins réactif et il pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. La SOD a besoin d'oligoéléments pour fonctionner correctement et dans la nature permet de distinguer trois isoformes de la SOD (Fridovich, 1995) ; la CuZn-SOD présente dans le cytosol, la SOD à Manganèse située dans les mitochondries et une forme CuZn-SOD extracellulaire.

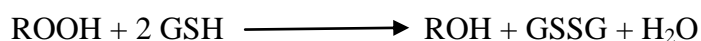
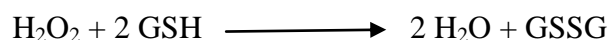


La catalase est l'une des enzymes antioxydante les plus efficaces. C'est une enzyme tétramérique, chaque unité portant un groupement hème et une molécule NADPH. Elle catabolise les peroxydes d'hydrogène générés lors de la dismutation de l'anion superoxyde en molécule d'eau (Waldbaum et Patel, 2010). La réaction est la suivante :



La catalase est principalement localisée dans les peroxysomes et dans les érythrocytes.

La glutathion peroxydase (GPx) est la plus importante enzyme neutralisante de l' H_2O_2 chez les mammifères. Elle est formée de quatre tétramères contenant chacune des atomes de sélénium incorporés dans une molécule de sélénocystéine. Elle assure la réduction du H_2O_2 en eau, des hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (ROH), et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires en utilisant comme donneur d'électrons le glutathion réduit (GSH).



Les molécules de GSSG ainsi obtenues sont réduites par le glutathion réductase à l'aide du co-facteur NADPH sous forme réduite (NADPH, H^+). La GPx est présente dans les liquides extracellulaires, et dans les cellules au niveau du cytosol, dans mitochondries et des membranes (Comhair, 2002). La GR est également localisée dans le cytosol et les mitochondries.

Les thiorédoxines peroxydase (Prx) ont été découvertes récemment et leur activité antioxydante a fait l'objet de plusieurs travaux. Les Prx sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH). Elles réduisent l' H_2O_2 , le peroxydite et de nombreux hydroperoxydes en utilisant la thiorédoxine comme donneur d'électrons. Elles sont présentes dans le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes associés au noyau et aux membranes (Wood, 2003).

Les Glutathion-S-transférases (GST) représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques. Ce sont des enzymes de détoxification glutathion dépendante, qui catalysent la conjugaison du GSH de nombreux substrats (Perrin, 2007).

I.7.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

En plus du système enzymatique, la cellule peut disposer de l'appui des molécules antioxydantes non enzymatiques naturelles ou synthétiques. Elles sont capables de piéger les ROS en captant leur électron libre et en les réduisant ainsi en molécules plus stables.

Le glutathion (GSH) est le thiol intracellulaire le plus abondant. C'est un tripeptide (γ -L-Glutamyl cystéinyl glycine) qui joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydatif. Il permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonctions thiols (R-SH). De plus, il piège le peroxyde d'hydrogène et réagit avec l'oxygène singulet et le radical hydroxyle (Larson, 1988).

Parmi les molécules apportées par l'alimentation et possédants un pouvoir antioxydant important, la vitamine E et C sont des antioxydants très puissants :

➤ La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules de la famille des tocophérols (α , β , γ , δ). Parmi ces quatre isomères, c'est l'alpha-tocophérol liposoluble qui possède les activités antioxydantes les plus intéressantes. Il réduit les radicaux libres provenant de l'oxydation des lipides et inhibe ainsi la propagation lipidique en cédant son hydrogène situé dans le noyau phénolique. Devenu radicalaire, la vitamine E sera prise en charge par l'acide L'ascorbique (Evans, 2000).

➤ La vitamine C (acide ascorbique) est un excellent piègeur des ROS. Elle peut capter le radical hydroxyle, l'oxygène singulet, l'anion superoxyde et aussi réduire le H_2O_2 en eau via l'ascorbate peroxydase. Une fois oxydée, la vitamine C sera réduite via les ascorbates réductases ou par l'acide alphasalicylique (Noctor et Foyer, 1998).

Les oligoéléments apportés par le bol alimentaire comme le sélénium, le manganèse, le cuivre et le zinc ne sont pas des antioxydants mais ils jouent un rôle très important dans le processus de défense contre les ROS. Ce sont des co-facteurs essentiels des enzymes antioxydantes comme la SOD (CuZn-SOD et Mn-SOD) et le glutathion peroxydase (Se-GPx).

Les flavonoïdes sont des substances polyphénoliques d'origine végétale qui possèdent un grand pouvoir antioxydant. Ils ont la capacité à piéger directement les ROS grâce à leur structure par fixation de deux atomes d'hydrogène fournis par deux fonctions thiols (Lahouel *et al.*, 2004). Ils jouent aussi un rôle dans la diminution des ROS générés par la Xanthine oxydase et aussi la réduction du taux d'oxyde nitrique produit par la NO-Synthase en inhibant l'activité de ces deux enzymes (Nijveldt *et al.*, 2001). Certains flavonoïdes peuvent amplifier l'activité de certaines entités antioxydantes endogènes.

Chapitre II

Diclofénac

sodique

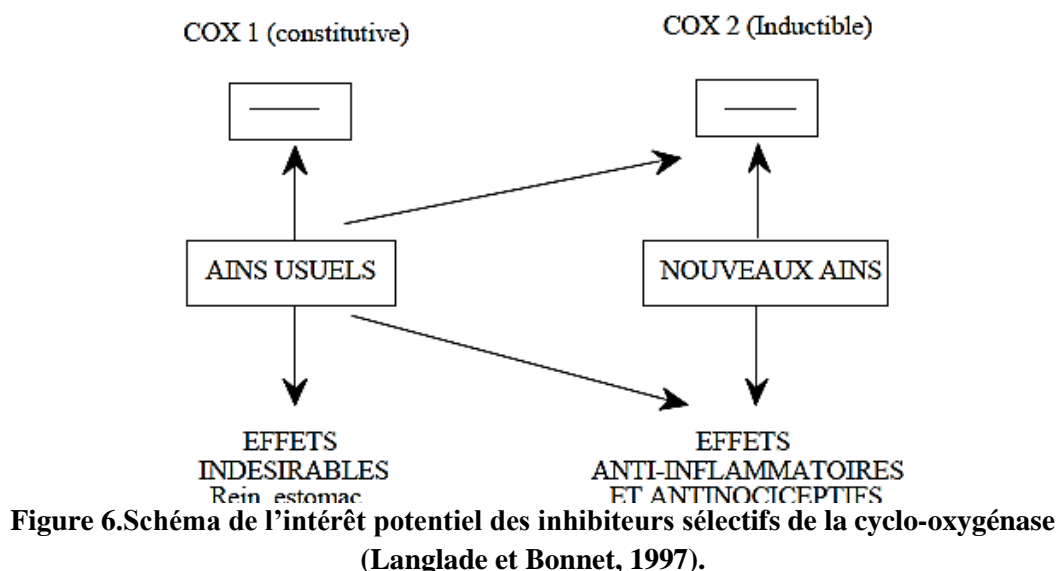
II. Le diclofénac sodique

II.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments symptomatiques capables de s'opposer au processus inflammatoire, quelle qu'en soit la cause (mécanisme, chimique, infectieuse, immunologique), ils agissent sur les signes locaux de l'inflammation : rougeurs, chaleur, douleur et œdème. En outre, tous les AINS possèdent à côté de leur action anti-inflammatoire, une action antalgique et antipyrétique. Les AINS se caractérisent par l'absence d'une structure chimique stéroïdienne, s'opposant en cela aux corticostéroïdes anti-inflammatoires qui sont des glucocorticoïdes. Leur mécanisme d'action commun est l'inhibition de la cyclo-oxygénase (Cox) des tissus enflammés et normaux (Langlade et Bonnet, 1997).

Les AINS appartiennent à diverses catégories mais sont tous capables de bloquer la formation de certaines substances comme les prostaglandines, médiateurs chimiques nécessaires au développement de l'inflammation. Ils sont surtout efficaces dans les phases aiguës de l'inflammation et sont utilisés en rhumatologie, en urologie (coliques néphrétiques), en gynécologie (règles douloureuses) (Mather, 1992).

Les effets indésirables des AINS tels que les troubles gastroduodéaux, réactions d'hypersensibilités et les troubles rénaux. Ainsi, les effets toxiques des AINS (toxicité hépatique, toxicité intestinale,...etc.) (Langlade et Bonnet, 1997).



II.2. Le diclofénac sodique

L'acétate de sodium (Figure 9) est un dérivé phényl acétique, lipophile, composé de deux noyaux aromatiques torsadés et appartenant à la classe chimique des acides aryl-carboxyliques. Il est utilisé pour ses propriétés antalgiques et anti-inflammatoires non stéroïdiennes dans le traitement symptomatique de certaines douleurs notamment les infections douloureuses, les douleurs dentaires et des maladies rhumatismales telles que la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose. (Nayak., 2010 ; Brune et Patrignani, 2015). Son mécanisme d'action est connu par une inhibition de cyclo-oxygénase (COX-2) ; enzyme responsable de la conversion de l'acide arachidonique (Acide gras poly-insaturé) en prostaglandines, thromboxanes et prostacyclines (Rajabalian *et al.*, 2015).

II.2.1. Données pharmaceutiques

Dénomination commune : diclofénac sodique

Nom chimique : 2-[2-(2,6-dichloroanilino) phényl]acétate de sodium

Formule moléculaire : $C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$

Masse moléculaire : 318,1

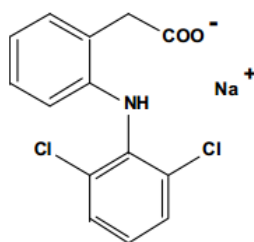


Figure 7. Formule développée du diclofénac sodique (Vidal, 2013).

II.2.2. Propriétés physicochimiques

Le diclofénac sodique est une poudre blanche à blanchâtre au goût salé et amer. À une température de 25 °C, le diclofénac sodique est soluble à 2 % dans l'eau (pH = 7,7). Il est pratiquement insoluble dans les solutions aqueuses acides.

- pH : 7,2.
- Point de fusion : de 280 à 290°C avec dégradation.
- pKa : 3,8 (potentiomètre) 4,7 (spectrophotométrie) (Vidal, 2013).

II.3. Pharmacologie du diclofénac sodique

II.3.1. Pharmacocinétique

II.3.1.1. Absorption

Le diclofénac sodique est rapidement et totalement absorbé après son administration, surtout par voie intraveineuse (IV) comparée à la voie orale. La biodisponibilité par voie rectale est de l'ordre de 50% après l'administration d'un suppositoire (100 mg), le pic de concentration plasmatique est atteint en 1 heure et se situe vers 2 mg/l. Cependant, en raison du métabolisme de 1er passage, seulement environ 50% de la dose absorbée est systémiquement disponible. La nourriture n'a aucun effet significatif sur l'ampleur de l'absorption du diclofénac, cependant il y a habituellement un retard dans le début de l'absorption de 1- 4,5 heure, et une réduction des niveaux maximums plasmatique < 20% (Blair et Plosker, 2015).

II.3.1.2. Distribution

Le volume apparent de distribution du diclofénac sodique est 2,4l /kg. Le diclofénac est fortement lié aux protéines plasmatiques (99%) principalement l'albumine.

La décroissance des concentrations du diclofénac est biphasique ; elle correspond à une phase rapide de distribution tissulaire et une phase plus lente d'élimination. Le diclofénac diffuse dans le liquide synovial ou les concentrations maximales sont mesurés 2 à 4 heures après le pic plasmatique, cependant le diclofénac passe en faible quantité dans le lait maternel (Blair et Plosker, 2015).

II.3.1.3. Métabolisme

Le diclofénac sodique, sans égard à la voie d'administration, une fois absorbé systémiquement, subit une hydroxylation simple et multiple suivie d'une o-méthylation des métabolites hydroxy, produisant les dérivés 4'-hydroxy-, 5-ydroxy--, 3'-hydroxy-, 4', 5-ihydroxy-et 3'-hydroxy-4'-methoxy diclofénac. Ces métabolites phénoliques sont pour la plupart inactifs et, avec le composé apparenté, convertis principalement en glucuronide conjugués de sulfate.

La biotransformation du diclofénac s'exerce principalement sous la médiation de l'enzyme 2C9 du cytochrome P450 dans le foie (Blair et Plosker, 2015).

II.3.1.4. Elimination

L'excrétion du diclofénac est à la fois urinaire et biliaire dans les selles. Moins de 1 % du principe actif est éliminé inchangé dans les urines. Environ 60 % de la quantité administrée est éliminée sous forme de métabolites dans les urines, le reste est éliminé dans les fèces. Plus de 90% d'une dose administrée par voie orale se retrouve dans les produits d'élimination en 72 heures.

La demi-vie d'élimination plasmatique du diclofénac inchangé se situe autour de 1 à 2 heures. La clairance plasmatique totale est d'environ 263 ml/min (Blair et Plosker, 2015).

II.3.2. Pharmacodynamie

Comme on l'a déjà expliqué, le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien doté de propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques prononcées. Son mécanisme d'action s'appuie essentiellement sur l'inhibition, expérimentalement prouvée, de la biosynthèse des prostaglandines (Vidal, 2013).

La diminution de la synthèse de prostaglandines produit les effets suivants :

- réduction des symptômes inflammatoires par la suppression partielle d'un des principaux médiateurs de l'inflammation ;
- atténuation de la douleur, les prostaglandines étant tenues pour responsables de la sensibilisation des terminaisons nerveuses aux stimuli mécaniques ou aux substances libérées dans les tissus enflammés, telles que la bradykinine ;
- soulagement de la douleur de menstruation, qui est étroitement liée à un accroissement de l'activité utérine et à des concentrations élevées en prostaglandines dans le sang menstruel ;
- abaissement de la fièvre, étant donné que les prostaglandines (dont la production est accrue par les pyrogènes leucocytaires) interviennent au niveau du centre hypothalamique de la thermorégulation (Blair et Plosker, 2015).

