

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique

جامعة جيجل محمد الصديق بن يحي

Université de Jijel

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



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique en Biologie

Option : Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème

**Etude de l'hépto-toxicité aigüe induite par le chlorpyrifos
chez la souris. Recherche d'effets protecteurs de l'extrait
chloroformique de la plante *centaurea calcitrapa***

Membres de jury :

Présidente: M^{me} BENSAM Moufida

Examinatrice : M^{me} ROUIBAH Hassiba

Encadreur : Dr RECHRECHE Hocine

Présenté par:

FADEL Atidel

MECHOUCHE Meriem

ZEBILA Widad

Année Universitaire 2015-2016

Numéro d'ordre :

Remerciements

Louange à DIEU, le tout Miséricordieux, le très Miséricordieux de nous avoir aidé à finir ce modeste travail de fin d'études.

*Merci infiniment à notre encadreur **Dr. RECHRECHE Hocine** qui a dirigé ce travail et veillé à ce qu'il soit mené à terme.*

*Grand et respectueux remerciement va à **M^{me}. BNESAM Moufida** et **M^{me}. ROUIBAH Hassiba** d'avoir accepté le jury de notre mémoire.*

*Nous n'oublions pas de remercier vivement les membres de l'équipe laborantine surtout **M^{lle} Boudraa Soumia** et le personnel du service de l'Anapathie de l'Hôpital de Jijel pour leur aide et soutien morale.*

Nous remercions aussi tous nos collègues de la promotion 2016-2015 et on leur souhaite beaucoup de réussite.

*Finalement, nous tenons à remercier nos très **chers parents**, nos **frères** et nos **sœurs** pour leur soutien morale et physique, ainsi que tous ceux qui, de près ou de loin, nous l'avons aidé dans notre travail.*

*De très précieux remerciements vont à mon frère **FADEL Soufiane** qui n'a pas hésité de me venir humblement en aide, Je tiens surtout à te remercier pour vos conseils qui m'ont été de grande utilité.*

*** Merci ***

Sommaire

Liste des abréviations	iii
Introduction	1
I. Revue bibliographique	
I.1. Organophosphorés	2
I.1.1. Métabolisme des organophosphorés	2
I.1.2. Toxicité des organophosphorés	3
I.1.2.1. Neurotoxicité des OP	4
I.1.2.2. Immunotoxicité des OP	4
I.1.2.3. Génotoxicité des OP	5
I.1.3. Chlorpyrifos	5
I.2. Toxicité hépatique induite par le CPF	6
I.2.1. Métabolisme du CPF	6
I.2.2. Stress oxydatif	8
I.2.3. Inflammation hépatique induite par le CPF	10
I.3. La plante <i>Centaurea calcitrapa</i>	12
I.3.1. Description	12
I.3.2. Composition chimique et activités biologiques	13
I.3. 3. Propriétés et usages	13
II. Matériel et méthodes	
II.1. Analyses phytochimiques	15
II.1.1. Préparation des extraits	15
II.1.2. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes	15
II.1.3. Mesure de l'activité anti-radicalaire par le test de DPPH	16
II.1.4. Mesure de l'activité de chélation du fer	16
II.2. Etude <i>in vivo</i> de l'effet de l'EC de la plante sur l'hépto-toxicité induite par le CPF	17

II.2.1. Entretien des animaux	17
II.2.2. Analyses microscopiques	18
II.2.3. Préparation de la fraction cytosolique	18
II.2.4. Mesure de la peroxydation lipidique (MDA)	19
II.2.5. Dosage du GSH	19
II.2.6. Mesure de l'activité de la catalase (CAT).....	19
II.2.7. Mesure de l'activité de glutathion-s-transférase (GST).....	20
II.2.8. Dosage des Protéines totaux	20
II.2.9. Analyse des paramétré biochimique.....	20
II.2.10. Evaluation statistique.....	21

III. Résultats et discussion

III.1. Caractérisation et évaluation des activités anti-oxydantes <i>in vitro</i> des différents extraits..	22
III.2. Mise en évidence de la toxicité hépatique induite par CPF et de l'effet protecteur curatif et préventif de l'EC chez la Souris.....	26
III.2.1. Paramètre non enzymatique	27
III.2.2. Paramètre enzymatique	30
III. 3. Détermination de l'état de fonctionnement du foie	32
III. 4. Mise en évidence des altérations tissulaires induites au niveau du foie.....	35

IV. Conclusion et perspective 38

V. Références bibliographiques 40

Annexes

Liste des abréviations

Ach: acétylcholine

AChE : acétylcholinestérase

CAT : catalase

CPF : Chlorpyrifos

CPO: chlorpyrifos-oxon

CYP450: cytochrome P450

GPx: glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSH : glutathion

GST : glutathion-S-transférase

IC₅₀: Inhibition concentration 50

LPO: peroxydation lipidique

MDA : malonyldialdéhyde

NAC : N-Acétyle cystéine

OP : organophosphorés

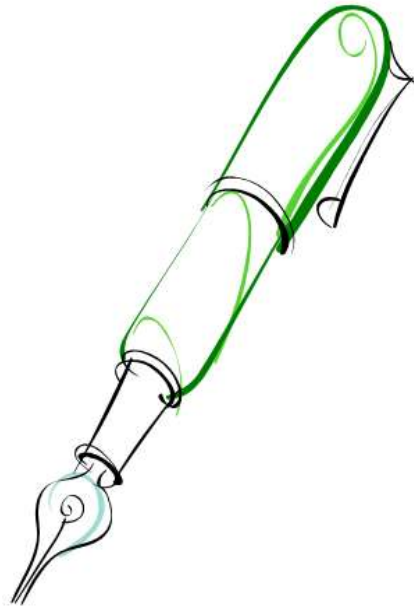
PAL: phosphatase alcaline

PON-1: paraxonase-1

ROS : reactif oxygen species

SNC : système nerveux centrale

Introduction



Les organophosphorés (OP) sont les pesticides les plus couramment utilisés ; ils constituent une classe de substances toxiques et potentiellement mortelles. Ils manifestent leur toxicité aiguë par l'inhibition de la cholinestérase qui comprend l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase (Dvir et al, 2010). En fait, l'inhibition de l'acétylcholinestérase demeure particulièrement le principal mécanisme de la toxicité. En effet, le rôle central de l'acétylcholinestérase est de mettre fin à la signalisation au niveau des synapses cholinergiques par la dégradation de l'acétylcholine (neurotransmetteur) en choline et un acide acétique (Kwong, 2002).

Le Chlorpyrifos (CPF) est un organophosphoré dont l'utilisation comme insecticide est largement répandue et motivée. Elle permet de contrôler une grande variété de parasites dans les exploitations agricoles et animales (Whyatt et al., 2007). Par ailleurs, l'inhibition systémique et non sélective de la cholinestérase par le CPF est associée avec de nombreux effets secondaires y compris ceux liés à la perturbation endocrinienne au cours des premières étapes du développement et de la croissance des vertébrés (Venerosi et al. 2012). Ainsi, ces effets menacent de plus en plus la santé des humains et de plusieurs autres espèces animales (Colville et al., 2012).

Or les traitements utilisés contre les intoxications par les OP (CPF) sont symptomatiques pour l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Bien qu'il ait été prouvé que d'autres mécanismes sont impliqués dans l'amélioration de ce type d'intoxication, nous avons voulu savoir d'une manière générale si l'utilisation d'extraits bruts de plantes améliore les effets relatifs à ces intoxications ; et cela pour renforcer les traitements traditionnels.

La présente étude a été réalisée pour évaluer les effets antioxydants potentiels de la plante *centaurea calcitrapa* à travers l'analyse d'un certain nombre de paramètres du stress oxydatif et des dommages qui s'opèrent au niveau du foie suite à une intoxication aiguë induite par CPF. Pour se faire, nous avons procédé comme suit : 1)- Evaluation des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits bruts méthanolique (EM), éthanolique (EE) et Chloroformique (EC) de *centaurea calcitrapa* ; 2) – Recherche de l'activité antioxydante *in vitro* des trois extraits précédemment cités par le test de DPPH et la chélation du fer ferreux ;3)- Analyse de l'activités anti-oxydante de l'extrait chloroformique *in vivo* (chez la souris) à travers l'évaluation de certains marqueurs biochimiques, indicateurs de état de fonctionnement et de stress oxydatif au niveau du foie ; 4)- Analyse histologique par microscopie optique des tissus hépatiques intoxiqués par le CPF en présence ou en absence de ces extraits.

I. Revue bibliographiques



I.1. Organophosphorés

Les insecticides organophosphorés (OP) sont des pesticides organiques de synthèse qui sont largement utilisés essentiellement en agriculture comme les insecticides, les némacides ou les acaricides (Derkaoui, 2011). Les OP existent sous des formes liquides et solides. Ce sont normalement des esters, des amides, des dérivés thiols des acides phosphoriques, des phosphonique, des phosphorothioïque, des phosphonothioïque. En fait ils possèdent une structure chimique générale qui est assez similaire (Tripathi et Srivastava, 2010). Plus d'une centaine d'OP sont connus et leur degré de toxicité varie de modérément à hautement toxique selon la matière active qui les compose (IPCS, 1986 ; Lauwerys, 1982).

Les composés OP sont constitués d'un atome de phosphore pentavalent ; ce dernier est lié à quatre substituant : a) un atome d'oxygène ou de soufre dont la liaison s'effectue via une double liaison ; b) un groupe partant (X) ; c) un groupement carboxyle (O-R₁) ; d) un autre groupement (R₂). Les propriétés physico-chimiques des OP ont été modifiées afin d'améliorer leur activité insecticide, idem de manière à réduire leur stabilité dans l'environnement (Lotti, 2002). Leur forte capacité insecticide est associée à une toxicité aigüe ; elle est modérée chez les mammifères et elle dotée d'une stabilité qui est relativement faible dans l'environnement (par rapport aux organochlorés). Ces aspects font des OP la principale classe d'insecticides qui sont utilisés dans le monde à ce jour (Costa, 2006 ; Costa et al. 2008).

I.1.1. Métabolisme des organophosphorés

Chez les mammifères, les OP sont rapidement métabolisés, principalement par le foie, même si une petite fraction reste stockée dans les tissus adipeux (Bakke et Price, 1976 ; Kamrin, 1997).

Après l'exposition, les pesticides OP peuvent être métabolisés par le cytochrome P450 (CYP450). Cette métabolisation s'effectue par deux voies différentes : soit par une réaction de désarylation, et dans ce cas l'OP peut être directement hydrolysé par un CYP450 en son métabolite organique inactif et en dialkylthionate ; soit par une réaction de désulfuration oxydatif de la double liaison avec le phosphore par un CYP450 du foie. Cela pour former leur métabolite actif oxon qui est plus toxique, et qui peut réagir avec l'acétylcholinestérase (AChE). Ce métabolite est hydrolysé par une A-estérase : paraoxonase-1 (PON-1) ou par une B-estérase en dialkylphosphate (DAP) et en métabolite organique inactif contenant le « leaving group » (Costa, 2006 ; Bakke and Price, 1976).

I.1.2. Toxicité des organophosphorés

Les OP sont des toxiques létaux à action systémique prédominante dont le mécanisme d'action principal est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine (ACh) au niveau des synapses cholinergiques ; et cela par l'inhibition irréversible des cholinestérases (Sidell, 1994 ; Thiermann et al., 2005). L'intoxication par les OP peut survenir par ingestion, pénétration cutanée, inhalation ou pénétration oculaire (Vale, 1998 ; Eskenazi et al., 1999). L'inhibition de l'enzyme AChE provoque une accumulation d'acétylcholine dans les synapses et une sur-stimulation des récepteurs muscariniques et nicotiniques provoquant un certain nombre de troubles et symptômes. Il existe d'autres effets non muscariniques de pesticides OP comme l'insuffisance de la jonction neuromusculaire aiguë et chronique et l'insuffisance respiratoire centrale (Rosenbaum et Bird, 2010).

Les symptômes de toxicité aiguë s'accompagnent parfois par de troubles persistants à long terme. Il s'agit de déficits des fonctions psychomotrices et cognitives, de pertes de sensibilités et de fonctions motrices. Ces effets en fait surviendraient encore jusqu'à 10 ans après une intoxication ; cela suggère la lenteur de l'apparition et la grande permanence de ces troubles (Savage et al., 1988). Ces troubles peuvent donc survenir suite à une exposition par rapport à une dose aiguë d'un OP et sont liés à une forte inhibition de l'AChE, au-dessus du seuil de toxicité aiguë du produit. Cependant, l'exposition à une dose aiguë n'est pas la seule manière d'atteindre le seuil. En effet, une exposition chronique par rapport à des doses qui, à elles seules ne dépassent pas le seuil de toxicité aiguë, peut conduire progressivement à une inhibition de l'AChE qui est suffisante à produire un effet toxique. Par conséquent, cet effet correspond aux symptômes qui sont décrits plus haut. Pour un insecticide OP donné, il existe donc une limite d'exposition par rapport à une dose forte unique (aiguë) et une limite à l'exposition chronique à partir de laquelle des effets toxiques observables peuvent survenir (Zheng et al., 2000).

Lors de l'exposition chronique, l'activité de l'AChE peut atteindre des niveaux faibles sans symptômes apparents. Une faible exposition supplémentaire peut provoquer l'apparition des symptômes ; alors ils ne sont pas uniquement associés au niveau d'inhibition qui est atteint. En revanche, ils dépendent aussi de la rapidité avec laquelle la chute d'activité cholinestérasique s'est produite (Wilson et al., 2005).

Bien que la cible principale des OP est le système nerveux central et périphérique, de nombreux auteurs suggèrent que ces composés, à la fois dans l'intoxication aiguë et chronique, perturbent le processus d'oxydo-réduction ; cela en modifiant l'activité des enzymes anti-oxydantes et

provoquant la mise en valeur de la peroxydation des lipides dans de nombreux organes (Zhang et al., 2004 ; Fortunato et al., 2006 ; Poovala et al., 1999 ; Buyukokuroglu et al., 2008). D'autres systèmes et organes peuvent être affectés par ces composés, notamment le foie, les reins, les poumons, les muscles, le système immunitaire et le système hématologique (Possamai et al., 2007; Abdollahi et al., 2004).

I.1.2.1. Neurotoxicité des OP

Les OP présentent leur toxicité par l'intermédiaire de l'inhibition de AchE (Le rôle central de AchE est de mettre fin à la signalisation au niveau des synapses cholinergiques par la dégradation de l'Ach) cela entraîne l'accumulation d'Ach au niveau des synapses et produisant ainsi une manifestation cholinergiques (Eddleston et al., 2004). L'inhibition de l'ACHé est une caractéristique remarquable des intoxications aiguë induite par les OP qui peut entraîner une crise cholinergique et début des crises. Une étude réalisée par Banks et Lein (2012) montre que les crises induites par les OP sont associés à des lésions neuronales et l'induction de l'inflammation. De plus, ces crises coïncident avec l'élévation des cytokines et chimiokines, l'activation gliale, l'augmentation de la production de PG, et également avec les lésions neuronales dans l'hippocampe, le cortex piriforme et les amygdales. Dans cette étude des nouvelles preuves suggèrent que les réponses inflammatoires peuvent également jouer un rôle neuroprotecteur. Il a été rapporté que l'activation gliale qui est induite par les OP déclenche la libération non seulement des cytokines pro-inflammatoires (de l'IL-6, TNF α et IL-1 β) mais encore la sécrétion à partir d'astrocytes, des facteurs neurotrophique et d'autres facteurs de croissance qui favorisent l'angiogenèse et la neurogenèse ; et qui serrent ainsi à réparer les dommages induites par les OP (Banks et Lein, 2012).

I.1.2.2. Immunotoxicité des OP

Les OP, et notamment le CPF, pour lequel il existe une littérature abondante, sont capables d'affecter le système immunitaire via d'autres cibles cellulaires et moléculaires. Une large documentation est disponible sur les propriétés immunotoxiques de ces composés (Gallichio et al., 1987 ; Parent-Massin et al., 1993 ; Nakadai et al., 2006). Les personnes exposées au CPF soit à la maison soit au travail présentent en fait des changements de plusieurs paramètres immunologiques (Thrasher et al., 2002). La capacité des OP à perturber l'immunité résultante d'effets sur des cibles cellulaires précises permet la régulation du processus d'immunité au niveau de : 1) la production d'interleukine ; 2) la prolifération des lymphocytes T ; 3) la modification des profils de sécrétion des cytokines ; 4) l'inhibition de l'activité cytolytique des cellules NK via l'induction de l'apoptose.

L'immunotoxicité peut être directe par l'inhibition de serine hydrolases ou estérases dans les composants du système immunitaire ; cela par des dommages oxydatifs aux organes immunitaires ou par une modulation des voies de signalisation qui contrôlent les fonctions immunitaires (Tamara et Richard, 2003). Par ailleurs, le CPF est capable de modifier l'hématopoïèse myéloïde ou de perturber la différenciation de cellules hématopoïétiques en culture, après exposition expérimentale de l'animal par gavage (Li et al., 2007 et 2009)

I.1.2.3. Génotoxicité des OP

Les OP sont capables d'induire des dommages à l'ADN (Hreljacal., 2008 ; Hreljac et Filipic, 2009 ; Ukpebor et al., 2011). Des effets génotoxiques (micronoyaux, coupures simples et doubles brins, échanges de chromatides) sont observés *in vivo* (larve de xenope, poisson, souris) (Shadnia et al., 2005 ; Rahman et al., 2002) et *in vitro* (lymphocytes de sang périphérique humain, lignée cellulaire NK, hépatocytes de souris) (Li et al., 2007 ; Cui et al., 2011 ; Khanna et al., 2011). La génotoxicité des OP pourrait être liée à leur propriété pro-oxydante (Shadnia et al., 2005). Chez l'homme, le polymorphisme du gène codant pour l'enzyme PON-1 impliqué dans la détoxification des OP est en relation avec l'activité génotoxique de ces composés (Singh et al., 2011). Le polymorphisme génétique de PON-1 peut intervenir dans la susceptibilité au stress oxydant qui est associée aux organophosphorés (Huen et al., 2010).

I.1.3. Chlorpyrifos

Le Chlorpyrifos (O, O'-diethyl O-3, 5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothionate, CPF), est un composé OP largement utilisé comme insecticide pour contrôler une grande variété de parasites dans les exploitations agricoles et animales (Whyatt et al., 2007).

L'inhibition systémique et non sélective de la cholinestérase par CPF a été aujourd'hui connue avec un ensemble de nombreux effets secondaires y compris la perturbation endocrinienne au début des étapes de développement et de croissance des vertébrés (Venerosi et al., 2012). La menace de ces effets est de plus en plus importante en ce qui concerne la santé humaine et celle de plusieurs autres espèces animales y compris la faune d'eau douce (Colville et al., 2008).

En outre de l'inhibition de la cholinestérase, les principaux effets de ces composés et leurs métabolites sont liés à la dérégulation des pro-cytokines anti-inflammatoires et le stress oxydatif (Chen et al., 2014 ; Benedetto, 2015).

I.2. Toxicité hépatique induite par le CPF

Le foie c'est l'organe le plus grand du corps humain pesant environ 1500 g. Il effectue plus de 500 fonctions métaboliques vitales (Naruse et al., 2007). Il est impliqué dans la synthèse de produits tels que le glucose, les dérivés de la glycogénèse, des protéines plasmatiques, les facteurs de coagulation et de l'urée ; ils sont tous libérés dans la circulation sanguine. Le foie régule les niveaux d'acides aminés dans le sang. Le parenchyme hépatique sert d'organe de stockage pour plusieurs produits comme le glycogène, la graisse et les vitamines liposolubles. Il est également impliqué dans la production d'une substance qui est appelée la bile ; elle est excrétée dans le tractus intestinal (Saukkonen et al., 2006). Le foie est l'organe principal de la détoxification ; il agit dans l'élimination des agents pathogènes, des produits chimiques toxiques et des déchets métaboliques de l'organisme. De même, il contribue à fournir des nutriments à d'autres organes (Chatterjee et Mitra, 2015; Raschzok et al., 2015).

L'hépatotoxicité se réfère à un dysfonctionnement ou des lésions du foie qui sont associées à des surcharges de drogues ou de substances xénobiotiques (Navarro et Senior, 2006). Les produits chimiques qui causent des lésions hépatiques sont appelés hépatotoxines ou hépatotoxiques. Ces derniers sont des composés exogènes de pertinence clinique et peuvent comprendre des surdoses de certains médicaments ou de certains produits chimiques industriels comme les pesticides ; voire des produits chimiques naturels comme les microcystines, les remèdes à base de plantes et les compléments alimentaires (Willett et al., 2004 ; Papay et al., 2009). L'hépatotoxicité peut résulter non seulement d'une toxicité directe du composé primaire mais aussi à partir d'un métabolite réactif ou d'une réponse à médiation immunologique affectant les hépatocytes, les cellules épithéliales biliaires et / ou la vascularisation du foie (Saukkonen et al., 2006 ; Deng et al., 2009). La réponse hépatotoxique induite par un agent chimique dépend de la concentration de l'agent toxique qui peut être un composé initial, un métabolite toxique ou une expression différentielle des enzymes et du gradient de concentration de cofacteurs dans le sang à travers l'acinus (Kedderis, 1996).

I.2.1. Métabolisme du CPF

Le CPF est métabolisé par un Cytochrome P450 en Chlorpyrifos-Oxon (CPO) qui constitue le métabolite actif. Cela est la bioactivation du CPF. Le CPF peut ensuite être hydrolysé par une A-estérase (la PON-1) ou une B-estérase en diéthylphosphate (DEP) et en 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinal (TCP) ; ce dernier étant le métabolite inactif. C'est ainsi une des voies de détoxification du CPF. Il en existe une autre dans laquelle le CPF peut être directement hydrolysé en diéthylthiophosphate et

TCP. Il est éliminé dans les urines sous forme de sulfates ou glucuronides de TCP (Barr et Angerer, 2006 ; Timchalk et al., 2006).

Le CPF provoque le dysfonctionnement hépatique. Sa biotransformation s'effectue principalement dans le foie et dans une moindre mesure dans les entérocytes du petit intestin. Dans les deux cas, la voie d'activation (CPF en CPO) est mineure par rapport aux voies de désactivation (CPF en TCP et CPO en TCP). Cela est valable tant chez l'Homme que chez les rongeurs. Cependant, dans les entérocytes, le rapport activation/désactivation du CPF est plus petit que dans le foie. Cette différence de métabolisme trouve son origine dans la répartition des activités entre les enzymes de bioactivation et de détoxification. L'enzyme PON-1 qui désactive le CPO aurait particulièrement une activité 100X plus basse dans les entérocytes que dans le foie. En d'autres termes, le métabolisme de l'intestin produit une plus grande fraction de CPO par rapport à celui du foie. Cependant, le rôle métabolique de l'intestin a souvent été négligé lors d'expositions orales à de fortes doses de CPF car sa capacité métabolique est rapidement saturée ; cette capacité permet à une grande fraction de la dose de CPF d'atteindre directement le foie via la circulation de la veine porte (Figure 01) (Poet, 2003).

Le CPF agit par contact, par ingestion et par inhalation (vapeur) sur un grand nombre de ravageurs. De plus, il possède un effet neurotoxique et manifeste une longue persistance d'action. Il est également responsable des effets cholinergiques aigus exercés par son métabolite actif (le CPO) qui inhibe l'AchE. Ainsi il empêche l'hydrolyse de l'Ach qui mène à une stimulation massive des récepteurs cholinergiques. Les signes de toxicité incluent un dysfonctionnement autonome, des fasciculations, des saisies et des convulsions et une détresse respiratoire (Abou-Donia et al., 2006 ; Stapleton et Chan, 2009).

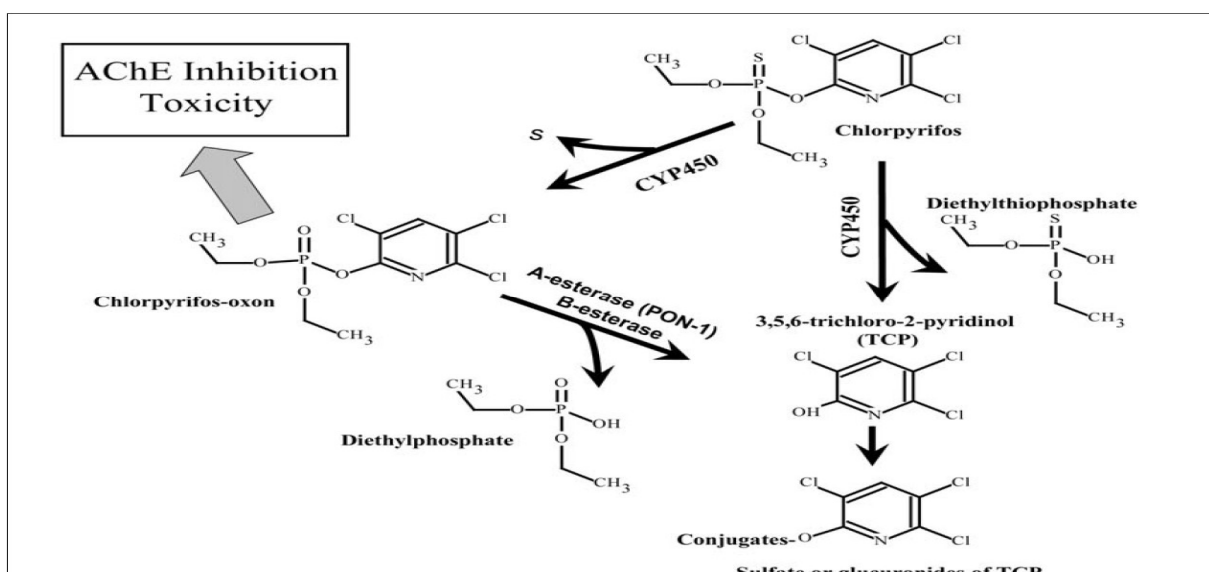


Fig. 01. Métabolisme du CPF (Timchalk et al., 2006).

I.2.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme une perturbation de l'équilibre prooxidant-antioxydant et conduit à des dommages cellulaires potentiels (Rahal et al., 2014). Costantini et Verhulst (2009) définissent également le stress oxydatif comme étant la vitesse à laquelle les dommages oxydatifs sont générés. Les dommages induits par le stress oxydatif se produisent principalement par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Elle comprend des altérations de macromolécules cellulaires tels que les lipides, les protéines et l'ADN ; mais les lipides sont probablement les plus sensibles (Vandana et al., 2006 ; Verma et al., 2007 ; Aly et al., 2010). L'un des principaux mécanismes des lésions est celui de la lipoperoxydation qui est l'oxydation de la couche lipidique de la membrane cellulaire. La destruction par oxydation des lipides (peroxydation lipidique) est une réaction en chaîne auto-entretenu destructrice ; elle libère le malonyldaldéhyde (MDA) en tant que produit final qui peut être mesuré par le test des substances réactives Thiobarbituriques (TBARS) (Jusman et Halim, 2009 ; Ahmad et al., 2010). La peroxydation des lipides peut également être mesurée indirectement chez les animaux en utilisant le test de la fragilité osmotique des érythrocytes (Chihuilaf et al., 2002).

Bien que l'inhibition du cholinestérase soit le principal mécanisme de la toxicité du CPF, des études récentes indiquent que l'exposition au CPF produit le stress oxydant par la génération des radicaux libres et induit la peroxydation lipidique dans les tissus des mammifères et des autres organismes ; ainsi cela perturbe le développement et la différenciation cellulaire normale. (Banerjee et al., 1999 ; Banerjee et al., 2001). Le chlorpyrifos a été rapporté pour induire le stress oxydatif dans le foie par des niveaux accrus des ROS, peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), nitrate (NO_3^-) et de nitrite (NO_2^-) (Mehta et al., 2009). Il s'agit notamment des radicaux peroxydes hydroxyles et peroxydes d'hydrogènes qui ciblent et inactivent les macromolécules biologiques endommageant éventuellement les membranes et d'autres tissus (Meister, 1998). Ces agressions biochimiques créent des lésions qui sont responsables du dysfonctionnement de la cellule qui se varie selon le niveau du stress. Si ces dommages irréparables, la cellule va subir une mort cellulaire sous la forme soit de l'apoptose (mort cellulaire programmée) soit d'une nécrose, en fonction de l'étendue des dommages (Cooke et al., 2003 ;Favier, 2003).

Les ROS interagissent avec toute une série de substrats biologiques dont les cibles les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et les acides désoxyriboses (halliwell et whiteman 2004 ; valko et al., 2006).