II.4. Toxicité du diclofénac sodique

II.4.1. Hépatotoxicité

Le diclofénac est un médicament qui ne présente aucun risque au sein de ses doses thérapeutiques, mais son utilisation peut entraîner des atteintes hépatiques sévères (Boelsterli, 2003). En effet, le diclofénac et ses métabolites très réactifs sont à l'origine d'une génération excessive de ROS, ce qui implique le phénomène de « stress oxydatif » qui peut affecter la perméabilité de la membrane mitochondriale conduisant à une hépatotoxicité. Il a été montré que les souris traitées par cet anti-inflammatoire, dévoilent une augmentation de l'expression

d'hème oxygénase 1 (Hmox1), qui est en fonction des changements de l'état redox et du déséquilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant. Ces événements conduisent à la libération des protéines pro-apoptotiques et l'éclatement de la membrane externe de la mitochondrie ce qui conduit à la lyse cellulaire (Woen, 2008).

De plus, une élévation de différentes enzymes hépatiques peut être observée au cours du traitement. Dans le cadre d'un traitement de longue durée, un contrôle régulier de la fonction hépatique est indiqué par précaution. Si les tests de la fonction hépatique restent anormaux ou se détériorent, en présence de signes ou de symptômes cliniques suggérant une affection hépatique ou en cas d'apparition d'autres phénomènes (p.ex. éosinophilie, rash, etc.), l'administration de Diclofénac doit être interrompue. Une hépatite peut survenir sans symptômes prodromiques en cas d'utilisation de diclofénac (Langlade et Bonnet, 1997).

II.4.2. Néphrotoxicité

L'utilisation de diclofénac est souvent associée à certaines toxicités, il est de plus en plus associé à une toxicité rénale (Lin *et al.*, 2008). En médecine vétérinaire, des diminutions marquées dans la population de certaines espèces de vautours ont été attribuées à l'ingestion du diclofénac, cette mortalité est due à une insuffisance rénale. La plupart des études ont attribué ce phénomène à la production excessive des ROS (Swan, 2006 ; Lin *et al.*, 2008) ce qui entraîne une accumulation de l'acide urique dans le sang, provoquant ainsi des effets délétères tels que la goutte et l'augmentation intracellulaire de ROS (Naidoo *et al.*, 2009). Compte tenu de l'importance des prostaglandines pour le maintien de l'irrigation rénale et de la notification d'une rétention liquidienne et d'un œdème après un traitement par le diclofénac ; un contrôle régulier de la fonction rénale est primordial (Bolat et Selcuk, 2013).

II.4.3. Dose toxique

Le diclofénac, est toxique à forte dose seulement, ça quand les radicaux oxydatifs vont attaquer le site hème de l'enzyme catalase.

Afin de déterminer la dose la plus toxique de diclofénac, une étude préliminaire a été réalisée sur 32 souris réparties en 4 groupes égaux en fonction de la dose administrée par voie sous-cutanée pendant 5 jours [0 (contrôle), 2,5 (faible dose), 5 (dose modérée) et 10 (dose élevée) mg/kg/j] (Vidal, 2013).

Les principaux signes cliniques comprenaient les convulsions, les spasmes saltatoires, la baisse de l'activité, la diarrhée et des signes de maladie aiguë généralisée. La dose létale 50 (DL50) prise par voie orale était supérieure à 800 mg/kg chez le chien et s'élevait à 3200 mg/kg chez le singe. On a observé chez les chiens une anorexie transitoire, de la diarrhée et des érosions duodénales. Chez les singes, on a observé de la diarrhée, de l'anorexie, des vomissements, de la salivation et des ulcères rectaux (Vidal, 2013).

Tableau I. Intervalle de différentes doses toxiques du diclofénac sodique.

Espèce	Voie d'administration	Intervalle de la DL50 (mg/kg)
Souris	Orale	185-541
	i.v.	92-147

II.5. Diclofénac et stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites spontanément, en petites quantités et de manière continue au sein de l'organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants endogènes tels que GSH, GST et CAT. Il a été démontré que le Diclofénac avait un effet cytotoxique ; induit par la production excessive des radicaux libres (ROS) par l'intermédiaire du cycle Redox ou par l'épuisement de la réserve hépatique en GSH. Cet épuisement est à l'origine de plusieurs dommages cellulaires dont la peroxydation lipidique est la plus répondeuse (Pourhmad *et al.*, 2011).

Des études récentes ont montré que les anti-inflammatoires AINS à l'état oxydé via la peroxydase peuvent jouer un rôle dans la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Karam-allah *et al.*, 2009). Cependant peu d'informations sont connues sur le mécanisme d'induction du stress oxydant par le diclofénac sodique *In vivo*. D'autres, ont montré que le diclofénac avait un pouvoir pro-oxydant du fait de l'implication du GSH dans son métabolisme, en effet le diclofénac utilise le GSH comme substrat d'où sa carence dans les tissus (Rainsford et Velo, 2012).

Chapitre III

Thapsia

garganica

III. La plante *Thapsia garganica*

III.1. Description de la plante étudiée : *Thapsia Garganica*

III.1.1. Données botaniques

III.1.1.1. Les Apiacées

La famille des Apiacées est une famille de plantes appartenant à la classe des Magnoliopsida (Dicotylédones). Elle est composée de 1400 espèces réparties en 300 genres environ, répandues sur presque tout le globe, mais surtout dans les régions tempérées de l'hémisphère boréal. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle.

Il s'agit de plantes herbacées, annuelles, bisannuelles ou vivaces, parfois arbustives. Les Apiacées contiennent des plantes alimentaires (la carotte, *Daucus carota*), des condiments (le cumin, *Cuminum cyminum*), des plantes médicinales (le khella, *Ammi visnaga* et *thapsia garganica*) ainsi que des plantes toxiques (la grande ciguë, *Conium maculatum*) (Alkhatib, 2010).

III.1.1.2. Taxonomie

Selon les classifications classiques, les Apiacées sont des dicotylédones appartenant à l'ordre des Apiales.

Nom arabe : **Bonafâa, Derias**

Nom berbère : **Toufalt**

Nom français : **Thapsia**

Tableau II. Position systématique de *T. garganica* (Hammiche et al., 2013).

Classification	
Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Thapsia</i>



Figure 8. *Thapsia garganica* (Bordj T'har, Taghrast; 2016).

III.1.1.3. Présentation et description de la plante *Thapsia garganica*

Le *Thapsia* est une herbe robuste de 1 à 2 mètres, vivace ; les parties aériennes sont glabres, les feuilles lisses, finement découpées en étroites lanières. Les ombelles jaunes atteignent 25 cm de diamètre ; elles sont nues à la base.

Le fruit de grande taille - 25 mm sur 15 mm - est un akène double dont les deux méricarpes ont les cotes secondaires, latérales, fortement dilatées en ailes membraneuses. Toute la plante renferme une résine rubéfiante, localisée dans les nombreux canaux sécréteurs (Hammiche *et al.*, 2013).

III.1.2. Distribution géographique et habitat

Thapsia garganica est présente en Algérie, en Maroc, en Tunisie et en Lybie mais aussi en Turquie, en Espagne, au Portugal, en Italie et en Grèce (Hand, 2011).

En Algérie, elle est très répandue sur les hauts plateaux de Constantine, Sétif, Média, Tlemcen (Daumas et De chancel, 1850). Elle affectionne les localités marécageuses, ou plutôt les environs de marécages, les marais en voie de dessiccation et le bord des ruisseaux, aussi les lieux rocheux, les champs et les pentes ensoleillées. Elle croit en abondance, spontanément sans aucune culture dans les conditions suivantes :

- ✓ Exposition : Plein soleil
- ✓ Humidité : Sol sec à moyen
- ✓ Sol : Léger à moyen, riche en humus
- ✓ pH : Sol acide ou calcaire (Soubeiran, 1870).

III.2. Ethnopharmacologie de *Thapsia garganica*

III.2.1. Usages médicaux

Les vertus médicinales de cette plante sont connues depuis l'antiquité : Hippocrate, le « père de la médecine grecque » a décrit les effets irritants des racines vers (400 av. J.-C.) D'autres grands botanistes et naturalistes tels le grec Théophraste (372-287 av. J.-C.) et le romain Pline l'Ancien en ont fait mention dans leurs ouvrages. Les racines et les graines de *Thapsia Garganica L.* sont depuis lors utilisées en médecine traditionnelle en Europe et dans certains pays arabes de la côte méditerranéenne : des onguents sont ainsi préparés dans le but de soulager des rhumatismes ou certains maux pulmonaires. On peut constater que l'activité irritante de la plante (celle-ci l'est particulièrement pour la peau) peut avoir des applications variées en médecine traditionnelle. (Frédéric, 2012).

La plante est utilisée pour combattre les toux et bronchites rebelles ainsi que les rhumatismes, la rage et la stérilité féminine. On l'utilise aussi, mélangé à de la farine et à du son, en cataplasmes locaux, contre les morsures d'animaux veineux ou enragés (Bammi et Douira, 2002).

III.2.2. Utilisations pharmacologiques

La seule préparation pharmaceutique à base de la plante *Thapsia garganica* est l'emplâtre de Thapsia. Que l'obtient en incorporant de la résine de thapsia à un mélange de cire blanche colophane, poix blanche, térébenthine...etc (Soubeiran, 1870).

Cet emplâtre est utilisé par application sur la peau, cette dernière s'irrite, s'échauffe, rougit, devient le siège d'une démangeaison insupportable, puis apparaît une éruption de vésicules miliaires nombreuses, très rapprochées, emplies d'une sérosité purulente (Reboulleau, 1856). Il n'y a pas de douleurs et il est convenable d'enlever cet emplâtre après 4 à 6 heures (Ellingwood, 1919).

La plante fait l'objet d'investigations dans le traitement du cancer de la prostate ; les données précliniques semblent prometteuses, une rémission dans l'évolution de la tumeur apparaît avec une toxicité minimale (Doan *et al.*, 2014).

Les chercheurs ont conçu, à partir de la thapsigargine, l'un des principes de thapsia, une pro-drogue appelée G202. La G202 est hydrolysée par une carboxypeptidase membranaire, spécifique des cellules cancéreuses prostatiques ; cette hydrolyse active la G202 qui inhibe la pompe SERCA ce qui induit la mort de ces cellules (Hammiche *et al.*, 2013).

III.3. Données phytochimiques et biologiques de *thapsia garganica*

III.3.1. Les huiles essentielles

L'étude de Ladjel *et collaborateurs* (2011) fait l'analyse par CPG/MS de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de la plante *thapsia garganica* qui a montré que l'huile essentielle se compose principalement de monoterpènes. Le constituant dominant est le p-vinylguaiacol, qui compose 59-63% de l'huile, suivie de linalool et de 1,4-diméthylazulène avec 6-8% et 6-7% respectivement. D'autres composés : limonène, géraniol, p-cymène, mycène, sabinène...etc. sont aussi présents à des petites quantités (Ladjel *et al.*, 2011).

L'huile essentielle extraite des racines contient principalement de l'élimicine (54 à 73%) et de la latifolone (20-32%) (Avato et Rosato, 2002).

III.3.2. Les sesquiterpènes lactones « la thapsigargine »

La thapsigargine, lactone sesquiterpénique de type guaïanolide d'origine naturelle, est un puissant inhibiteur des enzymes ubiquitaires SERCAs (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPases) et est actuellement en phase clinique pour le traitement du cancer de la prostate non-hormono-dépendant. La thapsigargine fait donc partie de la famille des guaïanolides 6-12 possédant un squelette tricyclique dont une gamma-lactone. Elle possède huit centres stéréogènes, quatre chaînes esters différents, deux groupements hydroxyles libres et trois carbones quaternaires. Sa configuration absolue fut établie en 1985 par Christensen et Norup (Christensen et Norup, 1985).

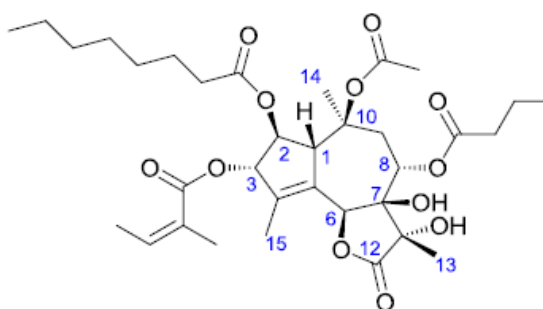


Figure 9. Structure de la thapsigargine (Christensen et Norup, 1985).

Plusieurs dérivés naturels ont été découverts provenant de la même source végétale que la thapsigargine à tel point que le mot thapsigargine désigne maintenant une famille entière de substances. Dans cette famille, il existe à ce jour 17 molécules qui diffèrent par les substituants en position C2 et C8 (Morgan, 2013).

III.3.3. Les polyphénols

Plusieurs travaux ont montré que la plante *Thapsia garganica*, écorce de la racine et les feuilles (Rached *et al.*, 2010), contiennent des polyphénols dont la classe dominante est celles des flavonoïdes et des dérivés hydroxycinamiques (Djeridane *et al.*, 2007). L'importance de ces polyphénols réside dans leurs propriétés chimiques, à savoir :

- ces composés possèdent des capacités antioxydants, ils peuvent jouer un rôle important en absorbant et en neutralisant les radicaux libres, tel que l'anion superoxyde, les radicaux d'hydroxyle, et le peroxyde d'hydrogène (Djeridane *et al.*, 2006).
- Les flavonoïdes de la partie aérienne sont capables d'inhiber l'activité d'un certain nombre des enzymes digestives comprenant la carboxylestérase (CE) (Stocker *et al.*, 2004), et l' α -amylase de mammifère, par l'inhibition de cette dernière la plante participe à l'abaissement de l'hyperglycémie (khacheba, 2008)

III.4. Toxicité

III.4.1 Parties toxiques de la plante

Toute la plante est toxique par sa résine, jaune ou légèrement rougeâtre, rubéfiante et vésicante, particulièrement abondante dans l'écorce de la racine. On y a caractérisé deux substances histamino-libératrices, des lactones sesquiterpéniques : thapsigargine et thapsigarginine ainsi que des triesters de lactones sesquiterpéniques ayant des structures inhabituelles. La thapsigargine, guaïanolide hexaoxygène, mobilise le calcium intracellulaire selon des modalités très particulières, en inhibant la Ca^{++} ATPase (SERCA) du réticulum endoplasmique.

Dans le fruit, quatre phénylpropanoïdes et un analogue de la thapsigargine ont été mis en évidence par spectroscopie ; toutes ces substances ont développé une activité cytotoxique. Le fruit contiendrait une fraction lipidique riche en acide pétroselinique qui est une matière première recherchée (Hammiche *et al.*, 2013).

III.4.2. Circonstances de l'intoxication

Il s'agit, surtout, d'intoxications animales. Elles ne sont pas rares, soit que des fruits et des feuilles soient mêlés au fourrage, soit que les troupeaux nomadisent loin de leur aire naturelle de pâturages ; ainsi, les chameaux qui confondent les jeunes pousses de *Thapsia* avec une Ombellifère saharienne, sont pris de gastro-entérite. On observe, d'abord, une importante sécrétion salivaire « thafes » puis des troubles de la vision, des désordres nerveux, des troubles digestifs suivis, dans les cas graves, de mort. La sève agit de manière corrosive sur les parois digestives.

Les intoxications humaines sont toutes dues aux utilisations traditionnelles mal maîtrisées. Au CAP d'Alger, on relève, chaque année, une à deux intoxications causées par des utilisations abusives de la racine, principalement (Hammiche *et al.*, 2013).

III.4.3. Symptomatologie

Sa toxicité est connue et seules des personnes averties la manipulent avec beaucoup de précautions pour éviter les ophtalmies et des œdèmes de la face, type œdème de Quincke. Sur la peau, l'action révulsive se manifeste d'abord par une rubéfaction violente avec forte éruption de vésicules et s'accompagne d'un œdème sous-jacent et de prurit intense qui peut aboutir à la formation de pustules. On note, parfois, de la fièvre (Hammiche *et al.*, 2013).

L'inflammation et le prurit évoluent, en 3 à 4 jours, vers un dessèchement de l'épiderme qui se desquame sans laisser de cicatrices. L'ingestion, chez l'homme, se traduit, même à faible dose, par de la diarrhée parfois des vomissements. Le même auteur rapporte, en 1991, un cas d'intoxication chez une fillette de 5 ans qui subtilise et mâchonne un fragment de racine destinée à la préparation d'un remède abortif ; elle est hospitalisée avec un érythème de la face, un œdème buccal et oculaire, une température à 40°C (Hammiche *et al.*, 2013).

Partie pratique

Chapitre I

Matériel et

Méthodes

I. Matériel végétal

Différents organes (racines et feuilles) de *Thapsia garganica* de la wilaya de Jijel (Bordj T'har, Taghrast) sont utilisés dans cette étude.

Après nettoyage à l'aide d'une brosse sèche, les racines sont coupées en petites rondelles pour subir un séchage dans l'étuve à 40°C pendant quatre jours à l'abri de l'humidité. Les racines sèches sont broyées dans un moulin à café afin d'obtenir une poudre très fine qui va servir à l'extraction des polyphénols.

La partie aérienne déjà sèche fera l'objet d'une extraction par macération.

I.1. Préparation de l'extrait éthanolique

I.1.1. A partir des racines

En pratique, pour extraire les polyphénols des racines, l'éthanol 70% à chaud est couramment utilisé (Gómez-Caravaca et al., 2006). On utilise pour cela un solvant à reflux dans extracteur de type soxhlet (Gerhardt Traditional Soxhlet System EV6All/16, Germany), 25g de la poudre des racines sont introduits dans la cartouche, qui ensuite placée dans le soxhlet, tout en l'ayant recouvert avec du coton. 200 ml du solvant d'extrait (éthanol 70%) sont introduits dans le ballon et la température est réglée à 50°C (éviter les surchauffes), puis l'extraction est lancée en 2 cycles jusqu'à l'épuisement de la matière solide.

A la fin de l'extraction l'extrait brut est d'abord filtré sur papier Whatman et le solvant est chassé à l'aide d'un Rotavapeur (Heidolph Laborota 4003 control, Germany). Après l'évaporation complète du solvant, le ballon contenant l'extrait brut est pesé et le poids de l'extrait brut est obtenu par la différence entre le poids final et le poids initial du ballon. Le résidu est repris par l'éthanol 70% puis filtré.

I.1.2. Partie aérienne

La macération la partie aérienne de *Thapsia garganica* est réalisée à la température ambiante, 31g de l'échantillon, est extrait dans un volume de 300ml d'une solution éthanol 70% pendant 24h sous agitation magnétique suivit d'une filtration.

Cette opération est répétée deux fois avec renouvellement du solvant. Les deux filtrats sont évaporés à 40°C grâce à un évaporateur rotatif (Heidolph Laborota 4003 control, Germany). Le résidu sec est repris dans l'éthanol 70%.

I.2. Extraction des polyphénols (Séparation liquide-liquide)

Pour doser les polyphénols totaux. Les extraits bruts ainsi obtenus sont soumis à plusieurs épuisements par divers solvants organiques. Cette étape permet de séparer les flavonoïdes selon leur structure et leur degré de polymérisation :

- Epuisement par l'éther de pétrole : élimine les pigments chlorophylliens, caroténoïdes et les lipides ; tous composés non phénoliques.
- Epuisement par le chloroforme : solvant préférentiel des composés simples tels que les flavonoïdes aglycones et les aglycones méthoxyles (L'éther diéthylique a été remplacé par le chloroforme, d'après leurs propriétés chimiques similaires dont la polarité est la principale).

Les épuisements sont réalisés dans des ampoules à décanter ; la phase aqueuse, contenant l'extrait, et les solvants sont agités énergiquement puis laissée décanter pendant 15 minutes, la phase aqueuse (au fond de l'ampoule) et la phase organique chargée de molécules spécifique sont récupérées séparément.

La phase éther de pétrole, ne renfermant pas de composés phénoliques, est rejetée, quant à l'autre phase, sera évaporée à 40°C dans un Rotavap (Heidolph Laborota 4003 control, Germany), les ballons sont pesés et les résidus sont repris dans l'éthanol pur. Les différents extraits obtenus sont conservés à l'abri de la lumière et à une température 4 C° jusqu'à leur utilisation (Zeghad, 2009).

La formule suivante a été utilisée pour calculer le rendement (%) après chaque épuisement :

$$\text{Rendement} = [\text{Poids de l'extrait (g)} / \text{Poids de la partie de la plante utilisé (g)}] \times 100$$

I.3. Dosage des polyphénols totaux

L'évaluation des polyphénols totaux est réalisée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton et Rossi en 1965 (Waterhouse, 2002), qui basée sur la réduction n milieu alcalin de la mixture acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 735 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénol présent dans l'extrait (Georgé et *al.*, 2005).

Brièvement, 400 μL de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75g/l) sont ajoutés à 100 μL d'extrait dilué et incubés 5min à température ambiante, puis 500 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10^{ème} dans l'eau distillé) sont ajouté. Après agitation et incubation pendant 30

minutes des mélanges, l'absorbance est lue à 735 nm grâce à un spectrophotomètre UV-Visible (UV-mini 1240, SHIMADZU, china) contre un blanc.

La quantification des polyphénols est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage en milieu alcoolique (éthanol 70%) réalisée avec l'acide gallique (6 points de concentrations de 0,25-0,00775 µg/ml) dans les mêmes conditions que l'extrait.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec d'extrait (mg EAG/100g de matière sèche) (Boizot et Chapentier, 2006).

I.4. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes des racines et de la partie aérienne de *T.garganica* est réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) décrite par Bahorun *et collaborateurs* (1996). La réaction est basée sur la formation d'un complexe entre chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones des flavonoïdes ce qui donne une coloration jaune dont l'intensité est quantifiée à 430 nm.

A 1 ml de chaque extrait (des solutions mères de concentrations de 10 mg/ml de chaque extrait éthanolique sont préparées dans le méthanol 80%) est ajouté à 1ml de la solution d' $AlCl_3$ à 2% (2g dans 100ml de méthanol absolu). Après une incubation de 10 min à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 430nm contre le blanc réactif sans extrait. (Bahorun *et al.*, 1996).

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0,039-1,25µg/ml) préparée dans un milieu alcoolique (méthanol 80%).

La quantité de flavonoïdes correspond à la moyenne de mesures sur un échantillon donné. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (mg EQ/100g de matière sèche) (Meziti, 2009).

II. Etude du pouvoir anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la plante *T.garganica in vitro*

Le DPPH ou 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle agit en tant qu'un radical libre stable efficace réduit par un antioxydant, montrant un spectre d'absorption à 517 nm avec une couleur violette, la réduction de ce radical nous donne la coloration jaune (Lee *et al.*, 2001).

Pour réaliser ce test, la cuve de mesure contient : 1.5 ml de la solution éthanolique du DPPH° (100 µM) et 15 µl de l'extrait à tester aux différentes concentrations préparées dans l'éthanol.

La mesure de la densité optique s'effectue chaque 30 secondes pendant 5 minutes à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le même test est effectué sur la vitamine C en utilisant plusieurs concentrations préparées aussi dans l'éthanol pur. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction en prenant le 100% du contrôle (DPPH° seule) selon la relation suivante :

$$\% \text{ de réduction} = [A_C - A_E / A_C] \times 100$$

Avec : A_C : Absorbance du contrôle ;

A_E : Absorbance de l'essai après 5 min ;

III. Etude des effets de *T. garganica* in vivo

➤ Entretien des animaux

L'étude a été réalisée sur 20 souris NMRI provenant de la faculté de pharmacie de l'université de Constantine, pesant environ de 31,4 g. Les animaux ont été maintenus dans la norme des conditions de ventilation ; de température (ambiante), d'humidité (60-70%) et une photopériode (12/24h). Les souris ont été logées dans des cages en acier inoxydable, dotées d'un libre accès à la nourriture et à l'eau potable.

➤ Protocole expérimental

Après une semaine d'adaptation, les animaux ont été répartis en 5 lots homogènes (n=4). Les animaux ont reçu les différents traitements par voie intrapéritonéale (IP).

Lot 1 : Contrôle (C) : Souris, recevant de l'eau physiologique en IP chaque 24h, pendant 4 jours.

Lot 2 : (PA) : ce groupe de souris reçoit, uniquement l'extrait brut de la partie aérienne de la plante *Thapsia garganica*, à la dose de 10 mg/kg chaque 24h pendant 4 jours comme traitement préventif.

Lot3 : (D) : Souris recevant un véhicule constitué de l'eau physiologique chaque 24h pendant trois jours. Le quatrième jour le diclofénac est administré à une dose de 100mg/jour par voie IP.

Lot4 : (PA+D) : Souris recevant l'extraits brut de la partie aérienne de *T.garganica* à la dose 10mg/kg diluée dans l'eau physiologique chaque 24h pendant trois jours. Le quatrième jour le diclofénac est administré à une dose de 100mg/jour associé à l'extraits brut de la partie aérienne de *T.garganica* à la dose 10mg/kg (Attoum et al., 2012).

Lot5 : Les souris reçoivent 200µl d'extrait brut racine (R) chaque 24 heures pendant 3 jour. Le quatrième jour le diclofénac est administré à une dose égale à la dose maximale tolérée (DMT) qui est de 100 mg/jour.

➤ Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques

Les animaux sont sacrifiés après anesthésie par l'éther diéthylique après 24 h de traitement par le diclofénac dont le but de prélever le foie. Les organes une fois prélevés, seront bien rincés dans l'eau physiologique puis coupés en fragments pour être congelés par la suite (-20°C) et conservés pour réaliser par la suite les dosages tissulaires (GSH, GST, CAT, MDA).

➤ Extraction de la fraction cytosolique

Pour préparer la fraction cytosolique, nous avons suivi la méthode décrite par Iqbal et collaborateurs (2003). Pour cela, 1 g de foie (0,5 g du rein) sont coupés et homogénéisés avec 3ml du tampon phosphate KH_2PO_4 (0.1M, pH = 7.4) contenant du KCl à 1.17% à l'aide du broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15 min à 4°C pour séparer les débris nucléaires et le surnageant récupéré est centrifugé encore une fois à 9600 rpm pendant 30 min à 4°C. C'est le surnageant final ainsi obtenu qui va servir à l'évaluation de l'activité des enzymes antioxydantes (Iqbal et *al.*, 2003).

III.1. Dosage du glutathion (GSH)

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la plus utilisée (Ellman, 1959).

Les thiols (-SH) réagissent avec la molécule de DTNB, par rupture de pont disulfure pour donner le 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB^-), qui s'ionise au TNB^{2-} dans l'eau à pH neutre et alcalin. Cet ion de TNB^{2-} a une couleur jaune.

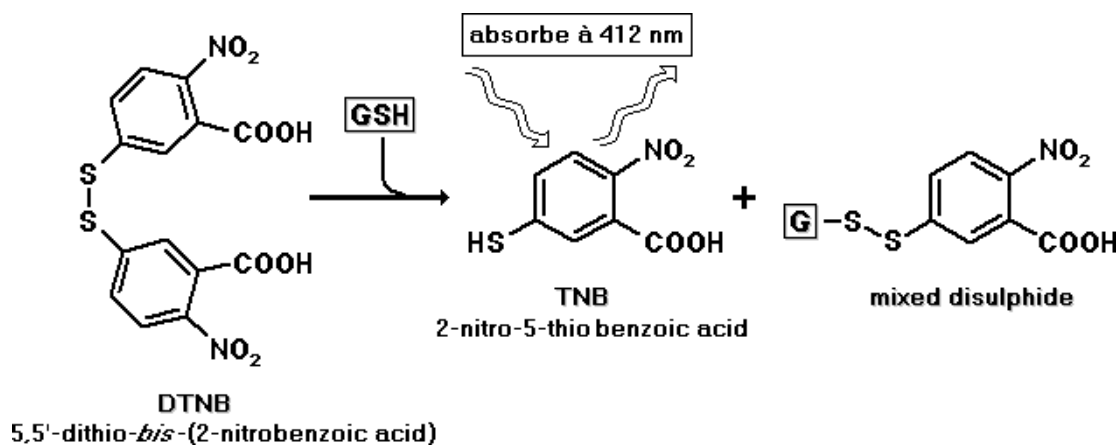


Figure 10. Réaction d'Ellman.