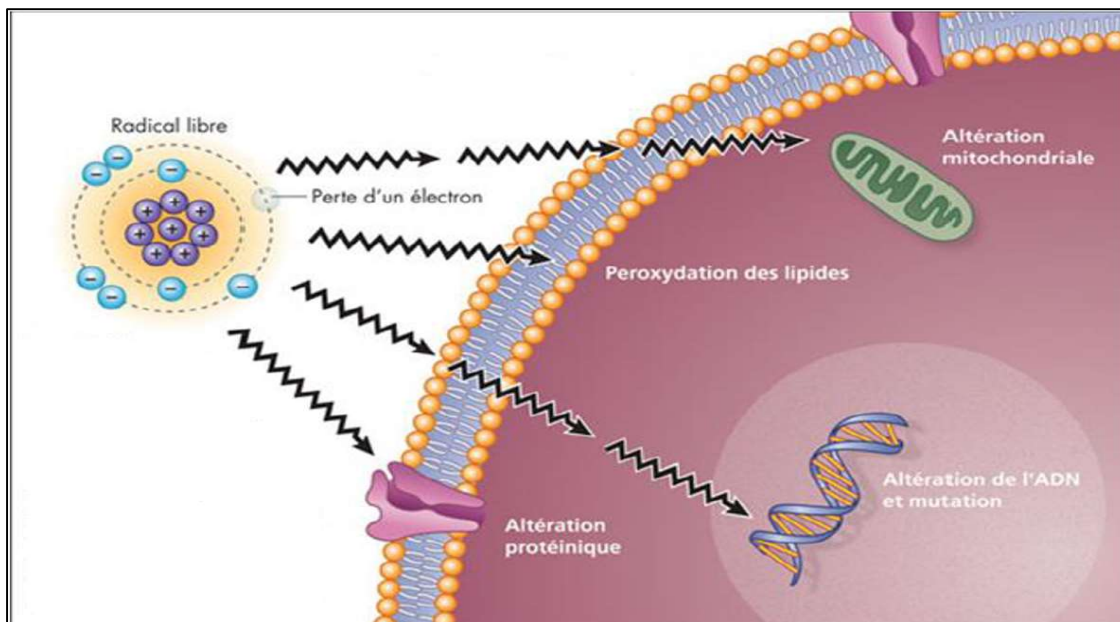


Fig. 02. Conséquences cellulaires du stress oxydant (Bonnet et al., 2010).

Les dommages oxydatifs portant sur les protéines peuvent prendre plusieurs formes et conduisent à des changements fonctionnels dans les différents types de protéines (enzymatiques et structuraux) ; ils peuvent avoir des effets physiologiques importants. De la même façon, la modulation oxydo-réductrice des facteurs de transcriptions provoque une augmentation ou une diminution de leurs activités de liaisons spécifiques à l'ADN ; modifiant ainsi l'expression des gènes (Singh et al., 2006, 2011). Les acides aminés notamment la cystéine et la méthionine contenant du soufre sont particulièrement sensibles à l'oxydation (Berlett et Stadtman, 1997). Ces modifications peuvent entraîner la perte de l'enzyme ou de la fonction de la protéine et l'accumulation des protéines dépliées ; cela peut altérer la fonction cellulaire en conduisant à l'UPR (Radak et al., 2001 ; Allison et Daniel, 2015).

L'ADN est une cible privilégiée pour les ROS. Au niveau de l'ADN, le stress oxydatif provoque de nombreuses modifications structurales (mutations, coupures, pontages covalents de protéines (Cooke et al., 2003). Un produit majeur des dommages oxydatifs de l'ADN est la 8-hydroxyguanine. Dans ce cas la guanine peut réagir avec $\text{OH}\cdot$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, elle s'associe avec l'adénine ; entraînant ainsi des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique qui s'implique dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Singh et al., 2006,2011 ; Atkin et al., 2005). Les modifications des bases par l'oxydation peuvent également provoquer des cassures doubles brin. Si les mécanismes de réparation d'ADN sont altérés ou

dépassés, ces produits peuvent entraîner des effets cellulaires indésirables y compris les mutations et la cytotoxicité (Niki et al., 2014).

I.2.3. Inflammation hépatique induite par le CPF

L'inflammation est la réponse naturelle du système immunitaire par rapport à une blessure ou une infection. Elle est initiée par l'activation des macrophages dans la périphérie et les microglies et / ou les astrocytes dans le système nerveux central (SNC), ce qui conduit à la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines. Ces composés dégagent la dilatation des vaisseaux sanguins afin de favoriser la migration des leucocytes neutrophiles, typiquement, dans la zone de la blessure. Les neutrophiles et les macrophages induisent l'apoptose des cibles cellulaires via la libération d'oxyde nitrique qui sont des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ; par la suite les macrophages éliminent les cellules cibles apoptotiques par phagocytose (Duffield, 2003).

La réponse inflammatoire joue un rôle crucial dans toutes les formes de maladies du foie qu'elles soient d'origine pathogène ou stérile. De même, le stress oxydatif et l'existence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tant dans les populations cellulaires parenchymateuses et non parenchymateuses. L'importance des ROS dans l'inflammation hépatique est non seulement liée à l'agent pathogène tué ou les effets biochimiques de base de l'exposition des cellules à ROS (Ros et al., 1995 ; Murray et al., 2011). En outre, les ROS ont une gamme de rôles clés y compris la signalisation d'oxydo-réduction et la capacité à modifier la structure des protéines (l'activation du capteur redox), d'inhiber la fonction enzymatique et de moduler la transcription (Dröge, 2002 ; Jaeschke, 2011).

La génération de ROS, le stress oxydatif et la réponse inflammatoire sont inextricablement liées dans toutes les principales causes de la pathologie du foie. Le stress oxydatif joue un rôle clé dans l'activation leucocytaire et leur recrutement au cours des lésions hépatiques ; il contribue également de manière significative à la signalisation intra et intercellulaires, à l'expression génique et à la production de cytokines. Différents médiateurs inflammatoires ont été prouvés ; ils peuvent agir en tant que cibles ou activateurs de factor nucléaire kB (NF-kB). Le NF- kB est impliqué dans la régulation des voies de signalisation et des réponses inflammatoires dans le foie (De Andrade et al., 2015).

Le CPF a été rapporté pour moduler les voies de signalisation de l'IL-6 et TNF α / NF-kB par régulation négative des gènes qui codent pour des molécules de signalisation dans ces voies. Il est intéressant de noter que l'intoxication aiguë par le CPF augmente à la fois l'expression de cytokines qui se propagent à la réponse inflammatoire (TNF, IL-1B et IL-6) et les molécules qui sont

généralement considérées comme anti-inflammatoire (IL-10 et SOCS3) (Banks et Lein, 2012 ;De Andrade et al., 2015).

Le N-Acétylcystéine (NAC) a été utilisé dans le traitement de divers troubles tels que l'intoxication, ischémie-reperfusion cardiaque (I / R), la broncho-pneumopathie obstructive chronique (BPCO), la bronchite, le VIH, les troubles psychiatriques et d'autres. Dans de nombreuses études, le NAC a été montré pour augmenter les niveaux de GSH et stimule l'activité de la GSH réductase (GR) (Arranz et al., 2008) ; dans les cellules hépatiques ayant à son tour des effets antioxydants dans ces cellules. Donc il augmente la capacité de protection des cellules hépatiques contre le stress oxydatif et l'inflammation (glükülekcı et al., 2004). De même, ils existe d'autres effets bénéfiques du NAC qui sont : (1) la réduction des liaisons disulfures des protéines, ce qui perturbe ses liens et change leurs structures ; cela peut expliquer son activité de blocage de TNF en réduisant l'affinité pour le récepteur (Hou et al., 2013); (2) la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Park et al., 2014); (3) une activité anti-néoplasique et anti-mutagène notamment le blocage du métabolisme électrophile qui est d'origine endogène ou exogène (Parasassi et al., 2005); (4) la modulation de l'expression génique et la transduction du signal de modulation du système immunitaire et la fonction mitochondriale (Samuni et al., 2013).

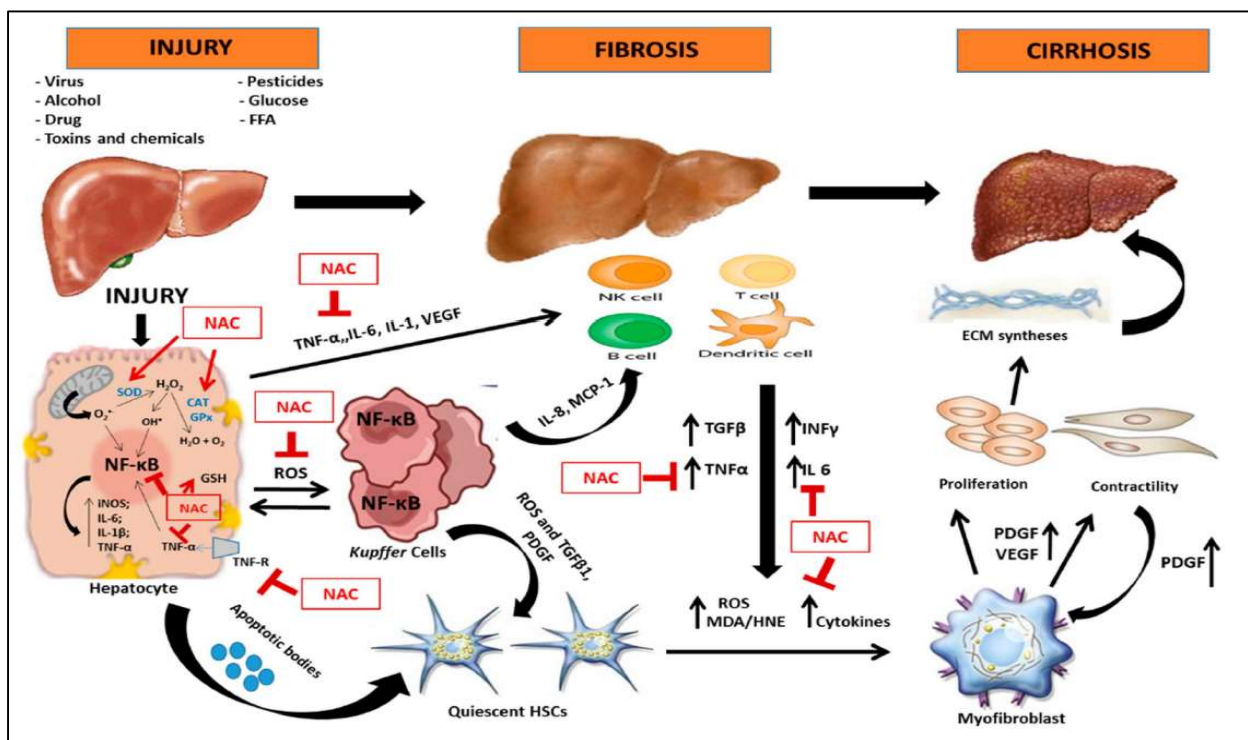


Fig. 03. Mécanisme moléculaire de l'action de N-Acétylcystéine (NAC) sur le stress oxydatif et l'inflammation (Cohen-Naftalyet Friedman, 2011).

I.3. La plante *Centaurea calcitrapa*

Avant d'aller plus loin dans notre développement qui considère que l'utilisation d'un extrait d'une plante peut améliorer les effets relatifs aux intoxications évoquées ci-avant, nous essayons dans cette même lucidité de situer le sujet accompagné de certaines définitions ; notre premier choix s'est porté sur la *centaurea calcitrapa*, une plante appartenant à une famille qui est caractérisée par des effets antioxydants.

Du mot grec centaurios = herbe du centaure chiron, auquel on attribuait la découverte des propriétés de ces plantes. Sa variation linguistique, dessine sur le vaste territoire algérien les sujets parlant avec des sources dialectales qui sont distants les uns des autres ; cela peut-il justifier une connaissance abondante de cette plante et de son utilisation ?



Fig. 04. La plante Centaurea calcitrapa (Ditomaso et al., 2013).

I.3.1. Description

La plante *Centaurea calcitrapa* est bisannuelle de 20 à 50 cm dressée, très rameuse, à rameaux divariques, glabrescents, feuilles radicales pennatipartites, les caulinaires rudes ponctuées pennatiséquées, à segment presque linéaire, à pointé subulée. L'involute de forme ovoïde, présente des bractées qui sont terminées chacun par une épine robuste et très piquante, portant à sa base quelques petites épines latérales ordinairement très courtes. Les fruits murs sont d'une teinte blanchâtre et parcourus par de petites lignes noires, il n'y a pas d'aigrettes. Les fleurs sont purpurines toutes égales.

Centaurea calcitrapa appartient au genre *Centaurea* qui fait partie de la famille des Asteraceae, une des plus grandes familles des dicotylédones. Cette famille est répandue dans le monde entier, mais

principalement dans les régions tempérées et elle est moins fréquente dans les forêts tropicales humides (Beloued, 2005). La place de la plante dans la systématique est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1. Classification scientifique classique de la plante ‘*Centaurea calcitrapa*’.

Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Division	Magnoliopsida
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèce	<i>Centaurea calcitrapa</i>
Nom arbre	Bounaggar
Nom commun	Chardon Etoile

I.3.2. Composition chimique et activités biologiques

Centaurea calcitrapa a fait l’objet de plusieurs travaux phytochimiques qui ont montré la présence de six lactones sesquiterpéniques ; deux entre elles sont dominantes et de type germacranolide. Il s’agit de la conicine et la sanlatenolide. Ces travaux ont également révélé la présence plus de 19 types de flavonoïdes (karamenderes et al, 2006).

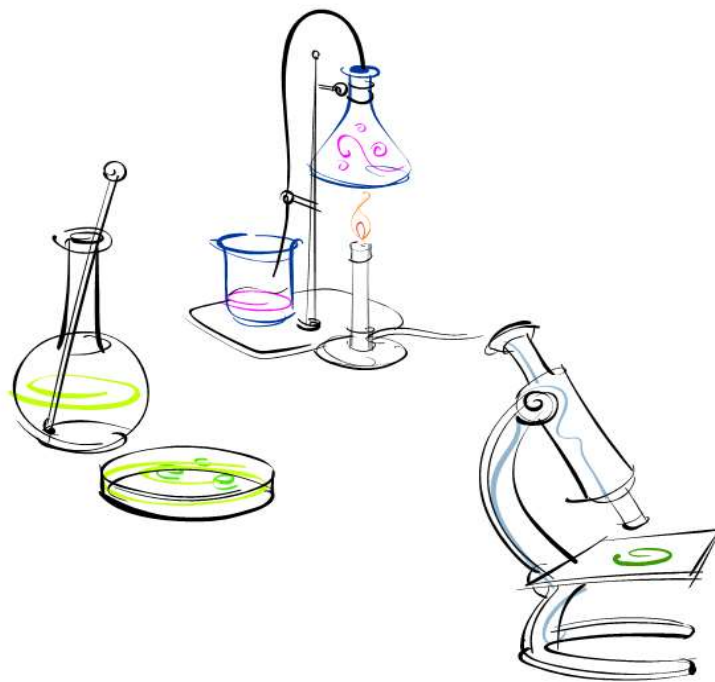
Dans la médecine traditionnelle, *centaurea calcitrapa* est utilisée fréquemment dans le traitement de la fièvre, comme diurétique (yayli et al, 2004). Par ailleurs, jusqu’à maintenant très peu d’études décrivent leurs propriétés biologiques importantes. Cependant, une étude récente a rapporté que *centaurea calcitrapa* possède vraiment des propriétés anti pyrétiques qui ont été déjà signalé par Ibn Bitar, le charbon étoilé est salutaire contre les fièvres anciennes (Yayli et al, 2004). Une autre étude a également montré ses propriétés anti oxydantes et cytotoxiques (Pieroni et al, 2002).