Le dosage consiste en l'adjonction de 50 μl de surnageant, dilués dans 10 ml de tampon phosphate (Na_2HPO_4 , 0,1 M ; pH = 8). À 3 ml de ce mélange, 20 μl de DTNB (0,01 M) sont additionnés ; une couleur jaune se développe après 15 min d'incubation. La lecture de la densité

optique est effectuée à 412 nm (JENWAY 7315 Spectrophotometer), contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le tampon phosphate.

Les concentrations sont exprimées en millimoles de glutathion/gramme de tissu (foie et rein). Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

III.2. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)

L'activité enzymatique de la GST est déterminée selon la méthode de Habig et collaborateurs (1974). Elle est étudiée en cinétique. Le substrat utilisé est le chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB) préparé dans le méthanol absolu (100%). L'enzyme permet le transfert du glutathion riche en électron ($\text{GSH} = \text{GS}^- + \text{H}^+$) sur le CDNB chargé positivement par gain d'un proton (attaque électrophile). La mesure de l'activité enzymatique est effectuée au spectrophotomètre à 340 nm et à 25°C (Habig *et al.*, 1974).

Dans la cuve de mesure, on introduit 1.7 ml du tampon phosphate (KH_2PO_4 , 0.1M, pH= 6.5), 100µl de CDNB (20 mM). Après 10 min d'incubation à 37°C, on a ajouté 100µl du glutathion (20 mM) et la réaction est déclenchée par l'addition de 100µl de cytosol dilué au 1/100^{ème} au temps zéro. L'augmentation de l'absorbance à 340 nm est enregistrée pendant 5 minutes avec une minute d'intervalle contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le tampon phosphate.

L'activité spécifique est définie comme étant l'unité d'activité enzymatique par mg de protéines mesurées par la méthode de Bradford. Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme catalysant la formation de 1 µmol de complexe par minute [constante d'extinction molaire du complexe formé $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$] (Habig *et al.*, 1974). L'activité spécifique de la GST (µmol/min/mg de protéines) est calculée par la relation suivante :

$$\text{GST activité (}\mu\text{mol/min/mg de protéines)} = \left(\frac{\Delta \text{Absb340}}{\text{min test}} \times V_t \right) \times \frac{1}{9,6} \times \frac{1}{F} / [\text{Protéines}]$$

Sachant que : $\Delta \text{Absb340/min test}$: différence de l'absorbance ;

V_t : volume total de la cuve (ml) ;

V_{ez} : volume de la fraction cytosolique ajouté (ml) ;

F : facteur de dilution ;

[Protéines] : concentration des protéines (mg/ml).

III.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique

L'activité de la catalase cytosolique a été mesurée selon la méthode de Claiborne (1985) par la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution d' H_2O_2 après addition de la source enzymatique dans la fraction cytosolique, mesurée à 240 nm pendant 1 min à 25°C. Cette diminution étant due à la dismutation du peroxyde d'hydrogène par la catalase (Claiborne, 1985).

Dans un volume final de 1,975 ml contenant 1ml du tampon phosphate (KH_2PO_4 , 0.1M, pH7.2), 0.95ml de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 0.019M) et 0.025 ml de la fraction cytosolique, on mesure l'absorbance à 240 nm chaque 30 secondes pendant une minute. Le blanc est préparé dans les mêmes conditions sans source enzymatique.

L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en UI/min/mg de protéines :

$$\text{Activité spécifique de la Catalase} = 2.303/T \times \log DO_0 / DO_t$$

Les résultats sont exprimés en unité UI/mg de protéines totales.

Avec : T= Durée de la mesure (min) ;

DO_0 = Densité optique à l'instant t_0 ;

DO_t = Densité optique à l'instant t ;

III.4. Dosage du Malondialdéhyde cytosolique (MDA)

Le Malondialdéhyde est l'un des produits terminaux formés lors de la peroxydation lipidique .mais il existe d'autres entités radicalaires, qui peuvent également se former au cours de la peroxydation lipidique. Ces entités sont connues sous le nom TBARS (Thio Barbituric Acid Reactive substances). Le test de TBARS est le plus couramment utilisé pour déterminer indirectement la peroxydation lipidique, en mesurant le taux du MDA (Ohkawa *et al.*, 1979).

Le MDA est mesuré en utilisant la réaction de deux molécules d'acide Thiobarbiturique avec une molécule d'MDA à chaud en milieu acide pour former un adduit de couleur rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

A 0,5 ml TCA 20% et 1ml du TBA 0,67% (0,67% dans le NaOH 2N) sont ajoutés 0,5 ml de la fraction cytosolique. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, il est ensuite refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol et centrifugé à 3000 rpm pendant 15 minutes. La densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm.

Le taux de MDA est obtenu en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du complexe MDA -TBA : $1,56.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Buege et Aust, 1978). Il est exprimé en mM de MDA libéré par g de tissu.

III.5. Dosage des protéines totales

Les protéines totales sont dosées par la méthode du Bradford (1976). Cette méthode est basée sur le changement de coloration du réactif du Bradford, bleu brillant de coomassie, qui développée en présence des protéines une coloration bleu quantifiable à 595 nm. Et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des protéines présentes dans l'échantillon (Bradford, 1976).

La fraction cytosolique est au préalable au $1/5^{\text{ème}}$ dans l'eau distillée. 100 μl d'échantillon dilués sont ensuite ajoutés à 4 ml du réactif de Bradford (BBC). Après agitation la réaction se produit à T° ambiante pendant cinq minutes puis l'absorbance est lue à 595 nm.

Les résultats sont déterminés à partir d'une droite d'étalonnage de protéines standards obtenus avec l'albumine sérique bovine (BSA) [0,062-2 mg/ml] et sont exprimés en mg/ml.

➤ **Evaluation statistique**

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et d'écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test de Student (T). La valeur trouvée par le calcul de T peut affirmer que les populations sont différentes par rapport au témoin négatif avec un risque d'erreur « p » tel que :

- $P > 0.05$ (ns) : la différence n'est pas significative.
- $0.05 > P > 0.01$ (*) : la différence est significative.
- $P < 0.01$ (**) : la différence est hautement significative.
- $P < 0.001$ (***) : la différence est très hautement significative.

Le calcul statistique est réalisé par : EXCEL 7.0 (microsoft, USA).

Chapitre II

Résultats et

discussion

I. Etude phytochimique

I.1. Préparation des extraits à partir des racines (R) et de la partie aérienne (PA) de la plante *Thapsia garganica*

L'extraction des polyphénols à partir des racines et de la partie aérienne de la plante a été effectuée en deux étapes : la première étape est une extraction par un mélange hydroalcoolique éthanol/Eau (70%) pour obtenir initialement l'extrait brut, et la deuxième étape de fractionnement, consistant en une série d'épuisement, fut réalisée par l'utilisation de solvants à polarité croissante (Éther de pétrole, chloroforme). Le rendement de l'extraction et de chaque épuisement est représenté dans le tableau suivant :

Tableau III. Rendement d'extraction de diverses fractions extraites à partir des racines et de la partie aérienne de la plante *Thapsia garganica*.

Extrait	Rendement (%)	
	Partie aérienne	Racine
Brut	37,09	9,84
Extrait Chloroformique	29,35	/

Partie aérienne : Le rendement le plus élevé est représenté par l'extrait brut (37,09%) suivi par l'extrait chloroformique (EC) (29,35%).

Racines : Par rapport au brut de la partie aérienne, on remarque que le rendement des racines est plus faible (9,84%).

D'un point de vue qualitatif, les données expérimentales comparées aux données de la littérature, laissent penser que l'extrait brut renferme les polyphénols totaux, tandis que l'extrait chloroformique est riche en flavonoïdes aglycones. (Kebieche *et al.*, 2011).

Le rendement d'extraction de la partie aérienne était de 37,09 % soit une perte de 62,91% de matière. A la fin des affrontements, le rendement était de 29,35% pour l'extrait chloroformique soit une perte de 20,87% de matière. Ceci s'expliquerait par le nombre assez élevé de lavages effectués dans le protocole d'extraction, et qui pourrait conduire à des pertes substantielles de matière d'où les inconvénients de la méthode d'affrontement par les solvants (Kebieche *et al.*, 2011 ; Meziti, 2009).

Il faut noter que cette étude a été réalisée uniquement sur les feuilles de cette plante qui d'après des études antérieures est plus riche en polyphénols (Alyane *et al.*, 2012).

D'autre part, la macération est une méthode d'extraction discontinue que le solvant devait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée, ainsi il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement est relatif à la méthode et aux conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. En outre, les conditions dans lesquelles la méthode d'extraction est réalisée affectent le contenu total en polyphénols et en flavonoïdes et par conséquent la capacité antioxydante, ce qui rend parfois difficile la comparaison de nos données avec ceux de la littérature (Kechkar, 2008).

II.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Après extraction et dosage, les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes dans les différentes phases étudiées, sont représentées dans le tableau IV.

Tableau IV. Evaluation quantitatives des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits racines et partie aérienne de T.garganica.

Extrait	Polyphénols (mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait)		Flavonoïdes (mg équivalent du quercétine/g d'extrait)	
	Partie aérienne	Racine	Partie aérienne	Racine
Brut	171,68	142,03	156,57	57,46
Chloroformique	105, 23	/	118,05	/

Partie aérienne : Les données expérimentales montrent que la richesse en composés phénoliques de la partie aérienne et des racines est équivalente.

L'analyse des données portant sur la PA, révèle d'une part la richesse en composés phénoliques, et d'après les différents affrontements on a pu constater que l'extrait éthanolique brut contient la meilleure teneur en polyphénols avec une concentration de 171,68 mg EAG/g d'extrait, suivie de l'EC avec 105, 23 mg EAG/g d'extrait (Tableau IV).

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et l'acide gallique comme référence montre une bonne reproductivité, l'absorbance est étroitement corrélée avec la concentration de l'acide gallique avec un coefficient de corrélation de la gamme étalon $R^2 = 0,99$.

Le dosage des flavonoïdes par la méthode utilisant l' $AlCl_3$ comme réactif et la quercétine comme standard montre une bonne corrélation entre l'absorbance et les concentrations de la quercétine $R^2 = 0,99$. L'extrait éthanolique brut présente la meilleur teneur en flavonoïdes avec une concentration de 156,57 mg EQ/g Extrait, puis l'EC avec 118,05 mg EQ/g Extrait (Tableau IV).

Partie Racine : on note que la partie aérienne de la plante est plus riche en flavonoïdes que les racines. Par exemple l'extrait brut de la PA est 2,27 fois plus riche en flavonoïdes que le même extrait obtenu à partir des racines.

Le dosage des polyphénols par la méthode de *Folin-Ciocalteu* au niveau des différentes phases obtenues à partir des racines et de la partie aérienne, montre que c'est cette dernière qui est plus riche en polyphénols que les racines, résultats attendus étant donné que les polyphénols sont responsables de la coloration des plantes (Bruneton, 1999). De plus, des travaux menés sur d'autres plantes corroborent ce résultat (Alkhatib, 2010 ; Aliakbarlu et Tajik, 2012).

La quantification des flavonoïdes par la méthode de Trichlorure d'aluminium (Baharun et al., 1996) a permis de mettre en évidence une corrélation linéaire significative ($r^2=0.99$, $p<0.05$) entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques, résultats logiques vu que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols (Meziti, 2009). Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie (Stocker *et al.*, 2004 ; Djeridane *et al.*, 2006 ; Rached *et al.*, 2010), où nous notons une grande différence entre les données, ceci semble être lié aux propriétés génétiques de la plante ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage, de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées.

II. Etude du pouvoir anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la plante

T.garganica in vitro

Les profils d'activité anti-radicalaires obtenus révèlent que les extraits des racines et de la partie aérienne de *Thapsia garganica* possède une activité anti-radicalaire concentration dépendante (Figure 13, 14, 15). A des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé ; l'acide ascorbique (Vitamine C).

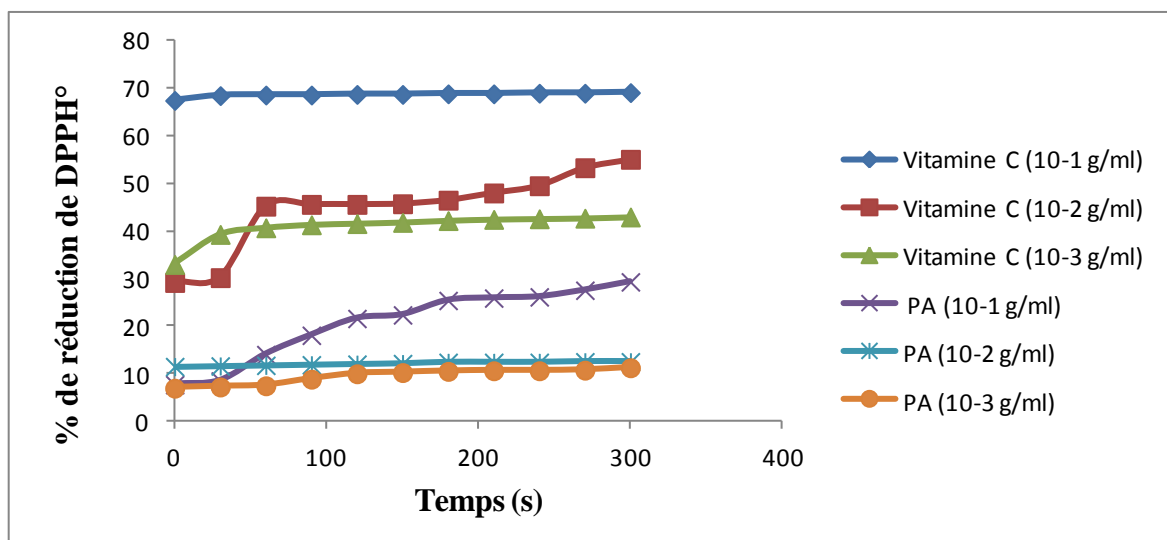


Figure 11. Effet scavenger de l'extrait partie aérienne de *Thapsia garganica* à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.