I.3. 3. Propriétés et usages

La chausse-trape est utilisée dans toutes ses parties. D’un gout amer, elle possède les mêmes propriétés que la partie centaurée et le chardon bénit. Les feuilles et les fleurs sont toniques et

fébrifuges (ses racines et ses graines comme diurétiques). La décoction des sommités fleuries et des feuilles, a raison de 60g par litre d'eau est indiquée contre les fièvres intermittentes. Prendre deux tasses de tisane par jour. La racine et les graines sont diurétiques et s'emploient utilement contre la gravelle et dans les cas de l'hydropisie (Beloued, 2005).

II. Matériel et méthodes



II.1. Analyses phytochimiques

II.1.1. Préparation des extraits

La partie aérienne de la plante *Centaurea calcitrapa* a été récoltée dans la région d'Ouled Bouzid (Willaya de Jijel) dans le mois d'août 2015. La plante a été nettoyée, séchée et stockée à l'abri de la lumière dans un endroit aéré ; puis broyée en poudre pour être prête à l'utilisation. En fait, trois extraits ont été réalisés : l'extrait méthanolique, éthanolique et celui chloroformique.

Les trois extraits de la partie aérienne de *Centaurea calcitrapa* ont été préparés à partir de 50g de poudre de la partie aérienne qui a été mise à macérer dans 500ml de méthanol, éthanol et chloroforme à température ambiante et à l'ombre pendant une semaine. Ensuite les solutions ont été filtrées sur filtre Wattman (3 mm) et soumises à une évaporation sous vide à sec dans un rotavapeur de type BÜCHI à 45°C. Les extraits obtenues ont été conservées à 4°C jusqu'à leurs utilisations.

Le rendement de la plante en extraits est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante à traiter (Carré, 1953). Le rendement qui est exprimé en pourcentage a été calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{P_E}{P_A} \times 100$$

Où

R= Rendement de l'extrait en pourcentage ;

P_E = Poids de l'extrait en gramme ;

P_A = Poids de la plante en gramme.

II.1.2. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes

Le contenu en polyphénols totaux des extraits méthanolique, éthanolique et chloroformique de *centaurea calcitrapa* est estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu qui est décrite par Othman et ses collaborateurs (2007). Cette technique est basée sur la réduction du réactif acide (réactif de folin) dans une solution alcaline ; c'est une réaction d'oxydo-réduction au cours de laquelle la fonction OH des phénols est oxydée pendant que FCR est réduit (Vuorela et al. 2005). Le FCR de couleur jaune vire au bleu en solution après la réaction avec les composés phénoliques totaux. Pour ce faire, un volume de 200 µl des solutions d'extraits (diluées à 1/10^{ème}) ont été ajoutées à 1,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (diluées à 1/10^{ème}). Après 1 min, 1,5 ml de carbonates de sodium (7 %) sont additionnés. Après agitation, le mélange a été laissé réagir 2 heures à température ambiante et dans l'obscurité, puis la lecture a été faite à 750 nm contre un blanc constitué de 200µl de l'ED + 1.5 ml de FCR + 1.5 ml de carbonate de sodium. Une solution mère de l'acide gallique à 100 µg/ml est le

standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits a été calculée. La teneur en polyphénols totaux est exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait brut (mg EAG/g d'extrait brut).

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans nos extraits méthanolique, éthanolique et chloroformique de *centaurea calcitrapa* a été réalisée selon la méthode de l'AlCl₃ décrite par Djeridane et ses collaborateurs (2006). Le principe de ce dosage repose sur la propriété de ces composés à chélater les ions aluminium. La couleur jaune obtenue est le résultat de formation du complexe entre AlCl₃ et les flavonoïdes ; cette couleur est traduite par le fait que l'aluminium a perdu deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène des molécules phénoliques agissant comme donneur d'électron (Gayon, 1968) dont l'intensité de la couleur varie en fonction de la concentration des flavonoïdes de chaque extrait de la plante. Pour ce faire, un volume de 0.5 ml de chaque extrait a été ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl₃ (2%). Les différentes solutions ont été laissées réagir à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. La lecture a été faite à 430 nm contre un blanc qui se constitue d'un mélange de 1 ml d'eau distillée et 1 ml de AlCl₃ à 2%. La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalents de la quercétine par gramme de l'extrait brut (mg EQ/g d'extrait brut).

II.1.3. Mesure de l'activité anti-radicalaire par le test de DPPH

L'effet scavenger des extraits méthanolique, éthanolique et chloroformique de *centaurea calcitrapa* vis-à-vis du radical 2, 2'-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) est évalué selon la méthode décrite par Sarikurkar et ses collaborateurs (2009). Un volume de 3 ml de la solution de DPPH (6 X 10⁻⁵M) préparé dans le méthanol est mélangé avec 0,5 ml des solutions des trois extraits à différentes concentrations (50, 100, 200, 400 µg/ml) qui sont préparées dans l'éthanol. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été lue à 517 nm. Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire a été calculé selon l'équation suivante :

$$I (\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100.$$

A₀ : c'est l'absorbance du contrôle.

A₁ : c'est l'absorbance des extraits / standard.

II.1.4. Mesure de l'activité de chélation du fer

L'activité de chélation des ions du Fe^{2+} a été étudiée comme il est démontré par Denis et ses collaborateurs (1994). Initialement, 500 μl de l'extrait a été ajouté à 100 μl de FeCl_2 (2 mM). La réaction a été commencée en ajoutant 200 μl de ferrozine 5mM. Le volume total a été ajusté à 2 ml avec méthanol. Après incubation de 10 min à température ambiante, l'absorbance à 562 nm a été enregistrée. L'EDTA a été utilisé comme un agent de chélation standard et les résultats ont été exprimés comme mg EDTA équivalents /g extrait.

II.2. Etude *in vivo* de l'effet de l'extrait chloroformique de la plante sur la hépto-toxicité

La solution de CPF est élaborée à partir de la forme commerciale Dursban, (Cheminova, 480g de matière active par litre, Lemvig, Danemark) ; elle a été diluée dans l'huile de Maïs. La solution de N-acétylcystéine a été préparée à partir de la forme commerciale EXOMUC 200 mg. Quant à elle, elle a été diluée dans l'eau distillée.

II.2.1. Entretien des animaux

42 souris Swiss Albinos femelles, pesant environ 38 g et fournies par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie) ont été utilisées dans cette étude. Elles sont maintenues dans des cages en plastique, à une température ambiante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, avec accès libre à la nourriture et à l'eau.

Les souris ont reçu un volume de 7 ml/kg de chaque solution administrée.

- 1) Lot T : les souris du lot témoin reçoivent du véhicule (L'huile de maïs) (Dose unique).
- 2) Lot CPF : les souris du lot reçoivent du CPF (40mg/Kg) (Dose unique).
- 3) Lot EC : les souris du lot reçoivent de l'extrait de chloroforme (EC) (500mg/kg) (Dose unique).
- 4) Lot NAC : les souris du lot reçoivent du NAC (500mg/kg) (Dose unique).
- 5) Lot CPF + EC : les souris du lot reçoivent du CPF ensuite 30 minutes plus tard administrer par voie orale de l'extrait (Dose unique).
- 6) Lot EC + CPF : les souris du lot reçoivent de l'extrait ensuite 30 minutes plus tard administrer par voie orale du CPF (Dose unique).
- 7) Lot CPF + NAC : les souris du lot reçoivent du CPF ensuite 30 minutes plus tard administrer par voie orale du NAC (Dose unique).

En fait, les souris sont euthanasiées après 24h ; puis on passe rapidement à la dissection et au prélèvement des organes. Le prélèvement sanguin a été réalisé par ponction cardiaque. Le sang a été

collecté dans des tubes héparinés puis centrifugé (centrifugeuse sigma 3-16PK) à 3000 rpm pendant 10 minutes pour récupérer le plasma.

II.2.2. Analyses microscopiques

Les tissus du foie ont été coupés longitudinalement. Puis, ils sont lavés par l'eau physiologique. Immédiatement, ils ont été fixés par immersion du foie dans un volume de liquide fixateur qui est le formol, et cela à 30 %. Le remplacement de l'eau par la paraffine n'est pas directement possible ; donc afin d'éliminer le fixateur, une étape de déshydratation a été réalisée. D'abord, les tissus ont été passés dans des bains d'alcool à degré croissant (70° - 95° - 100°). Après, l'alcool a été remplacé par du xylène.

Les tissus ont été imprégnés de paraffine fondue afin de les rigidifier, et cela pour pouvoir les couper ensuite. Le refroidissement de cette paraffine amène sa solidification en un bloc de paraffine qui est prêt à être coupé. Les coupes du bloc de paraffines réalisées avec le microtome permettent d'obtenir des tranches de section (coupes histologiques) de 2 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes ont été recueillies par la suite sur des lames de verre. Une étape de déparaffinage a été ensuite réalisée pour assurer la réhydratation des coupes pour pouvoir les colorer.

La coloration a été réalisée sur lames en accentuant les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. Afin de distinguer les différents tissus, nous avons eu recours à deux colorants : l'hématoxyline et l'éosine.

II.2.3. Préparation de la fraction cytosolique

Après la dissection, le foie de chaque souris est rapidement prélevés et bien rincé avec l'eau physiologique froide puis séché sur le papier buvard pour les débarrasser du sang ; après il est congelés (-20°C).

Une quantité de 0.15g de chaque organe est coupé en petits morceaux qui sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de daunce dans un tampon phosphate (Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 50 mM, EDTA 2mM, ph 7.2). L'homogénat obtenu est centrifugé (centrifugeuse sigma 3-16PK) à 9000g/minute pendant 20 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite, le surnageant est récupéré dans des eppendorf et stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation pour les dosages tissulaires (GSH, MDA, CAT et GST).

II.2.4. Mesure de la peroxydation lipidique (MDA)

Le malonyldialdéhyde (MDA) est le marqueur le plus utilisé de la peroxydation lipidique du fait de la simplicité et de la sensibilité de la technique. Ce dosage est réalisé selon la méthode d'wright et ses collaborateurs (1981). Par un traitement acide à chaud 100°C ; les aldéhydes réagissent avec l'acide Thiobarbiturique (TBA) pour former ainsi un produit de condensation chromogénique consistant en deux molécules de TBA et une molécule de MDA. L'absorption intense de ce chromogène se fait à 535nm. 0.5ml de TCA + 0.5ml de TBA 0.375% (préparés dans l' HCl à 0.25 M) sont additionnés à 0.5 ml de surnageant récupéré. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 20 minutes puis refroidi dans un bain de glace. La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nmol du MDA formé/g de tissu ; cela en utilisant le coefficient d'extinction du MDA : $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.2.5. Dosage du GSH

Le dosage du GSH est réalisé par la méthode colorimétrique d'Ellman (1959) dont le principe repose sur les propriétés réductrices des groupements thiols (SH). En présence des groupements SH de l'échantillon, le pont disulfure (SS), qui est contenu dans le réactif d'ELLMAN ou DTNB (5-5' dithionitrobenzoic acid), va être réduit et donne ainsi des dérivés thiols aromatiques colorés (TNB : thionitrobenzoïque). Pour la réalisation du dosage, 50 µl du surnageant a été dilué dans 10 ml du tampon phosphate ($\text{Na}^2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M, pH=8). Et 20µl de DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange. Après 20 min d'incubation à l'obscurité pour la stabilisation de la couleur, la lecture de la densité optique a été effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions qu'avec le tampon phosphate. Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon du GSH préparé dans les mêmes conditions que le dosage, les concentrations sont exprimées en µmol de GSH/g de foie selon l'équation suivant :

$$[\text{GSH}] = \frac{(a \times DO + b) \times 10^6}{0.005 \text{g} \times 10^3}$$

II.2.6. Mesure de l'activité de la catalase (CAT)

L'activité de la catalase a été déterminée par la méthode d'Aebi et ces collaborateurs (1984) ; son principe est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de la source enzymatique à 25° C. Cette activité enzymatique est mesurée par l'analyse spectrophotométrique du taux de décomposition du peroxyde d'hydrogène. Le milieu réactionnel contient 50 µL de la fraction cytosolique et 925 µL de tampon phosphate de potassium $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (50Mm, Ph 7,0). La

réaction a été déclenchée par l'addition de 1ml de H₂O₂. Et la lecture de l'absorbance a été effectuée à 240 nm, après 1 minute et 3 minutes de l'addition de H₂O₂. L'activité enzymatique est exprimée en UI/g de protéine selon la relation suivante :

$$\text{UI/mg de protéine} = \left(\frac{2.3033}{T} \times \log \frac{A_1}{A_2} \times \frac{1}{\text{mg}} \right)$$

A1: Absorbance au temps 0 min ; A2: Absorbance après 1 min ; T : Intervalle du temps en minutes .

II.2.7. Mesure de l'activité de glutathion-s-transférase (GST)

L'activité de la GST a été déterminée selon la méthode de Habig et ses collaborateurs (1974). Le substrat utilisé est le 1-chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB) préparé dans l'éthanol 95° ; l'enzyme a besoin d'un second substrat pour être active. Il a été additionné sous forme de glutathion. L'enzyme permet le transfert du glutathion riche en électrons sur le CDNB chargé positivement par gain d'un proton. Un mélange de 850 µl du tampon phosphate (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M, pH 6.5) et de 50 µl de CDNB 20 mM (dissoudre dans l'éthanol 95°) a été incubé à 37°C pendant 10 min. la réaction est déclenchée par l'addition à ce mélange de 50 µl d'une solution de GSH 20 mM et 50 µl de la fraction cytosolique. Un contrôle a été préparé dans les mêmes conditions qu'avec le tampon phosphate. L'absorbance a été suivie pendant 5 minutes à 340 nm. L'activité de glutathion S transférase est exprimée en UI/ml d'enzyme, en utilisant le coefficient d'extinction (9.6 X 10³ M⁻¹ cm⁻¹). Selon la réaction suivante :

$$[\] \text{ nmol/mg detissus} = \frac{\Delta m \times DO / \text{mintest} \times Vt}{Vech \times \varepsilon \times [\] \text{ protiene}} .$$

Sachant que : Δ abs 340nm/ min test : différence de l'absorbance ; Vt : volume totale de cuvette par ml, Vech : volume de la fraction cytosolique ajoutée par ml ; ε : 9.6 X 10³ M⁻¹ cm⁻¹.

II.2.8. Dosage des Protéines totaux

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) ; la lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre visible (JENWAY 6300). La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une protéine standard, l'albumine sérum de bœuf (BSA).

II.2.9. Analyse des paramètres biochimiques

La détermination cinétique de l'activité de PAL a été effectuée avec le kit commercial Bio Maghreb selon la méthode recommandée par la société allemande de chimie clinique (DGKG) PAL. Dans un tube à hémolyse, nous avons introduit 20µl du plasma avec 1 ml du réactif du dosage. Le mélange a été incubé 5 min à 37°C. Puis la lecture des absorptions des échantillons a été effectuée à 405 nm.