Nous constatons que la vitamine C présente comme attendu la meilleure réduction du DPPH° avec un taux de réduction de 42,91% pour la concentration 10⁻³ g/ml.

La figure 11 montre qu'avec une forte concentration de l'extrait PA (10⁻¹ g/ml) on observe un meilleur piégeage de radicaux libres, ceci dit l'effet scavenger est concentration dépendante.

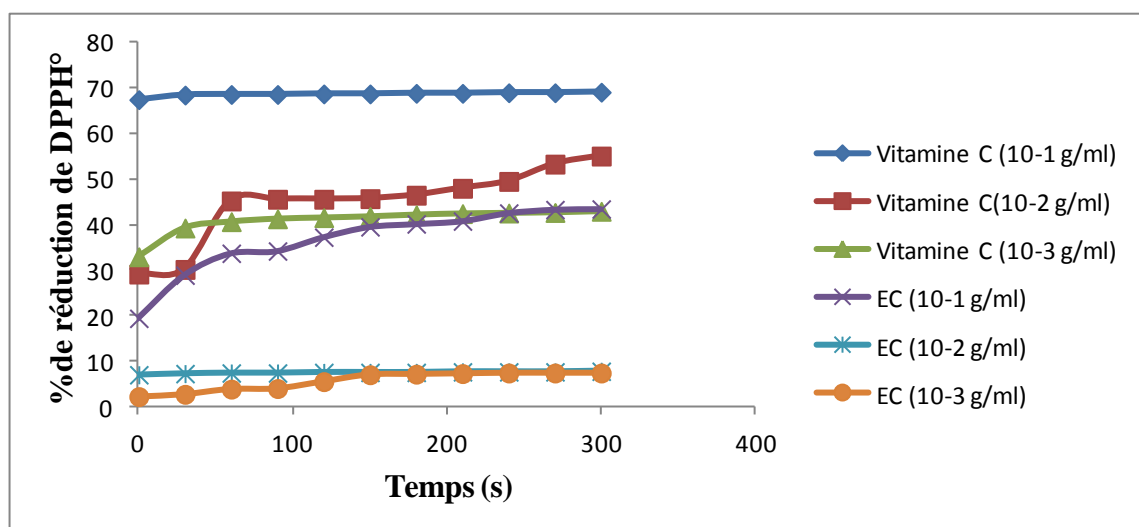


Figure 12. Effet scavenger de l'extrait chloroformique de *Thapsia garganica* à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.

Comme préalablement expliqué, la vitamine C présente le meilleur effet anti-radicalaire, ceci est valable pour la concentration 10⁻³ g/ml. Concernant l'EC, on a un meilleur piégeage des radicaux libres avec la concentration 10⁻¹ g/ml vis-à-vis des autres concentrations (10⁻² et 10⁻³ g/ml). Ceci démontre que l'effet scavenger est concentration dépendante.

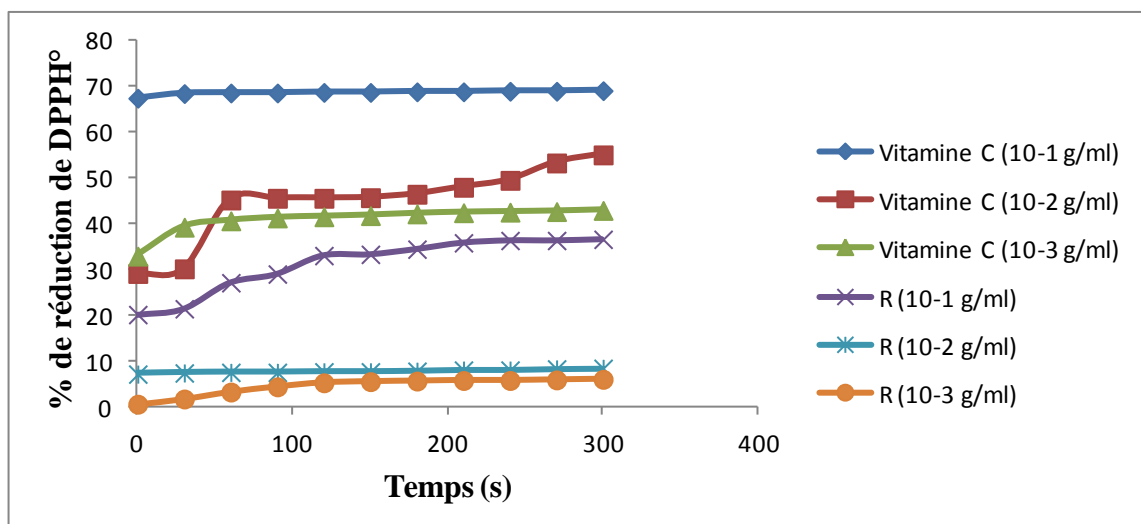


Figure 13. Effet scavenger de l'extrait racine de *Thapsia garganica* à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.

Comme les courbes l'ont montré, le meilleur effet anti-radicalaire est représenté par la vitamine C qui est considérée comme référence. Concernant nos extraits racines on remarque une meilleure réduction du DPPH° pour la concentration 10^{-1} g/ml vis-à-vis des autres concentrations (10^{-2} et 10^{-3} g/ml). Cela avère que l'effet scavenger est concentration dépendant.

Cependant, comparées à la vitamine C, les extraits étudiés s'avèrent moins actifs. Par contre, en comparant les extraits entre eux, on remarque que c'est l'extrait chloroforme qui semble être le plus actif ; ceci est dû probablement à la richesse de cet extrait en flavonoïdes aglycones.

Comme l'ont montré un grand nombre de travaux réalisés sur l'activité anti-radicalaire des extraits de plantes (Djeridane et al., 2006; Stankovic et al., 2010 ; Jun et al., 2011), les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les ROS. Cette propriété des flavonoïdes est attribuée à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres (R°) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyles (Alyane et al., 2012).

Les résultats obtenus sur l'effet scavenger de la partie aérienne (PA) ont montré que ces extraits présentent un effet piègeur à forte concentration seulement (10^{-1} g/ml), d'où un faible effet antioxydant comparé aux effets observés chez la même plante récoltée pendant la saison de fleuraison, comprenant les feuilles et les fleurs qui sont riches en polyphénols (Chibani et al., 2014). Ce qui explique que notre extrait est pauvre en ces composés ; antioxydant naturels.

III. Etude de l'activité antioxydante de la plante *T.garganica in vivo*

L'étude *in vivo* de l'effet protecteur des extraits de la plante sur les souris fut réalisée en utilisant l'extrait brut de la partie aérienne et celui des racines.

L'injection d'une dose DMT (100 mg/jour) du diclofénac par voie Intrapéritonéale en raison d'induire une atteinte hépatique après 24h du début du traitement. Ceci est peut-être en rapport avec l'accumulation du diclofénac au niveau hépatique de manière préférentielle (Islas-Flores *et al.*, 2013).

Nous avons révélé une mortalité dans le lot traité par la partie racine à j-2 et j-1 du prétraitement par l'extrait racine, soit 50% du lot R+D.

III.1. Variation des concentrations hépatique en glutathion (GSH)

La figure 14 représente les résultats de l'effet des extraits bruts (partie aérienne et racine) sur le taux du GSH.

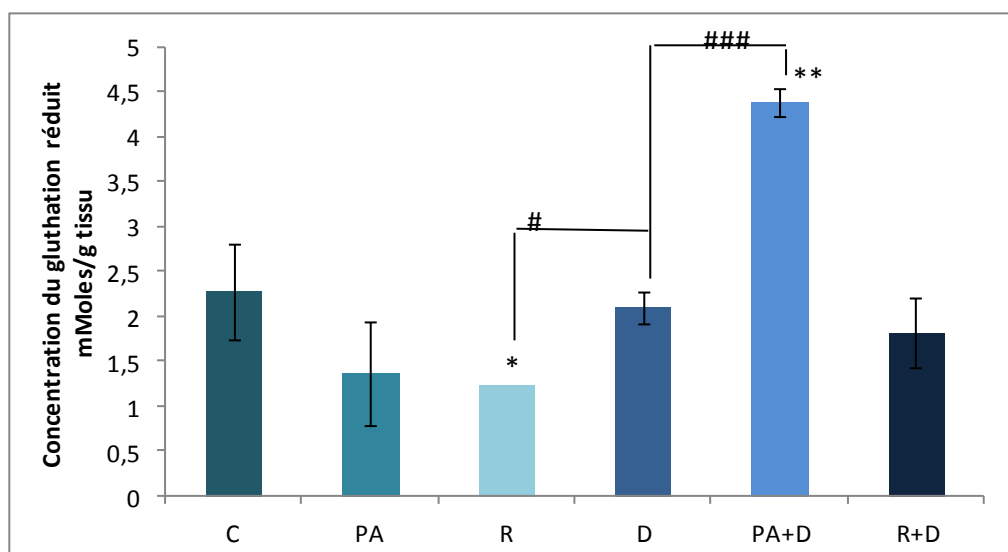


Figure 14. Variation du taux cytosolique de GSH hépatique :

(* : Significative relatif au témoin, ** : très significative, *** : hautement significative
: significative relatif au diclofénac, ## : très significative, ### : hautement significative)

La concentration hépatique en GSH a diminué de manière significative ($p < 0,05$) chez les animaux traités par l'extrait racine ($1,227 \pm 0$ mMoles/g de tissu), ceci par comparaison avec le lot contrôle ($2,276 \pm 0,534$ mMoles/g de tissu).

Concernant les souris ayant reçu les extraits seuls (PA), on note une déplétion de la concentration du GSH ($1,743 \pm 0,266$ mMoles/g de tissu).

Nous n'avons pas observé de différence significative dans la réserve de GSH chez les différents traitements sauf pour le lot PA+D qui présente une augmentation significative ($p < 0,01$)

du taux de GSH au niveau hépatique ($4,393 \pm 0,156$ mMoles/g de tissu), par rapport au lot contrôle. et au lot traité par le diclofénac ($p < 0,001$) à une dose thérapeutique de 100 mg/j. Cette augmentation de la réserve en GSH est peut être due à un effet antioxydant du traitement combiné de type synergique. Ceci a été témoigné dans l'étude de Aouacheri et collaborateurs (2009) où le traitement par le diclofénac a exercé un effet protecteur contre la toxicité hépatique du paracétamol chez le rat (Aouacheri et al., 2009).

D'autre part, une des voies du métabolisme du diclofénac est la voie des quinoneimine et du 5'-OH-Diclofénac dépendante du cytochrome P-450 dont le métabolite réactif peut être détoxifié par la formation d'un conjugué lié au glutathion (5-OH glutathionyl-Diclofénac) montré dans la figure 15, ce qui explique une augmentation du taux de GSH sous l'induction de la glutathion réductase en vue de son utilisation lors du métabolisme du diclofénac (Rainsford et Velo, 2012).

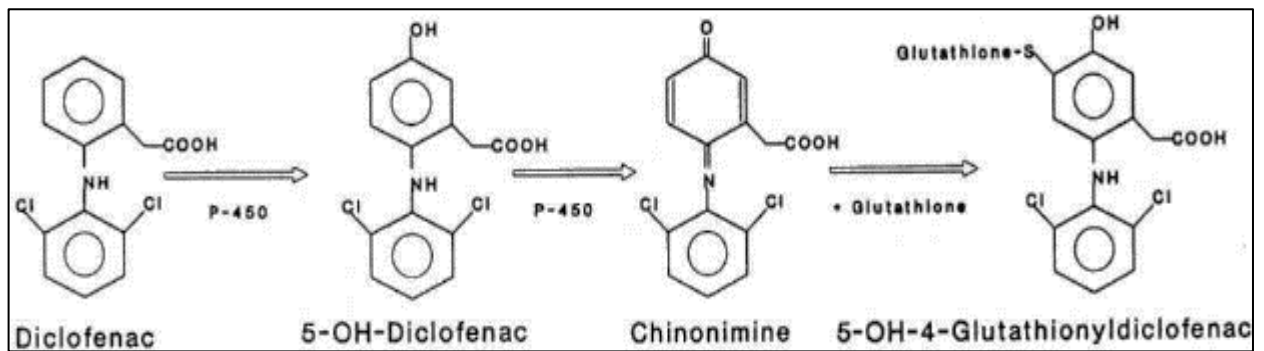


Figure 15. Une voie possible de métabolisation du diclofenac en un métabolite réactif : une quinoneimine de 5-OH-diclofénac. La formation de 5-OH-diclofénac et la métabolisation en son dérivé réactif sont quinoneimine P-450 dépendantes. Le métabolite réactif peut être détoxifié par la formation d'un conjugué de glutathion (5-OH-glutathionyle diclofénac) (Rainsford et Velo, 2012).

III.2. Activité de la glutathion-S-transférase (GST)

La figure 16 représente les résultats de l'effet des extraits bruts (partie aérienne et racine) sur l'activité enzymatique de la GST exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines

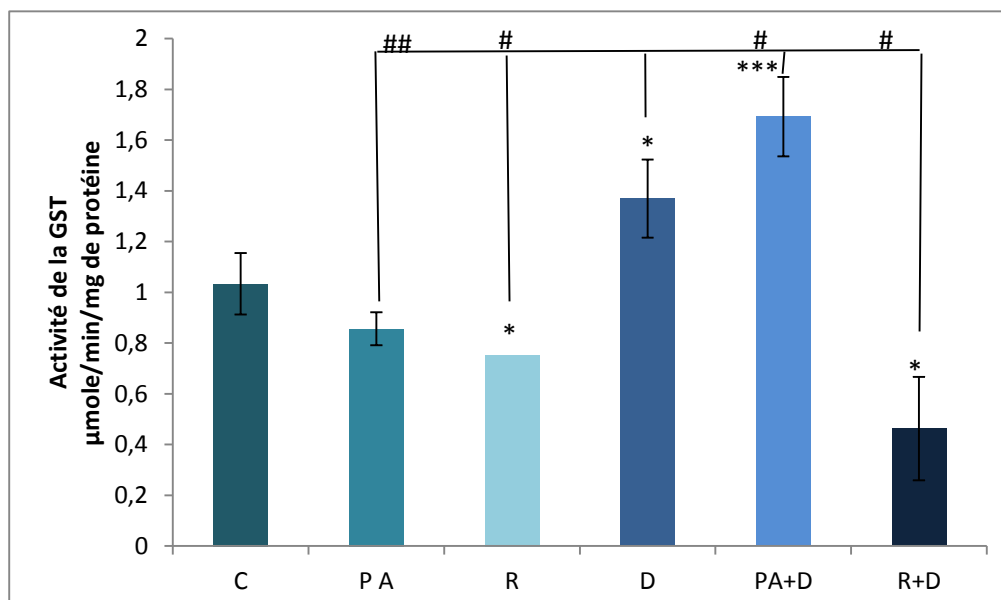


Figure 16. Variation de l'activités enzymatique de la GST hépatique : (* : significative relatif au témoin, ** : très significative, *** : hautement significative, # : significative relatif au diclofénac, ## : très significative, ### : hautement significative).

L'activité enzymatique de la GST hépatique montre une augmentation significative ($p < 0.05$) chez les souris ayant reçu le diclofénac seul ($1,369 \pm 0,154 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) chez les souris recevant le diclofénac associé à la plante (PA+D) ($1,692 \pm 0,156 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) et une diminution très significative ($p < 0.01$) chez les souris co-traitées par la plante D+R ($0,463 \pm 0,203 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines); et cela par comparaison avec le lot contrôle ($0,977 \pm 0,059 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines). De même que pour les souris recevant l'extrait de racine seul ($p < 0.05$) ($0,753 \pm 0 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) en comparaison avec le groupe contrôle.

Le traitement par le diclofénac induit une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité de la GST hépatique ce qui est observé aussi pour le lot PA+D ($p < 0,001$). Cette augmentation est en réponse à l'augmentation du taux de GSH vu que ce dernier est un substrat de la GST.

Nous avons observé une diminution significative ($p < 0,05$) de la GST chez les lots traités par partie racine seule ($p < 0,05$) ou en association avec le diclofénac ($p < 0,05$). Cette diminution est en relation avec l'effet pro-oxydant de cette partie de la plante (Li et Hu, 2015).

Foufelle et Fromenty (2016) ont isolé la thapsigargine ; sesquiterpene lactone, qui est le composé majoritaire de la racine de la plante TG (Foufelle et Fromenty, 2016) et la toxicité de cette molécule a

largement été étudiée dont l'effet pro-apoptotique chez les mammifères (Dubois *et al.*, 2013) et anticancéreux (Christensen *et al.*, 2009).

De plus, Li et Hu (2015) ont montré que la thapsigargine induisait la production des ROS chez la cellule neuronale exerçant ainsi son effet apoptotique (Li et Hu, 2015).

III.3. Variation de l'activité de la catalase hépatique et rénale (CAT)

La figure 17 représente les résultats de l'effet des extraits bruts (partie aérienne et racine) sur l'activité enzymatique de la CAT.

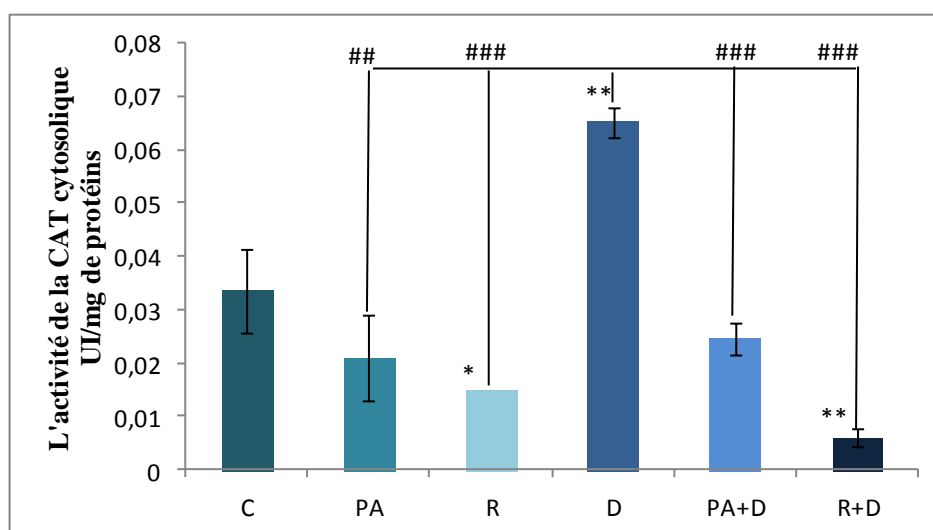


Figure 17. Variation de l'activité enzymatique de la catalase hépatique : (* : significative relatif au témoin, ** : très significative, *** : hautement significative, # : significative relatif au diclofénac, ## : très significative, ### : hautement significative).

L'activité enzymatique de la CAT hépatique montre une augmentation très significative ($p < 0.01$) concernant les souris traitées par le Diclofénac ($0,065 \pm 0,002$ UI/mg de protéines), par rapport au contrôle ($0,033 \pm 0,007$ UI/mg de protéines). Cette augmentation est probablement en réponse à la génération de ROS. En effet, Saucedo-Vence et *collaborateur*, (2015) ont suggéré que l'augmentation de l'activité de ce biomarqueur peut être due à un mécanisme de défense des cellules afin de compenser le stress oxydatif induit par l'augmentation de H_2O_2 (Saucedo-Vence *et al.*, 2015).

En outre, nous avons relevé une diminution très significative ($p < 0.01$) de l'activité enzymatique chez les souris ayant subi un co-traitement (R+D) ($0,006 \pm 0,001$ UI/mg de protéines) et significative ($p < 0.05$) concernant les souris traitées par l'extrait racine ($0,014 \pm 0$ UI/mg de protéines) vis-à-vis du lot témoin. Cette diminution est due à l'action de la thapsigargine dont l'effet pro-apoptotique est dû à la production accrue de ROS (Li et Hu, 2015), d'où les dommages

observés sur la diminution de l'activité de la CAT qui est en relation avec l'attaque des ROS sur les protéines enzymatiques.

III.4. Variation des concentrations en malonyldialdéhyde (MDA)

La figure 18 représente les résultats de l'effet des extraits bruts (partie aérienne et racine) sur l'activité enzymatique de le MDA :

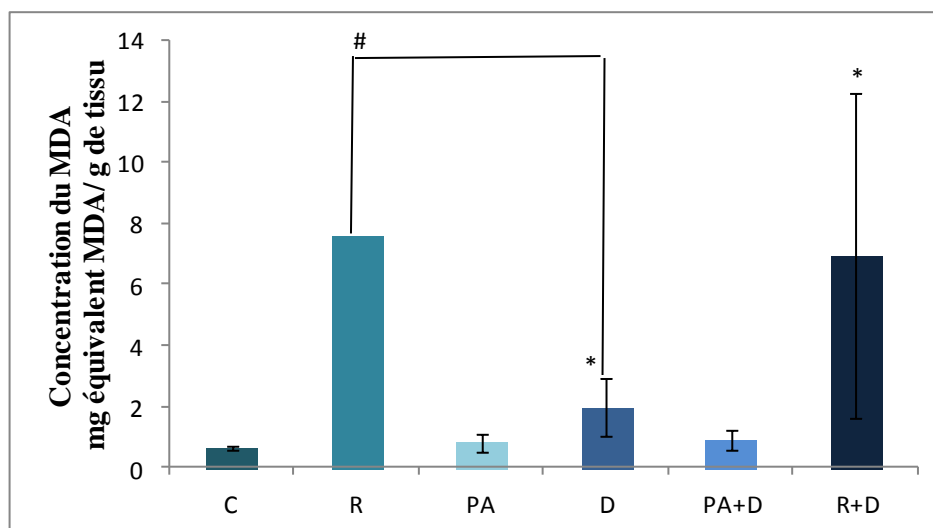


Figure 18. Variation du taux cytosolique du MDA hépatique:
 (* : significative relatif au témoin, ** : très significative, *** : hautement significative, # : significative relatif au diclofénac, ## : très significative, ### : hautement significative).

On remarque, une augmentation significative ($p < 0.05$) de la concentration hépatique en MDA cytosolique chez les souris recevant uniquement le diclofénac ($1,967 \pm 0,939 \mu\text{M/g}$ de tissu), pareillement pour le lot (R+D) ($6,935 \pm 5,355 \mu\text{M/g}$ de tissu). Ceci par comparaison avec le lot contrôle ($0,646 \pm 0,076 \mu\text{M/g}$ de tissu). Cette augmentation peut s'expliquer par l'effet pro-oxydant du diclofénac et de la thapsigargine respectivement (Li et Hu, 2015). De nombreux auteurs ont mis en évidence une augmentation de MDA après traitement par le diclofénac (Hickey *et al.*, 2015 ; El-Maddawy et El-Ashmawy, 2013).

D'autre part, le mécanisme d'hépatotoxicité induit par le diclofénac a dévoilé des dommages cellulaires sévères, ce qui implique l'action des radicaux libres sur le niveau cellulaire : lipides. En effet, le malondialdéhyde, produit final de la peroxydation lipidique est l'un des marqueurs les plus remarquables lors d'un stress oxydant (El-Maddawy et El-Ashmawy, 2013).

Néanmoins, nos résultats montrent que notre extrait de la partie aérienne après 4 jours d'administration a protégé les lipides cellulaires contre la peroxydation induite par le traitement au diclofénac seul dans le tissu hépatique, par rapport aux souris témoins.

Conclusion

L'étude *in vitro* a montré que l'extrait chloroformique présentait un meilleur effet anti-radicalaire que l'extrait brut, ceci revient à sa richesse en flavonoïdes aglycones. Par ailleurs les résultats obtenus dans l'étude *in vivo* montrent que l'utilisation d'une dose maximale tolérée du Diclofénac sodique à court terme a induit une toxicité hépatique chez la souris ainsi qu'une induction des défenses antioxydantes qui se traduit par une augmentation significative de l'activité enzymatique de la CAT et de la GST. Par ailleurs, l'administration de l'extrait éthanolique de *T.garganica* n'a pas vraiment agi de manière significative sur les systèmes enzymatiques de détoxification des cellules hépatiques. Ce qui revient à la composition chimique des extraits. En effet, l'étude phytochimique des différents extraits de la plante a révélé une pauvreté de la partie aérienne et encore moins celle des racines en polyphénols, en raison de la saison de récolte de la plante qui n'a pas atteint sa floraison.

Il est bien clair que ces résultats ont ouvert un large terrain d'investigations et beaucoup de perspectives cliniques sur l'utilisation des extraits de la plante dans diffères thérapies, parmi ces perspectives :

➤ L'évaluation des systèmes antioxydants enzymatiques (CAT/GST) et non enzymatiques (GSH) a montré le degré de participation du stress oxydatif dans la toxicité provoquée par le traitement au diclofénac. L'évaluation des autres paramètres de stress oxydant est obligatoire pour confirmer ces résultats.

➤ L'extrait racine de *Thapsia* a altéré les défenses antioxydantes, en exerçant un effet prooxydant. De ce fait cet extrait peut être utilisé après des études similaires comme pro-apoptotique dans le traitement des cancers.

➤ Les métabolites réactifs du diclofénac montrent une toxicité au niveau hépatique, cela exige des études *in vivo* plus approfondies et complémentaires afin d'obtenir des résultats complémentaires au sujet de cette toxicité.

Références bibliographiques

A

About-Ela H.M., Saad A.A., El-Sikaily A.M.A. & Zaghloul T.I. Oxidative stress and DNA damage in relation to transition metals overload in Abu-Qir Bay, Egypt. *Genet Eng Biotechn* (2011); **9 (1)**: 51-58.

Aliakbarlu J. & Tajik H. Antioxidant and antibacterial activities of various extracts of *Borago officinalis* flowers. *Journal of food processing and preservation* (2012); **36(6)**: 539–544.

Alkhatib R. Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss (Apiacées). Mémoire de Doctorat Sciences du médicament. *Chimie*. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français.

Alyane M, Fenek H, Bouredjoul S. & Boukriche F.Z. Activité antioxydante de l'extrait brute de la plante *Thapsia garganica* d'Algérie contre le stress rénal et cardiaque induit par la doxorubicine. Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences, Université de Jijel. Séminaire international : Cancer, stress cellulaire et substances bioactives. Jijel, (2012).

Attoum F., Chabounia F. & Lahouel. Etude phytochimique et evaluation de l'activité antioxydante et antiinflammatoire des extraits de la plante *thapsia garganica in vivo* chez le rat. *Pharmacologie expérimentale, université de jijel*, (2012) : 30.

Aouacheri W., Saka S., Djafer R. & Lefranc G. Effet protecteur du diclofénac contre le stress oxydatif induit par la toxicité du paracétamol chez le rat. *Ann Biol Clin* (2009); **67 (6)**: 619-627.

Avato P. & Rosito I. Essential Oils from the Roots of *Thapsia garganica* L. *Journal of Essential Oil Research* (2002); **14 (1)**: 20-22.

B

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Vasseur J., Luyckx M., Gazin M., Gazin J.C. & Pinkas M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittelforschung* (1996); **46(11)**: 1086-1089.

Bammi J. & Douira A. LES PLANTES MEDICINALES DANS LA FORET DE L'ACHACH (PLATEAU CENTRAL, MAROC). *Acta Botanica Malacitana* (2002); **27**: 131-145.

Blair H.A. & Plosker G.L. Diclofenac sodium injection (akis®), dicloin (®): a review of its use in the management of pain. *Clin Drug Investig* (2015); **35(6)**: 397-404.