Le pyruvate formé dans la première réaction est réduit en présence de lactate déshydrogénase et NADH. L'activité d'ALT est déterminée en mesurant le taux d'oxydation de NADH à 340 nm. Le pyruvate est converti au lactate par LDH durant la phase de latence avant la mesure. Le dosage est réalisé par le biais du kit BioMaghreb ; le réactif contient : L-Alanine (500 mmol/L), LDH (>1200 U/L), tampon Tris, pH 7.5 (100mmol/L), 2-Oxoglutarate (15mmol/L), NADH (0.18mmol/L). 1mL du réactif en effet est incubé à 37°C pour au moins 5 minutes. Le spectrophotomètre est réglé à 340 nm. 0,1mL du sérum est ajouté, puis mélangé doucement, et ensuite transféré dans une cuvette. L'absorbance est lue et enregistrée à la 1ère minute. Continuant l'incubation à 37°C puis enregistrant l'absorbance de nouveau aux 2èmes et 3èmes minute. L'absorbance moyenne est déterminée par minute ($\Delta A/\text{min}$), multipliée par le facteur 1768 ; les résultats sont en U/L.

En milieu alcalin, les protéines donnent une couleur bleue violette en présence de sels de cuivre ; ces sels contiennent de l'iodure qui agit comme un antioxydant. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon testé.

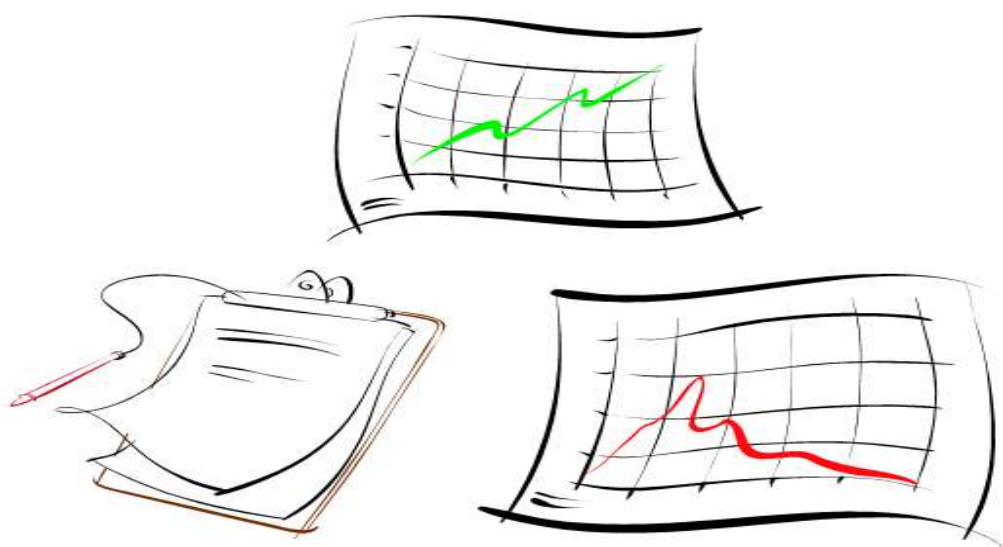
Le dosage des protéines sériques a été effectué avec le kit commercial SPINREACT selon la méthode citée par (Biuret., 1878). En effet, 20 μl du sérum ont été ajoutés à 1 ml du réactif SPINREACT. Le mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante. Puis la lecture des absorbances des échantillons a été effectuée à 546 nm, en comparaison avec le blanc réactif.

II.2.10. Evaluation statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart type. Ces résultats ont été traités statistiquement à l'aide du logiciel Excel 2010 par l'analyse du test de student.

NS : Différence non significative, $P > 0.05$, (T) : témoin, (*) : $P < 0.05$, (**) : $P < 0.01$, (***) : $P < 0.001$.

III. Résultats et discussion



III.1. Caractérisation et évaluation des activités anti-oxydantes *in vitro* des différents extraits

De nombreuses espèces du genre *Centaurea* de la famille *Asteraceae* sont traditionnellement utilisées à des fins médicinales. Les espèces de ce genre sont intéressantes pour la diversité de leur composition chimique et leur activité biologique. En effet, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires caractéristiques de la famille des *Asteraceae* (*Bicha et al., 2013*). Les phénols de la plante sont d'intérêt parce qu'ils constituent un groupe important d'antioxydants naturels. Toutefois, dans le but de caractériser les extraits qui sont préparés à partir de *centaurea calcitrapa*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué.

Le rendement de chaque extrait avec son aspect ainsi que la couleur qu'il peut avoir sont présentés dans le Tableau 2. Il est à noter que le rendement est calculé par rapport au poids total de la poudre de *centaurea calcitrapa*. En fait, l'extrait chloroformique a donné un rendement de 37.94%. Quant au rendement de l'extrait méthanolique, il est de 5.6%. Enfin, celui de l'extrait éthanolique qui est de 3.06%. Ces deux derniers résultats sont plus faibles que celui de l'extrait chloroformique. Il est à supposer que la différence de rendement entre les trois extraits est due à la méthode d'extraction ou à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre.

Tableau 2. Rendement d'extraction et propriétés des différents extraits.

Type d'extrait	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Extrait EE	Visqueux	Vert militaire	3.06
Extrait EM	Visqueux	Marron jaune	5.6
Extrait EC	Solide	Marron foncé	37.94

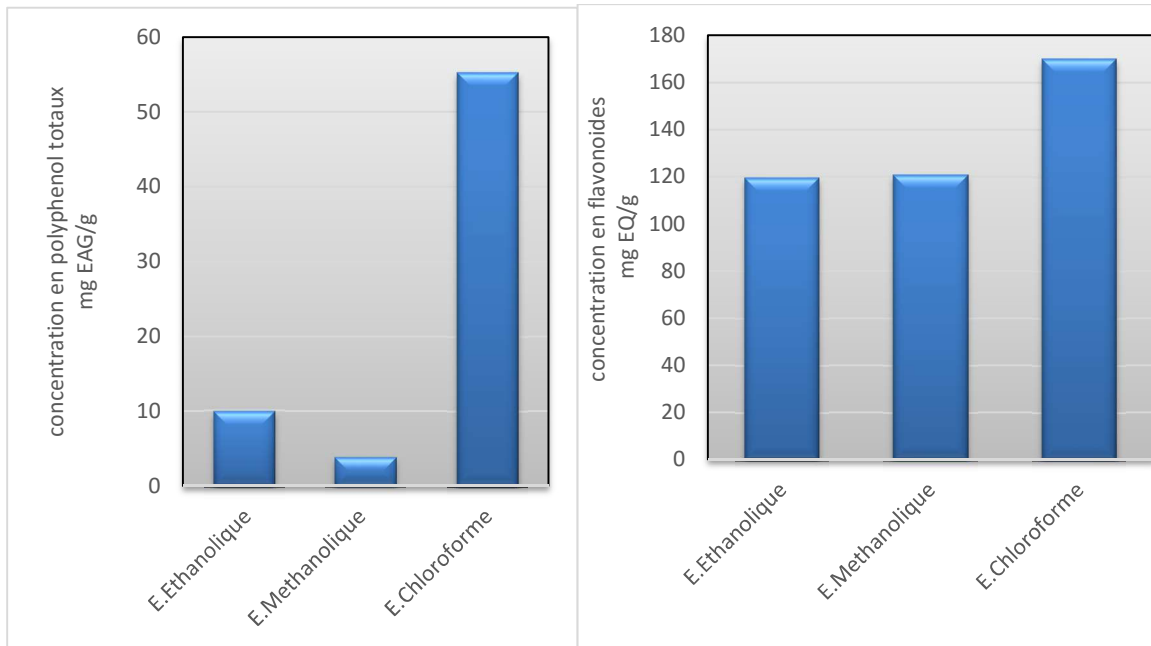


Fig. 05. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes dans les trois extraits bruts de la plante *centaurea calcitrapa*.

Par ailleurs, le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode au bleu de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard et la teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g) (Graham, 1992).

La teneur en flavonoïdes a été en effet déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) en utilisant comme standard la quercétine ; elle est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g) (Bahorum *et al.*, 1996). En fait elle dépend de la formation d'un complexe doué d'une forte absorbance à la longueur d'onde 430nm.

D'une façon générale, les résultats indiquent une quantité plus élevée des flavonoïdes que celle de polyphénols dans les trois extraits de *centaurea calcitrapa*. Cependant l'extrait chloroformique comporte une plus grande teneur en polyphénols ($55.25 \pm 11,14$ mg EAG/g) que l'extrait méthanolique ($3.83 \pm 0,91$ mg EAG/g) et l'extrait éthanolique ($9.92 \pm 5,50$ mg EAG/g) ; ainsi pour les flavonoïdes, l'extrait chloroformique présente des teneurs ($170.1 \pm 41,40$ mg EQ/g) plus élevées que l'extrait méthanolique ($120.6 \pm 4,31$ mg EQ/g) et éthanolique ($119.5 \pm 5,48$ mg EQ/g) voir (Figure 05).

Pour évaluer le pouvoir antioxydant de la plante de *centaurea calcitrapa*, nous avons mesuré la capacité de piégeage des radicaux libres in vitro en déterminant le pourcentage de réduction du DPPH, qui est un radical libre stable.

Tableau 03. IC₅₀ des différents extraits et standard

TYPE D'EXTRAIT	IC ₅₀ (µG/ML)
EXTRAIT EM	635.25
EXTRAIT EE	728.57
EXTRAIT EC	766.38
ACIDE ASCORBIQUE	477.07

L'IC₅₀ un paramètre qui est utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Ainsi, plus cette concentration est faible, plus l'effet antioxydant est très élevé (Brand-Williams et al., 1995 ; Tsimogiannis et Oreopoulou, 2004 ; Atoui et al., 2005). Nous constatons que l'extrait méthanolique possède l'effet scavenger le plus puissant parmi les trois extraits ; cela avec une valeur de IC₅₀ = 635.25 ± 149µg/ ml. Il est suivi par l'extrait éthanolique avec une valeur de IC₅₀ = 728.57 ± 118µg / ml. Et enfin l'extrait chloroformique qui est le plus faible avec une valeur de IC₅₀ = 766.38 ± 133µg/ml. Comparant avec l'acide ascorbique, les extraits (E.M, E.E et E.Ch) ont un effet scavenger inférieur de 1.33, 1.52 et 1.60 fois respectivement.

Dans cette étude, le pouvoir antioxydant des 3 extraits a été mesuré in vitro par le test de l'activité anti-radicalaire de DPPH. Nos résultats montrent en effet que les trois extraits ainsi étudiés ont un potentiel antioxydant. Cependant, l'extrait méthanolique de *centaurea calcitrapa* possède une activité anti-radicalaire trop élevée comparée à l'extrait éthanolique et celui chloroformique. Les processus oxydatifs sont multiples et la nature de l'activité antioxydante peut être multiforme ; elle est attribuée à différents mécanismes tels que le piégeage des radicaux libres, la chélation des ions métalliques de transition, la prévention de l'initiation d'une chaîne de réactions productrice des ERO et la décomposition des peroxydes (Ozen, 2009). Par conséquent, la combinaison de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits (Ksouriet al., 2009).

La cystéine, le glutathion, l'acide ascorbique, tocophérol et les amines aromatiques réduisent et décolorent le DPPH par leurs capacité de donné l'hydrogène. Une étude réalisé par Erol-dayi et al, 2011 consiste à déterminée la composition phénolique total et l'activité antioxydante et cytotoxique des extraits de trois espèces de la famille *centaurea* (*c. calcitrapa*, *c. potosimopappa* et *c. spicata*). Leurs résultats montrent que, l'extrait méthanolique de ces trois espèces de *centaurea* possède une activité anti-radicalaire de DPPH plus élevé par rapport à celle de l'extrait aqueux. Dans cette étude, il paraît que ces trois espèces de *centaurea* ont plusieurs composants qui possèdent le pouvoir donneur de l'hydrogène et qui peuvent agissent comme un antioxydant. De plus, ils ont montrés que, les différences entre l'activité scavenger de radical DPPH peuvent être dues à la composition différente des extraits.

La chélation de fer est une méthode pour lutter contre le stress oxydant. Ces molécules se présentent chez les plante et s'expriment en degrés différent plus le % de chélation est élevé plus l'activité anti oxydante est augmenté.

Tableau 04. Comparaison de la chélation du fer ferreux des trois extraits de *centaurea calcitrapa*. Comparé avec EDTA à 100 µg/ml.

Types d'extrait	Effet chélateur du fer ferreux 100 µg/ml
Extrait EM	26.04 %
Extrait EE	19.91 %
Extrait EC	13.35 %
Acide ascorbique	79.75 %

Les résultats montrent que les extraits de *centaurea calcitrapa* exercent un effet chélateur (Tableau 04). Des effets chélateurs de 26.04%, 19.91% et 13.35% sont atteints par les extraits méthanolique, éthanolique et chloroformique à des concentrations de 100 µg/ml. L'EDTA exerce un effet chélateur de 79.75% à une concentration de 100 µg/ml. Les différences entre les 3 extraits (méthanolique, éthanolique et chloroformique) et l'EDTA sont statistiquement significatives (p < 0,05).

Parmi les espèces d'ions métalliques, les ions Fe^{2+} sont les pro-oxydants les plus puissants à cause de leur réactivité élevée (Gulcin*et al.*, 2010). Ils catalysent la décomposition des hydroperoxydes en radicaux alkoxy et peroxy, amplifiant la peroxydation des lipides (Pincemaile*et al.*, 1999). Ainsi, les chélateurs efficaces des ions ferreux peuvent fournir une protection contre le dommage oxydatif par la chélation de ces ions (Gulcin*et al.*, 2010). Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment des liaisons σ avec le métal agissent comme des antioxydants secondaires qui réduisent le potentiel redox des ions métalliques et par conséquent stabilisent leur forme oxydée (Gulcin*et al.*, 2005). La chélation du fer ferreux par les extraits méthanolique, éthanolique et chloroformique de *centaurea calcitrapa* a été évaluée dans cette étude par la méthode de la ferrosine. Cette dernière forme un complexe avec les ions Fe^{2+} libres. En fait, la réaction est affectée à la fois par les constantes de formation des deux complexes : antioxydant- Fe^{2+} et ferrosine- Fe^{2+} et donc par la compétition entre les deux chélateurs. Ainsi, un faible pouvoir chélateur sera sérieusement sous-estimé lors d'une détermination quantitative. Néanmoins, cette réaction sert d'essai convenable pour la détermination de l'activité chélatrice d'un agent antioxydant (Le *et al.*, 2007).