- Boelsterli A. Diclofenac- induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology and Applied pharmacology* (2003); **192**: 307-322.
- Boizot N. & Charpentier J.P. Méthodes rapides d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des techniques de l'INRA* (2006): 79-82.
- Bolat D. & Selcuk M.L. Stereological and biochemical evaluation of diclofenac-induced acute nephrotoxicity in rats. *Revue Méd Vét* (2013); **164 (6)**: 290-294.
- Bradford M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Anal Biochem* (1976); **72**: 248-254.
- Bragança I., Placido A., Paiga P., Domingues V.F. & Delerue-Matos C. QuEChERS: a new sample preparation approach for determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Science of the Total Environment* (2012); **433**: 281-289.
- Brune K. & Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res* (2015); **8**: 105-118.
- Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème édition, *Tec & Doc Lavoisier*, Paris (1999): 310-353.
- Buege J.A. & Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation In Biomembrane (Part C : biological oxidation). Methods in Enzymology, Fleisher S.F and Packer L (Eds). *London Academic Press* (1978); **52**: 302-309.

C

- Chibani S., Al-Dabbas M., Abuhamdah S., Aburjai T., Bencheraiet R., Kabouche A., Jay M. & Kabouche Z. Flavonoids and Antioxidant Activity of *Thapsia garganica* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds* (2014); **50(2)**: 357-359.
- Christensen S.B. & Norup E. Absolute configurations of the histamine liberating sesquiterpene lactones thapsigargin and trilobolide. *Tetrahedron Letters* (1985); **26 (1)**: 107-110.
- Christensen S.B., Skytte D.M., Denmeade S.R., Dionne C., Møller J.V., Nissen P. & Isaacs JT. A trojan horse in drug development: targeting of thapsigargin towards prostate cancer cells. *Anti-Cancer Agents Med Chem* (2009); **9**: 276-94.
- Claireborn A. Catalase activity, In : Greenwald R.A (Ed), CRC handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton (1985); FL: 283-284.

Comhair S.A., Erzurum S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2002); **283**(2): L246-55.

D

Daumas E. & De chancel A. Le Grand Désert ou Itinéraire d'une caravane du Sahara au pays des Nègres (Royaume de Haoussa). *Edition Napoleon & Cie*, Paris (1850): 387-390.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. & Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compound. *Food chemistry* (2006); **97**: 654-660.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards JF. & Stocker P. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compound and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology* (2007); **244**(6): 801-809.

Drög W. Free radical in physiological control of cell function. *Physiol Rev* (2002); **82**(1): 47-95.

Doan N.T., Paulsen E.S., Sehgal P., Møller J.V., Nissen P., Denmeade S.R., Isaacs J.T., Dionne C.A. & Christensen S.B. Targeting thapsigargin towards tumors. *Steroid* (2015); **97**: 2-7.

Dubois C., Abeele F.V., Sehgal P., Olesen C., Junker S., Christensen S.B., Prevarskaya N. & Møller J.V. Differential effects of thapsigargin analogues on apoptosis of prostate cancer cells. *Febs J* (2013); 280: 5430–5440.

E

Ellingwood F. American Material Medical, therapeutics and pharmacognosy. *Southwest School of Botanical Medicine* (1919): 431.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophysics* (1959); **82**: 70-77.

El-Maddawy Z.Kh. & El-Ashmawy I.M. Hepato-Renal and Hematological Effects of Diclofenac Sodium in Rats. *Global Journal of Pharmacology* (2013); **7**(2): 123-132.

Evans W.J. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* (2000); **72**: 647S-652S.

F

Favier A. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* (2003); **207**: 108-115.

Foufelle F. & Fromenty B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharma Res Per* (2016); **4(1)**: e00211.

Frédéric M. Approche efficace des thapsigargines (guaianolides) et synthèse d'azulènes rouges via un intermédiaire commun de type bicyclo[5.3.0]décane. Sciences agricoles. Université de Grenoble, (2012). Français.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* (1995); **64**: 97-112.

G

Gazin J.C. & Pinkas M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittelforschung* (1996); **46(11)**: 1086-1089.

Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot MJ. Determination of polyphénols and vitamin C in plant –derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry* (2005); **53(5)**: 1370-1373

Ghazi S. Détermination par méthodes in vitro de l'efficacité des différents systèmes photoprotecteurs (vêtements, verres, produits solaires). Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes (2011):38, 67,68.

Gómez-Caravaca AM., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. Advances in the Analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2006); **41(4)**: 1220-1234.

H

Habig W.H., Pabst M.J. & Jacoby W.B. Glutathion-S- transferase. the first enzymatic step in mercapturing acid formation. *J Biol Chem* (1974); **249(22)**: 7130-7139.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Chaelier C. & Chapelle J.P. Le stress oxydant. *Rev Med Liege* (2007); **62(10)**: 628-638.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* (2001); **18(9)**: 685-716.

Hammiche V., Merad R. & Azzouz M. Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. *Springer-Verlag France, Paris* (2013): 285-288.

Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *free radic biol Med* (2012); **33(6)**: 774-797.

Hickey E.J., Raje R.R., Reid V.E., Gross S.M. & Ray S.D. Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radic Biol Med* (2001); **31(2)**: 139-52

Hoeger B., Dietrich D.R., Schmid D., Hartmann A. & Hitzfeld B. Distribution of intraperitoneally injected diclofenac in brown trout(*Salmo trutta f. fario*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2008); **71 (2)**: 412-418.

I

Iqbal M., Som D.S., Okazaki Y., Fujisawa M. & Okada S. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolising enzymes in male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol* (2003); **92(1)**: 33-38.

Islas-Flores H., Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., Colín-Cruz A., Neri-Cruz N. & García-Medina S. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2013); **92**:32–38

J

Jain A. & Flora S.J. Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *J. Environ. Biol* (2012); **33(2)**: 233-238.

K

Karam-Allah S.M., Jawad H.A. & Abdullah M.J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS), Free radicals and reactive oxygen species (ROS): A review of literature. *The Medical Journal of Basrah University* (2009); **27(1)**: 46-53.

Kebièhe M., Lakroum Z., Mraïhi Z. & Soulimani R. Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diaète alloxanique. *Phytothérapie* (2011); **9(5)**: 274-282.

Kechkar M. Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. Mémoire de magistère en biotechnologies microbiennes. Université Mentouri de consstantine (2008).

Khacheba I. Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha-amylase. Mémoire en Génie Biologie. Université Amar Telidji. Laghouat (2008).

L

Ladjel S., Zellagui A. & Gherraf N. Reinvestigation of essential oil content of *Thapsia garganica* in the east of Algeria. *J Fundam Appl Sci* (2011); **3(2)**: 165-168.

Lahouel M., Boulkour S., Segueni N. & Fillastre JP. The flavonoide effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid peroxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathol Biol (Paris)* (2004); **52 (6)**: 314-322.

Langlade A. & Bonnet F. Efficacité comparée des anti-inflammatoires non stéroïdiens. *MAPAR* (1997): 322-334.

Lee D., Kim N. & Lee S. 2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl Hydrate, a Stable Free Radical, Is an α -Glucosidase Inhibitor. *J Biological & pharmaceutical bulletin* (2001); **24(6)**: 727-728.

Li L. & Hu G. Pink1 protects cortical neurons from thapsigargin-induced oxidative stress and neuronal apoptosis. *Biosci Rep* (2015); **35 (1)**: e00174.

Lin E.N., Barry H & Kim P. W. Nephrotoxic cell death by diclofenac and meloxicam. *Biochemical and biophysical research communications* (2008); **369**: 873-875.

Loru D., Incani A., Deiana M., Corona G., Atzeri A., Melis M.P., Rosa A. & Dessi M.A. Protective effect of hydroxytyrosol and tyrosol against oxidative stress in kidney cells. *Toxicology and Industrial Health* (2009); **25(4-5)**: 301-310.

M

Manduzio H., Rocher B., Durand F., Galap C. & Leboulenger F. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal* (2005); **2(2)**: 91-104.

Martinez-Cayuella M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* (1995); **77(3)**: 147-161.

Mather L. E. Do the pharmacodynamics of the non-steroidal antiinflammatory drugs suggest a role in the management of postoperative pain?. *Drugs* (1992); **44(5)**:1-13.

Menvielle-Bourg F.J. La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie* (2005); **3(3)**: 118-121.

Meziti A. Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L, Etude in vitro et in vivo. Mémoire de magister en biochimie appliquée, Université de Batna (2009).

Milane H. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse du Doctorat en Sciences de l'Université Louis Pasteur (2004): 155.

Morgan J. Nouvelle approche vers la synthèse de la thapsigargine (guaianolides) par réaction de métathèse ényne cyclisante, Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français.

N

Naidoo V. & Swan E.G. Diclofenac toxicity in Ggyps vulture is associated with decreased uric acid excretion and not renal portal vasoconstriction. *Comparative Biochemistry and physiology, Part C* (2009); **149**: 269-274.

Nayak A.K. Thermodynamic study of the diclofenac sodium solubility in various oils. *Chemistry* (2010); **19(4)**: 121-128.

Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E., Boelens P.G., van Norren K. & van Leeuwen P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* (2001); **74(4)**: 418-25.

O

Ohkawa H., Ohishi N. & Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry* (1979); **95(2)**: 351-358.

P

Perrin E. Drug dosing in older patients with chronic kidney disease. *Am Fam Physician* (2007); **76(12)**: 1766.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R. & Defraigne J.O. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour la médecine. *Vaisseaux, cœur, poumons* (1999); **4(5)**: 1-7.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. Fumée de cigarette: une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. *Medi Sphère* (1998); **78**: 37-39.

R

Rached W. Evaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. Mémoire de magister en biologie. Biochimie végétale appliqué (2009).

Rached W., Benamar H., Bennaceur M. & Marouf A. Screening of the Antioxidant Potential of Some Algerian Indigenous Plants. *Journal of Biological Sciences* (2010); **10**: 316-324.

Rainsford K. D. & Velo G. P. Side-Effects of Anti-Inflammatory Drugs 3. *Springer Science & Business Media* (2012): 200.

Reboulleau SD. Notice sur la résine de thapsia garganica et sur son emploi en médecine comme agent révulsif sous forme d'emplâtre. *Edition Abadie constantine* (1856); (2): 15.

S

Salvayre R., Auge N. & Nègre-Savayre A. Role de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In l'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutique. *J.F., Toussaint, M.P., Jacob, L., Lagrost, J., Champman, Eds. Masson : Paris* (2013), **14**: 269-290.

Saucedo-Vence K., Dublán-García O., López-Martínez L.X., Morachis-Valdes G., Galar-Martínez M., Islas-Flores H. & Gómez-Oliván L.M. Short and long-term exposure to diclofenac alter oxidative stress status in common carp *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology* (2015); **24(3)**: 527-39.

Servais S. Altération mitochondriale et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effet de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon (2004): 20.

Soubeiran E. Traité de pharmacie théorique et pratique, volume 2, édition victor Masson & fils, Paris (1870): 861.

Stepanova S., Praskova E., Chromcova L., Plhalova L., Prokes M., Blahova J. & Svobodova Z. The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental toxicology and pharmacology* (2013); **35(3)**: 454-460.

Stocker P., Yousfi M., Djerridane O., Perrier J., Amziani R., El Boustani S., Moulin A., Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxylesterase. *Biochimie* (2004); **86(12)**: 919-25.

Swan E.G. Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biology Letters* (2006); **2**: 279-282

T

Tang X, Luo Y.X, Chen H.Z and Liu D.P. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front Physiol* (2014); **5**: 175.

V

Vidal le dictionnaire, 89e Edition, France. (2013): 894,295.

W

Waldbaum S. & Patel M. Mitochondrial Oxidative Stress in Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsy Res* (2010); **88(1)**: 23-45.

Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci* (2002); **957**: 21-36.

Woen P.S. Bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), distinct from the mitochondrial permeability transition, is a key mechanism in diclofenac-induced hepatocyte injury: multiple protective roles of cyclosporin A. *Toxicology and Applied* (2008).

Wood Z.A., Schröder E., Robin Harris J. & Poole L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* (2003); **28(1)**: 32-40.

Y

Yin Z., Ivanov V., Habelhah H., Tew KD. & Ronai Z. Glutathione S-Transferase p Elicits Protection against H₂O₂-induced Cell Death via Coordinated Regulation of Stress Kinases. *CANCER RESEARCH* (2000); **60(15)**: 4053–4057.

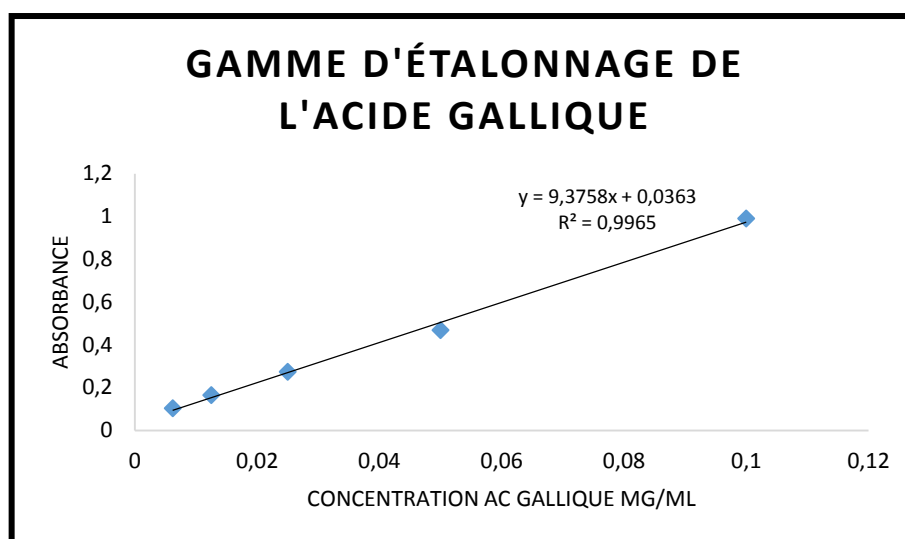
Z

Zeghad N. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antimicrobienne. Mémoire de Magister en Biotechnologie végétale. Université de Mentouri Constantine (2009).

Zeynab Kh., El-Maddawy & El-Ashmawy I.M. Hepato-Renal and Hematological Effects of Diclofenac Sodium in Rats. *Global Journal of Pharmacology* (2013); **7 (2)**: 123-132,

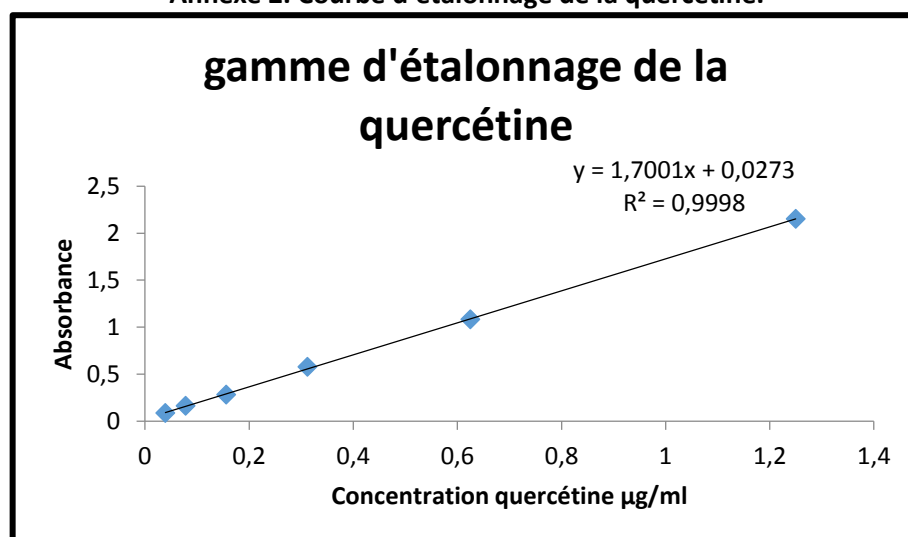
Annexes

Annexe 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



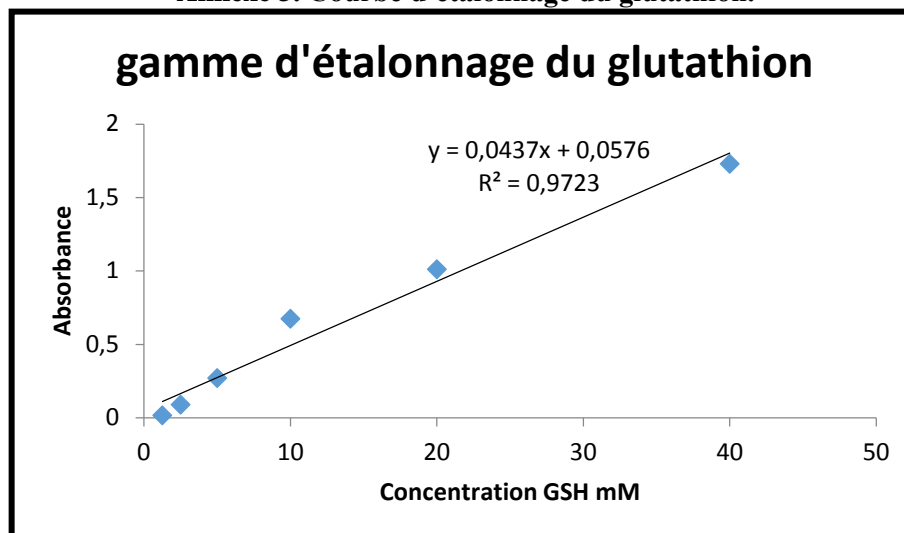
[Ac gal] (mg/ml)	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0062
MOYENNE	0,99	0,468	0,273	0,164	0,1025
ESD	0,11596551	0,03394113	0,01979899	0,04666905	0,05020458

Annexe 2. Courbe d'étalonnage de la quercétine.



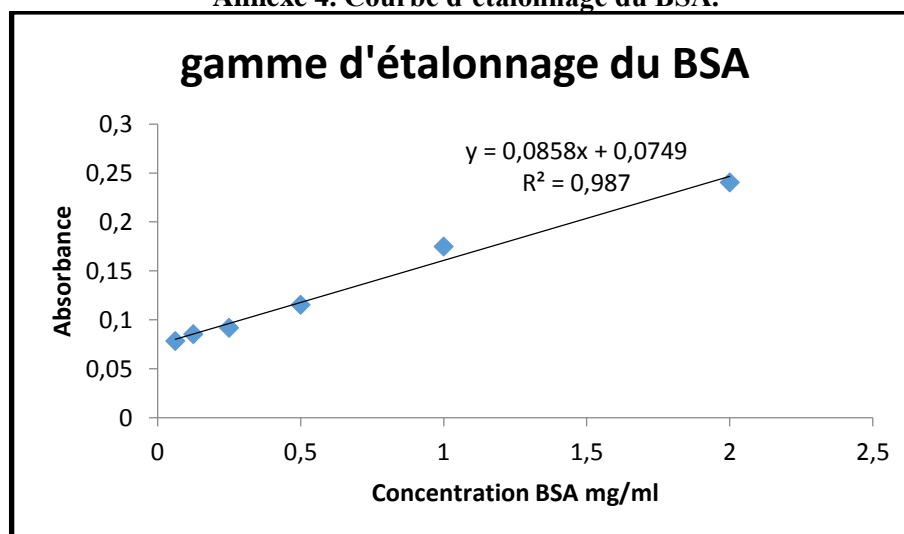
[quercétine] (µg/ml)	0,039	0,078	0,156	0,312	0,625	1,25
MOYENNE	0,087	0,1635	0,2825	0,578	1,083	2,152
ESD	0,01555635	0,02545584	0,00989949	0,00494975	0,0205061	0,00565685

Annexe 3. Courbe d'étalonnage du glutathion.



[glutathion] (mM)	1,25	2,5	5	10	20	40
DO	0,015	0,088	0,269	0,673	1,01	1,728

Annexe 4. Courbe d'étalonnage du BSA.



[BSA] (mg/ml)	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2
MOYENNE	0,0785	0,0855	0,092	0,1155	0,175	0,2405
ESD	0,00212132	0,00777817	0,00141421	0,00636396	0	0,00494975

Annexe 5. Variation des concentrations hépatique en glutathion chez des souris recevant le diclofénac seul ou en association avec un extrait de la partie aérienne ou racines.

	Traitement des animaux					
	Contrôle (C)	Extrait de la partie aérienne seul (PA)	Extrait de la partie aérienne + diclofénac (PA+D)	Diclofénac seul (D)	Extrait de racine + diclofénac (R+D)	Extrait de racine seul (R)
[GSH] hépatique (mMoles/g)	2,276 ± 0,534	2,743 ± 0,266	4,393 ± 0,156 ** ###	2,104 ± 0,179	1,818 ± 0,385	1,227 ± 0 #

Annexe 6. Variation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique chez des souris recevant le diclofénac seul ou en association avec un extrait de la partie aérienne ou un extrait de racine

	Traitement des animaux					
	Contrôle (C)	Extrait de la partie aérienne seul (PA)	Extrait de la partie aérienne + diclofénac (PA+D)	Diclofénac seul (D)	Extrait de racine + diclofénac (R+D)	Extrait de racine seul (R)
[Protéines] Hépatique (mg/ml)	7,581 ± 1,114	7,610 ± 1,838	9,839 ± 0,573	8,135 ± 1,315	8,892 ± 1,689	7,523 ± 0
Activité hépatique de GST μ mole/min/mg de protéines	0,977 ± 0,059	0,856 ± 0,065 ##	1,692 ± 0,156 *** #	1,369 ± 0,154 *	0,463 ± 0,203 * #	0,753 ± 0 * #

Annexe 7. Variation du taux du CAT hépatique chez des souris recevant le diclofénac seul ou en association avec un extrait de la partie aérienne ou racines.

	Traitement des animaux					
	Contrôle (C)	Extrait de la partie aérienne seul (PA)	Extrait de la partie aérienne + diclofénac (PA+D)	Diclofénac seul (D)	Extrait de racine + diclofénac (R+D)	Extrait de racine seul (R)
[Protéines] hépatique (mg/ml)	7,581 ± 1,114	7,610 ± 1,838	9,839 ± 0,573	8,135 ± 1,315	8,892 ± 1,689	7,523 ± 0
Activité CAT hépatique UI/mg de protéines	0,033 ± 0,007	0,020 ± 0,007 ##	0,024 ± 0,002 ###	0,065 ± 0,002 **	0,006 ± 0,001 ** ###	0,014 ± 0 * ###

Annexe 8. Variation du taux du MDA cytosolique chez des souris recevant le diclofénac seul ou en association avec un extrait de la partie aérienne ou racines.

	Traitement des animaux					
	Contrôle (C)	Extrait de la partie aérienne seul (PA)	Extrait de la partie aérienne + diclofénac (PA+D)	Diclofénac seul (D)	Extrait de racine + diclofénac (R+D)	Extrait de racine seul (R)
Concentration $\mu\text{M/g}$ de tissu (foie)	0,646 \pm 0,076	0,795 \pm 0,312	0,890 \pm 0,330	1,967 \pm 0,939 *	6,935 \pm 5,355 *	7,541 \pm 0 #

<p>Présenté par : BOUHIDEL Ines BOURIDANE Mounira KHELLAF Amira</p>	<p>Encadreur : Dr. BENGUEDOUAR. L</p>
<p>Date de soutenance : 02/07/2016</p>	
<p>Évaluation de l'effet antioxydant d'un extrait éthanolique de la plante <i>Thapsia garganica</i> de la région de Jijel contre la toxicité hépatique du diclofénac chez les souris NMRI.</p>	
<p>Nature de diplôme : Master 2 en biologie : Option pharmacologie expérimentale</p>	
<p>Résumé</p>	
<p>Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une investigation sur l'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'extrait éthanolique de la plante <i>Thapsia garganica</i> de la région de Bordj T'har (Jijel). Le screening phytochimique de cet extrait a révélé la présence de faibles quantités de polyphénols, principalement les flavonoïdes. Les résultats obtenus ont démontré que le traitement par le Diclofénac utilisé à la dose maximale tolérée de 100 mg administrée en dose unique, a provoqué un stress oxydant au niveau hépatique chez la souris. De plus, le prétraitement par les extraits de la plante n'a pas pu neutraliser les ROS générés sous l'effet du diclofénac. En effet, l'extrait de la partie aérienne de la plante TG n'a pas présenté d'effet hépatoprotecteur marqué en raison de sa pauvreté en polyphénols, vu que TG a été récoltée hors saison de floraison. D'autre part, l'extrait des racines de cette même plante a montré un effet prooxydant prononcé et relevé dans tous les paramètres analysés suggérant son utilisation en tant que substance proapoptotique dans les thérapies anticancéreuses. Finalement, les recherches précédentes ont révélé que l'extrait brut de TG présente un effet antioxydant uniquement s'il est riche en polyphénols, capables de neutraliser les ROS et restaurer les réserves cellulaires anti-oxydantes.</p>	
<p>Mots clés : antioxydant, stress oxydant, <i>Thapsia garganica</i>, polyphénols.</p>	
<p>Abstract</p>	
<p>This work is a part of an investigation on the evaluation of the antioxydant activity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> of the ethanolic extract of the plant <i>Thapsia garganica</i> collected from the region of Bordj T'har (Jijel). The phytochemical screening of this extract revealed the presence of weak amounts of polyphenols, mainly the flavonoids. The results obtained showed that the treatment by Diclofénac used with tolerated maximum dose of 100 mg given as a unique dose, caused an oxidative stress in mouse liver. Also, the pretreatment by plant extracts can't neutralize the ROS produced in response to diclofenac treatment. Indeed, the aerial part extract of the plant TG presented no marked protective effect because of its poverty in polyphenols, as TG was collected off flowering season. In the other hand, the extract of the roots of the same plant showed a pronounced prooxidant effect which is noted in all investigated parameters suggesting its use as proapoptotic substance in anticancer therapies. Finally, previous researches found that the TG crude extract has an antioxidant effect only if it is rich in polyphenols that neutralize ROS and restore cellular antioxidant stores.</p>	
<p>Key words: antioxydant, oxidative stress, <i>Thapsia garganica</i>, polyphenols.</p>	
<p>المخلص</p> <p>هذا العمل هو جزء من تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الإيثانولي لنباتة <i>Thapsia garganica</i> من منطقة برج الطهر (جيجل). أظهرت الدراسة الكيميونباتية لهذا المستخلص وجود كميات قليلة من البوليفينول وأساسا الفلافونويدات. كما أظهرت نتائج البحث أن العلاج بدواء ديكلوفيناك المستعمل بجرعة 100 ملغ في اليوم يتسبب في الاجهاد التأكسدي في كبد الفئران، إضافة الى ذلك، العلاج المسبق بمستخلصات النبتة لم يكن فعالا في تعديل نسبة الجذور الحرة المنتجة تحت تأثير المعالجة بديكلوفيناك. لقد تبين أن مستخلص القسم الهوائي للنباتة TG لم يكن له دورا فعالا في حماية خلايا الكبد بسبب فقره من مادة البوليفينول وهذا راجع إلى قطف النبتة في غير موسم إزهارها. من جهة أخرى أظهر مستخلص الجذور من نفس النبتة نشاطا محفز للأكسدة وذلك في جميع المؤشرات المعايينة. وبالتالي يمكن أن يقترح استعماله كمادة محفزة للموت الخلوي في المعالجة ضد السرطان. وأخيرا أظهرت الدراسات السابقة أن المستخلص الخام للنباتة TG يبين نشاطا مضادا للأكسدة في حالة وجود مادة البوليفينول القادرة على تعديل نسبة الجذور الحرة وإسترجاع المخزون الخلوي المضاد للأكسدة.</p>	
<p>الكلمات المفتاحية: مضادات للأكسدة، الإجهاد التأكسدي، <i>Thapsia garganica</i>، بوليفينول.</p>	