Dans la présente étude, Les résultats ont révélé une corrélation modérément faible entre le contenu des polyphénols totaux et l'activité antioxydant des extraits étudiés. Quelques auteurs ont démontré que cette activité antioxydante n'était pas uniquement dépendante de contenu des polyphénols mais ce peut être dû à d'autres phytoconstituants comme les triterpénoïdes ou à un effet combiné entre eux. Différents types de composés phénoliques ont une activité antioxydante différente qui dépend principalement de leur structure chimique.

III.2. Mise en évidence de la toxicité hépatique induite par CPF et de l'effet protecteur curatif et préventif de l'EC chez la Souris

Le foie est la cible de diverses agressions : alcool, alimentation trop grasse, toxiques et pesticides... etc. Chacune de ces causes suit son propre processus métabolique, est transformée et au final va endommager le foie. Ceci peut mener à une inflammation et une destruction des cellules hépatiques. La présente étude a été réalisée pour évaluer l'effet antioxydant de l'extrait chloroformique de *centaurea calcitrapa* sur les paramètres du stress oxydant et l'état de fonctionnement du foie ainsi que les dommages qu'il peut provoquer au niveau du foie suite à une intoxication aiguë provoquée par le CPF.

III.2.1. Paramètre non enzymatique

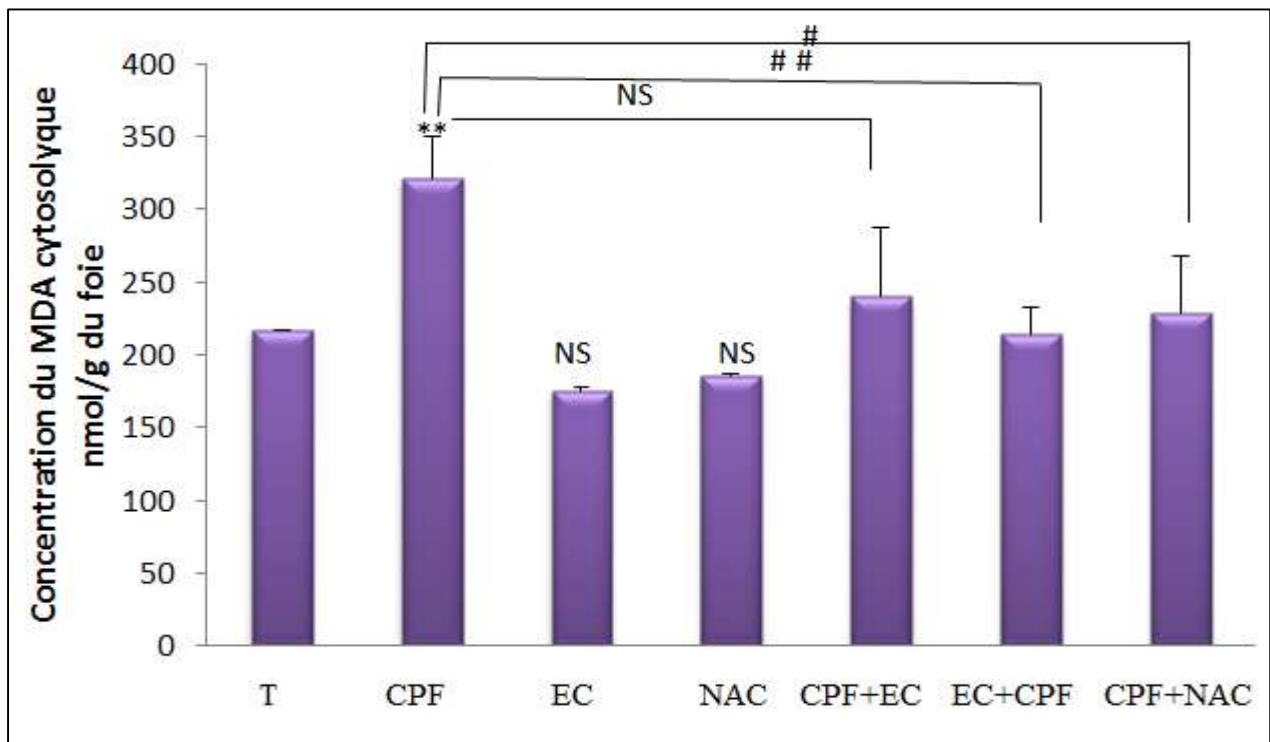


Fig. 06. Effet du CPF sur le taux cytosoliques du MDA dans les tissus hépatique des souris traitées par l'extrait et non traitées. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique. $p < 0,05$: résultat significatif (*), $p < 0,01$: très significatif (**), $p > 0,05$: non significatif (NS). (*) : relatif au témoin ; (#) : relatif au CPF.

Selon les résultats obtenus, chez les souris traitées par le CPF seul, nous avons constaté un taux du MDA élevé d'une façon très significatif, par rapport aux souris non traitées. Alors que, nous avons enregistré une réduction non significative du taux du MDA dans les groupes des souris traitées par l'EC et ceux traitées par le NAC, par rapport aux souris non traitées. Une diminution non significative du taux du MDA a été enregistrée aussi dans le groupe des souris recevant l'EC après l'administration du CPF et très significative dans le groupe des souris recevant l'EC avant l'administration du CPF et ceux recevant le CPF suivie du NAC voir (figure 06).

Les organophosphorés provoquent une augmentation de la peroxydation des lipides. les dommages membranaires résultant de la peroxydation des lipides peuvent conduire à la perte de l'homéostasie cellulaire en raison de changements dans les caractéristiques des membranes (Trachootham et al., 2009). Le MDA est un produit d'oxydation majeur des acides gras polyinsaturés et il est considéré comme étant un indicateur important de la peroxydation lipidique. Notre étude a montré que le contenu en MDA a augmenté de manière très significative dans le foie de souris traitées par le CPF. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études qui ont mis en évidence une augmentation de

la peroxydation lipidique après traitement par les pesticides (Kehrer, 1993 ; Ahmed et al., 2000). Certains auteurs ont pu démontrer une augmentation de la peroxydation lipidique dans les cellules érythrocytaires et le liquide plasmatique, suite à une exposition au CPF. La toxicité engendrée par ce pesticide s'exerce notamment via sa biotransformation dans le foie par les monooxygénases à cytochrome P450 en des dérivés hautement réactifs causant un stress oxydant qui est très élevée chez des souris traitées par le CPF par rapport aux témoins (Ahmed et al., 2000 ; Kurutas et al., 2006). Le MDA formé est considéré mutagène et cancérigène, et peut réagir avec les bases d'ADN G, A et C pour former des adduits M1G, M1A et M1C, respectivement (Marnett, 1999).

En revanche, la diminution des taux de MDA dans les groupes des souris recevant l'extrait chloroformique de *centaurea calcitrapa* avant et après l'administration du CPF et le groupe des souris recevant le NAC, prouve l'effet de la plante ainsi de NAC sur la toxicité hépatique. Cet effet hépato protecteur est peut-être dû à la captation des molécules du MDA par les principes actifs de *centaurea calcitrapa* ou bien à l'inhibition des réactions en chaînes de la peroxydation lipidique au niveau cytosolique. Une première étude décrite par Erol-dayi et al, 2011 a été rapportée sur les activités anti-oxydantes et cytotoxiques des extraits bruts méthanoliques et aqueux des trois espèces *Centaurea*. Les résultats présentés dans cette étude indiquent que les trois espèces *Centaurea* ont une activité antioxydante, en piégeant les radicaux libres, et en inhibant la peroxydation lipidique.

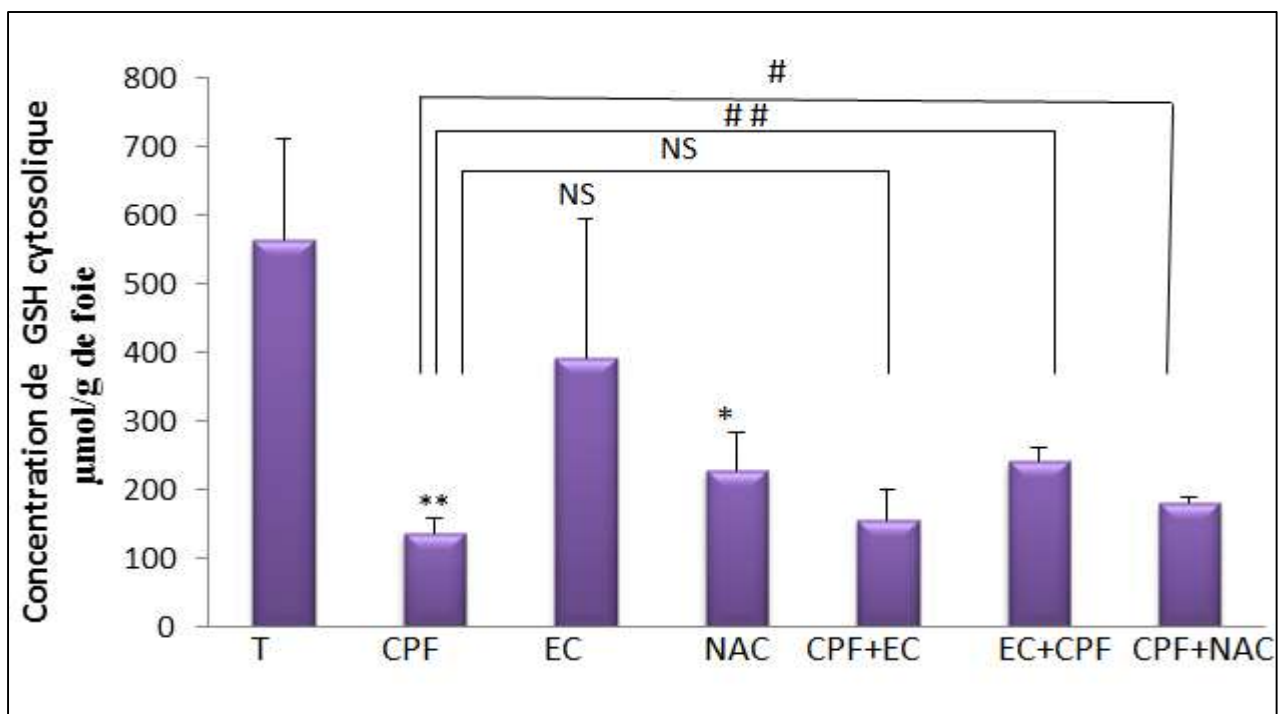


Fig. 07. Effet du CPF sur les taux cytosoliques de GSH dans les tissus hépatiques des souris traitées par l'extrait et non traitées. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique. $p < 0,05$: résultat significatif (*), $p < 0,01$: résultat très significatif (**), $p > 0,05$: non significatif (NS). (*) : relatif au témoin ; (#) : relatif au CPF.

Le taux de GSH a été mesuré, les résultats que nous avons obtenus ont montré une diminution très significative du taux du GSH chez les souris qui ont été traitées avec le CPF seul par rapport au témoin. On revanche, le taux du GSH hépatique a été augmenté de façon très significatif, significatif et non significatif respectivement chez les souris des lots EC+CPF, CPF+NAC et CPF+EC par rapport au souris recevant le CPF seul. En outre, une augmentation significative du taux de GSH a été enregistrée chez les souris recevant l'EC avant l'administration du CPF par rapport aux souris recevant l'EC après l'administration du CPF (voir la Figure 07).

Le glutathion réduit (GSH) joue un rôle multifactoriel dans le mécanisme de défense antioxydant. C'est un piègeur direct des radicaux libres, un co-substrat nécessaire pour l'activité GPx et la GST et participe dans la régénération de la vitamine E oxydée (Dominguez et al., 1998 ; Ravi et al., 2004). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Par conséquent, les changements dans l'état redox du GSH peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement sensible du stress oxydant (Taleb-Senouci et al., 2009). Dans la présente étude, une diminution significative de la GSH a été marquée dans le foie en raison de son interaction dans le processus de détoxification des métabolites actifs résultants de l'exposition au CPF. Le glutathion réduit (GSH) est alors transformé en sa forme oxydée, ceci entraîne la consommation du GSH et la diminution significative de son niveau hépatique.

Le N-acétyl-L-cystéine (NAC) est connu comme un antioxydant agit directement et / ou par augmentation de GSH intracellulaire, en particulier sur les tissus du foie (Ribeiro et al., 20011). Le NAC a un état redox thiol optimal, qui est d'une grande importance pour optimiser la capacité de protection de la cellule pour contrôler la balance de stress oxydatif et de l'inflammation (Kerksick et Willoughby, 2005). Une augmentation des taux du GSH a été enregistrée après le traitement des souris exposée au CPF par l'EC et le NAC suggère que, ces deux derniers ont un effet sur la régénération du GSH hépatique. Ainsi que, le traitement des souris par l'EC avant leurs expositions au toxique nous a donné un effet significatif mieux que le traitement par l'EC après l'exposition au toxique.

III.2.2. Paramètre enzymatique

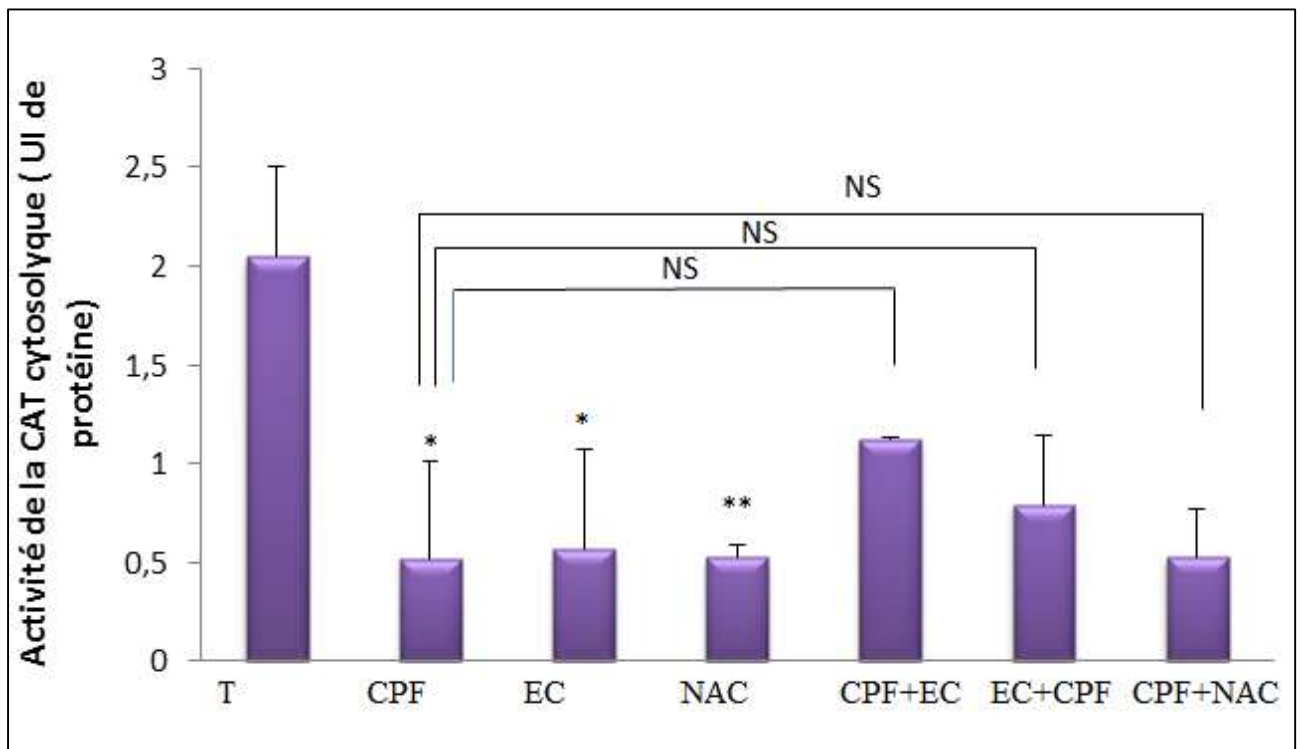


Fig. 08. Effet du CPF sur l'activité cytosolique de CAT dans les tissus hépatique des souris traitées par l'extrait et non traitées. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique : $p < 0,05$: résultat significatif (*), $p < 0,01$: résultat très significatif (**), $p > 0,05$: non significatif (NS). (*) : relatif au témoin ; (#) : relatif au CPF.

Cependant, les résultats présentés dans (la Figure 08) montre que, l'activité de la catalase cytosolique a significativement diminuée ($p < 0.05$) chez les souris recevant le CPF par rapporte aux souris non traitées. Par ailleurs, une diminution significative de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique a été enregistrée chez les souris traitées par l'EC, ainsi qu'une diminution très significative a été enregistrée chez les souris traitées par le NAC par rapport au groupe des souris non traitées. En outre, l'activité de la catalase est augmentée d'une façon non significative chez les souris traitées par l'EC avant et après traitement par le CPF et chez les souris recevant du CPF suivie de NAC par rapport aux souris traitées par le CPF seul.

Permis les systèmes antioxydants enzymatiques, la catalase, est spécialisée dans la détoxification de peroxyde d'hydrogène par sa transformation en oxygène et une molécule d'eau (Subat et al, 2007), aussi joue un rôle dans la défense contre les dommages oxydatifs cellulaires comme piègeur des radicaux libres (Gutteridge, 1995). La production excessive et l'accumulation de ces espèces réactives de l'oxygène pourraient expliquer les effets secondairement inhibiteurs de CPF sur l'activité de la CAT (Kano et Fridovich, 1982). Dans des études réalisées in vitro, une diminution

de l'activité de la catalase, suite à une exposition aux pesticides, a été rapportée (Malik et Summer, 1992 ; Kalra et al., 1994). Alors que le traitement des animaux par l'EC et par le NAC avant et après traitement par le CPF atténué de façon non significative les effets de stress cellulaire induit par le métabolite toxique du CPF puisque le taux de la CAT est augmenté, ce résultat explique la propriété antioxydante des principes actifs de l'EC.

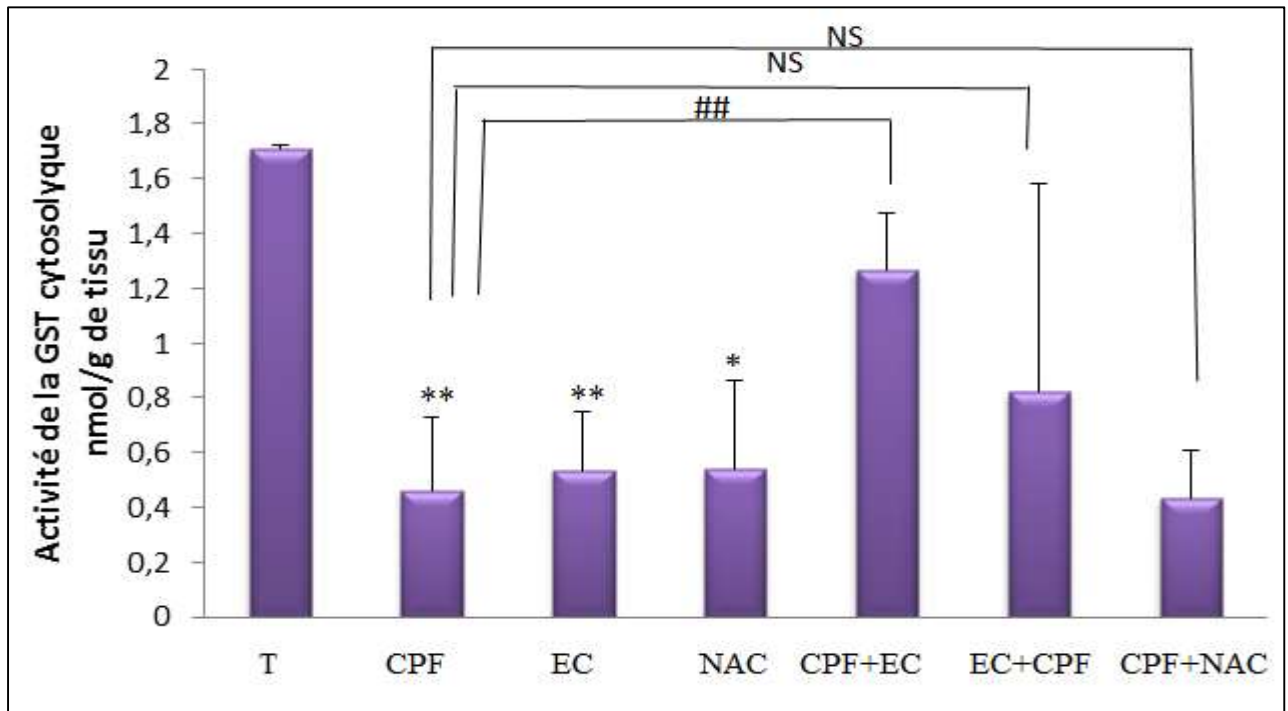


Fig. 09. Effet du CPF sur l'activité cytosoliques de GST dans les tissus hépatique des souris traitées par l'extrait et non traitées. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique. $p < 0,05$: résultat significatif (*), $p < 0,01$: résultat très significatif (**), $p > 0,05$: non significatif (NS). (*) : relatif au témoin ; (#) : relatif au CPF.

En outre, L'évaluation de l'activité enzymatique de la GST a été réalisée ainsi que les résultats sont présentés dans (la Figure 09).L'étude cinétique de l'activité GST en réponse aux différents traitements a montré des variations relativement très significatives entre le lot témoin et le lot traités par CPF.

La glutathion-S-transférase constitue une famille d'isoenzymes principalement cytosoliques. Ce système est très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Gattas et al., 2004 ; Zhihua et al., 2004).Par conséquent, on déduit que la production des radicaux libres provoqués par l'administration du CPF est la cause de la diminution de l'activité de la GST chez les souris traitées avec le CPF seul comparé aux souris témoin.

L'étude cinétique de l'activité GST en réponse aux différents traitements a montré des variations relativement très significatives entre le lot témoin et le lot traité par EC et par le NAC. Nous avons constaté une élévation très significative de l'activité GST chez les souris traitées par CPF suivie de l'EC. Par ailleurs, une variation non significative de l'activité GST est constaté chez les souris prétraitées par l'EC et recevant du CPF ainsi que les souris recevant du CPF suivie du NAC par rapport au souris traités par le CPF seul. La comparaison entre le traitement curatif et préventif par l'extrait de la plante n'a révélé aucune variation significative de l'activité GST (voir la Figure 09).

La diminution des niveaux de l'activité enzymatique de GSH, GST et la CAT chez les groupes recevant l'extrait seul explique que la plante a un effet toxique sur ces activités. Par contre le traitement des souris par l'extrait avant et après l'exposition au toxique donne un effet amélioratif. En peut expliquer ce résultat par le fait que, La métabolisation du CPF a entraînée l'activation de certains enzymes impliqués dans l'élimination des molécules toxiques. Ces enzymes ont réceptionnés les molécules toxiques qui peuvent être présente dans la plante et ils les ont éliminées rapidement ce qui a laissé la chance pour les molécules bénéfiques de la plante a effectuées l'activité antioxydante de la plante.

III. 3. Détermination de l'état de fonctionnement du foie

La détermination des niveaux sérique des enzymes hépatiques (TGP et PAL) sont les plus couramment déterminés dans l'évaluation des dommages hépatiques engendrés par le CPF (Jafri, 1999 ; Eesha et al., 2011). Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules hépatique, leur rôle est de transféré un groupe amine lors des nombreux processus chimique qui se déroulent au niveau hépatique.

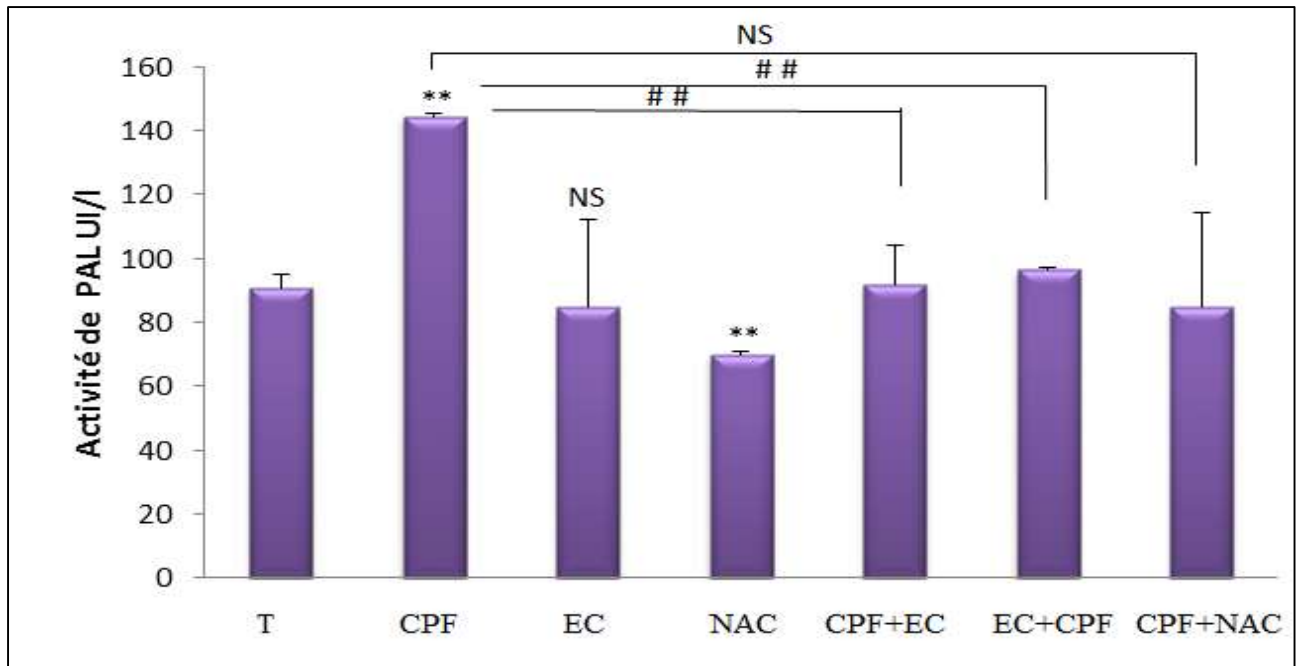


Fig. 10. Effet du CPF sur l'activité de PAL dans les tissus hépatique des souris traitées par l'extrait et non traitées. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique. $p < 0,01$: résultat très significatif (**), $p > 0,05$: non significatif(NS), $p < 0,05$: résultat significatif (#), $p < 0,01$: résultat très significatif (##), $p < 0,001$: résultat hautement significatif (***). (*) : relatif au témoin ; (#) : relatif au CPF.

Selon nos résultats présentés dans (la Figure 10) et (la Figure 11), nous avons enregistré une augmentation des taux sériques de deux biomarqueurs biochimiques, indicateurs de l'état de fonctionnement du foie (TGP et PAL). En effet, nous avons obtenu des données très significatives pour TGP et PAL lors de l'administration du CPF à 40mg/kg.

En outre, le groupe des souris recevant l'EC seul ainsi que le groupe recevant le NAC seul aucune variation significative des PAL n'a été observée par rapport au groupe témoin normal. Par ailleurs, le prétraitement des souris par l'EC avant et après l'induction de la toxicité par le CPF ainsi que le traitement par le NAC, ont normalisés la teneur sérique de ces enzymes, par contre la comparaison avec les souris traitées par le CPF a démontré une diminution significative des taux du PAL voir (la Figure 10).

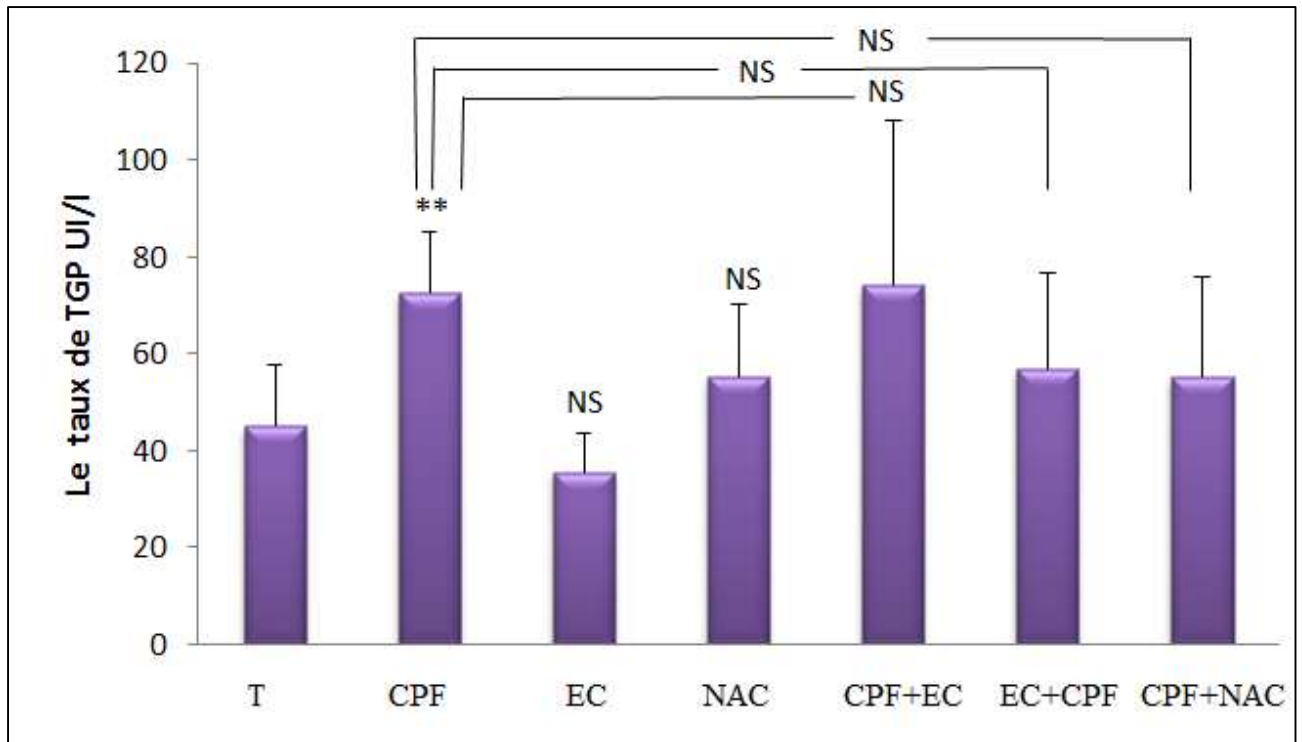


Fig. 11. Effet du CPF sur taux de TGP dans les tissus hépatique des souris traitées par l'extrait et non traitées. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique. $p < 0,01$: résultat très significatif (**), $p > 0,05$: non significatif (NS). (*) : relatif au témoin ; (#) : relatif au CPF.

Concernant le groupe des souris recevant l'EC seul aucune variation significative des enzymes ALAT n'a été observée par rapport au groupe témoin normal. Par contre une variation non significative des enzymes ALAT a été observée chez les souris recevant le NAC seul par rapport au groupe témoin normal aussi. Par ailleurs, le prétraitement des souris par l'EC avant et après l'induction de la toxicité par le CPF et le traitement par NAC après l'induction de la toxicité par le CPF, n'ont aucun effet significatif sur le taux sérique des transaminases, comparés avec les souris recevant le CPF seul (voir la Figure 11).

Cette élévation du taux sérique de ces enzymes est due au métabolite réactif du CPF qui se combiné aux protéines et lipides membranaires provoquant la destruction des cellules hépatiques et la sortie de leurs contenus dans le sang. Nos résultats sont en accord avec ceux publiés sur la toxicité hépatique par les métabolites réactifs (Bloutelet, 1985). Nos résultats sont en accord aussi avec les investigations d'ELBERRY et *al.*, 2010 sur des rats intoxiqués et non traités qui signalent une augmentation de la concentration sérique de TGP. Cette augmentation est moins accrue chez les sujets intoxiqués et traités.

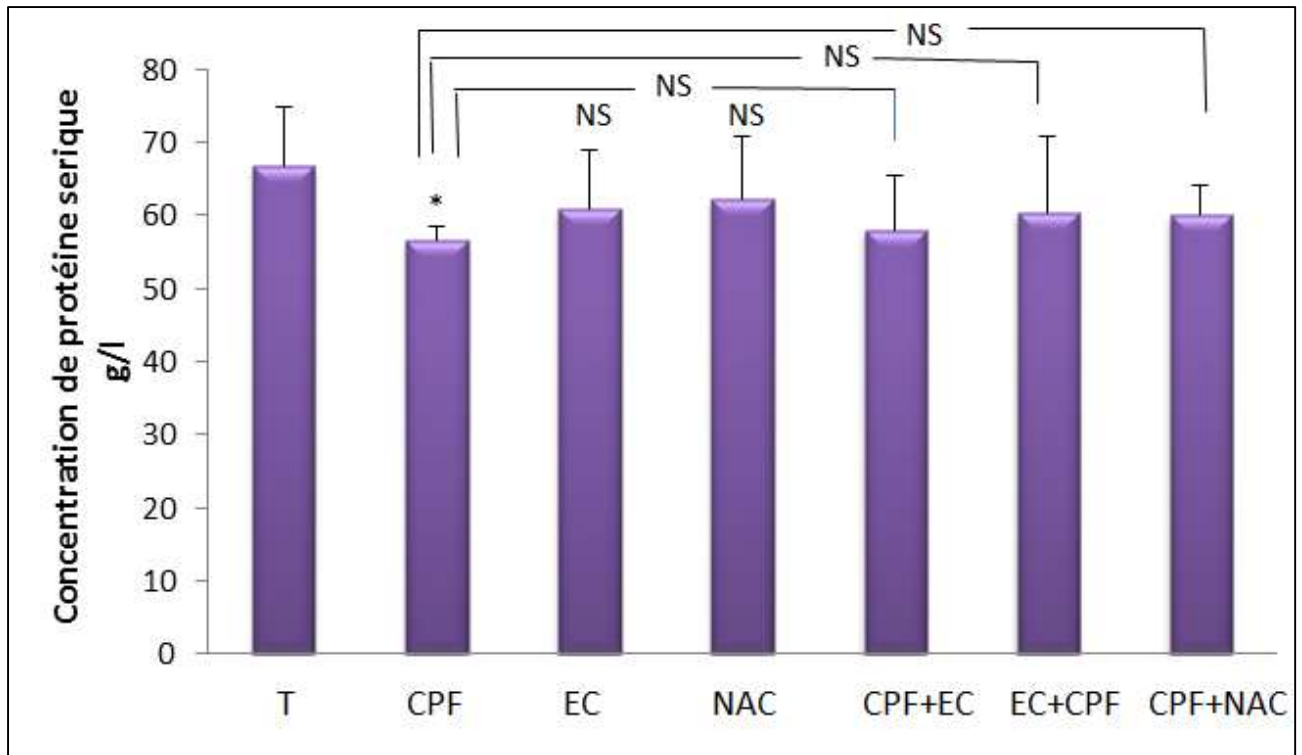


Fig. 12. Effet du CPF sur le taux des protéines sériques dans les tissus hépatique des souris traitées par l'extrait et non traitées. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type. Significativité statistique. $p < 0,05$: résultat significatif (*), $p > 0,05$: non significatif (NS). (*) : relatif au témoin ; (#) : relatif au CPF.

En revanche, la lecture de (la Figure 12), montre que l'administration du CPF provoque une diminution significative ($P < 0.05$) des niveaux des protéines sériques chez les souris traitées par le CPF, comparés au groupe témoin normal. Alors que, le taux des protéines sériques n'a pas été affecté après le traitement curative et le préventive par l'extrait et après le traitement par l NAC.

III. 4. Mise en évidence des altérations tissulaire induites au niveau du foie

Par ailleurs, nous avons examiné les tissus hépatiques issus des différents groupes de souris par microscopie optique. Nous avons observés que les foies correspondant aux souris témoins montraient de lobules normaux formés d'hépatocytes qui rayonnent de la veine centrale vers leur périphérie (Figure 13A). S'agissant du groupe recevant le CPF, nous avons constaté des changements dégénératifs dans la structure histologique totale (Figure 13B). En effet, nous avons remarqué la présence d'une nécrose hépatique qui touche toutes les zones, d'une hémorragie aigue avec congestion des veines portes et centrales, d'une infiltration inflammatoire cellulaire et d'une infiltration par les graisses. Ceci peut être associé à des dommages membranaires potentiels induits par les métabolites du CPF ainsi que ceux induit par le stress oxydatif qu'il provoque. Ces

changements pathologiques sont en corrélation avec l'altération des activités de système de défense antioxydants.

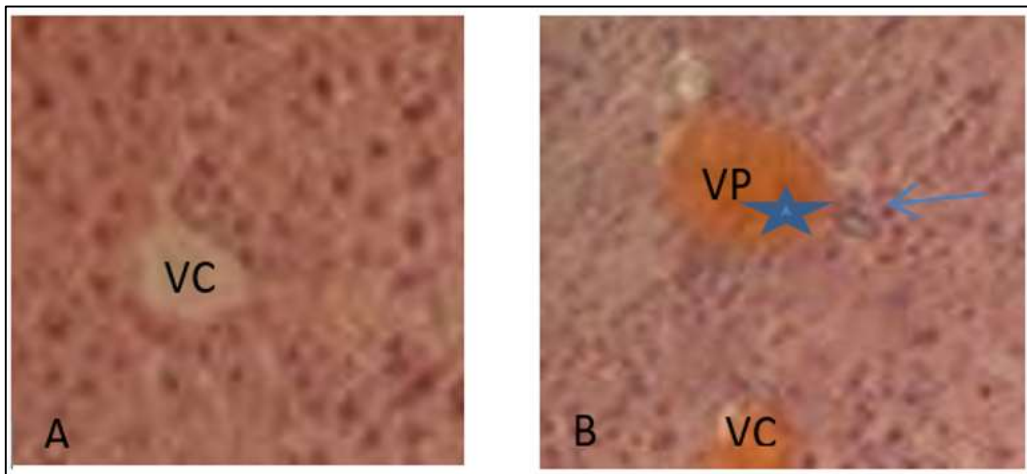


Fig. 13. Analyse par microscopie optique de la toxicité du CPF. G x 4. Veine central (VC), veine porte (VP), les flèches bleu mince indique les cellules inflammatoires, les flèches bleu gras indique les sinusoides, les étoiles indique la congestion veineuse et portale. A : coupe réalisée sur le foie de souris du groupe témoin. B : coupe réalisée sur le foie de souris du groupe CPF.

Enfin, nous avons analysé l'effet protecteur de l'extrait brut Chloroformique contre l'hépatotoxicité induite par CPF par microscopie optique. Cependant, l'administration de l'EC a montré une dilatation des sinusoides, des veines et des artères avec une congestion parfois observée de ces premiers (Figure 14E). Pour le groupe recevant le NAC, le même a été marqué avec une infiltration inflammatoire modéré qui peut indiquer la présence d'une perturbation cellulaire (Figure 14F). Le traitement par l'EC après exposition au CPF a montré une amélioration dans la structure histologique globale du foie en comparaison avec le traitement préventif par l'EC et le traitement par le NAC, ou la nécrose est locale, l'hémorragie est moins visible et l'infiltration inflammatoire est moins fréquente et régressé autours des veines centrales et veines portes voir (Figure 14B, 14C et 14D) ceci peut s'expliquer par l'activité antioxydante de l'extrait qui a possiblement empêcher les dommages membranaires et cellulaires causées par le stress oxydatif induit par le CPF (Figure 14A) et dont la localisation de la nécrose hépatique et le rétrécissement de l'hémorragie observé. Ces observations démontrent une corrélation avec l'amélioration des paramètres antioxydants et la diminution de la peroxydation lipidique marqués lors de l'administration de l'EC.

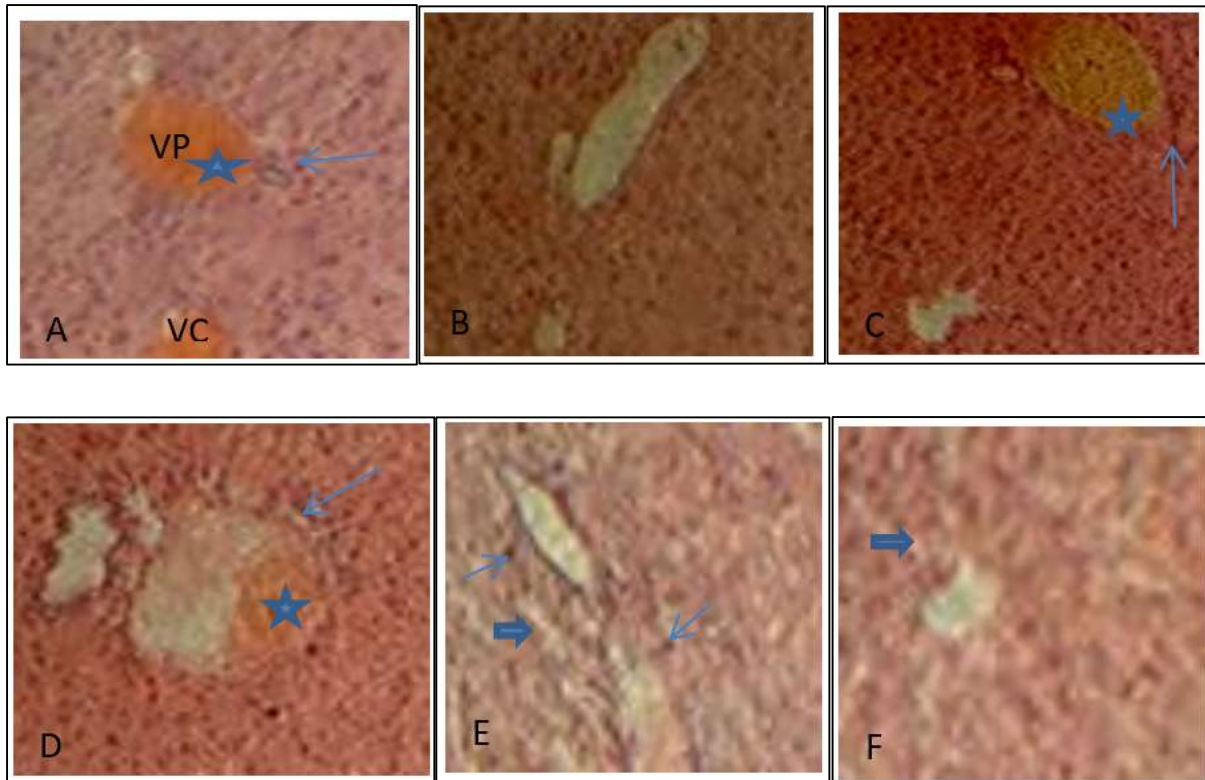
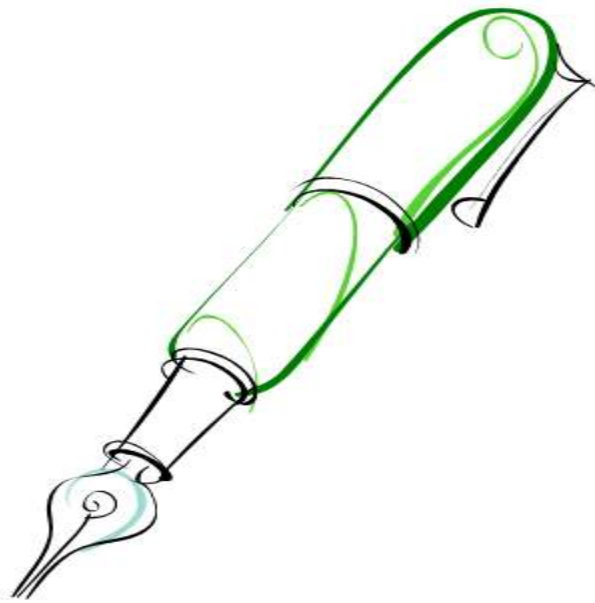


Fig. 14. Analyse par microscopie optique de l'effet de l'extrait EC sur la l'hépatotoxicité du CPF. G x 4. Veine central (VC), veine porte (VP), les flèches bleu mince indique les cellules inflammatoires, les flèches bleu gras indique les sinusoides, les étoiles indique la congestion veineuse et portale. A : coupe réalisée sur le foie de souris du groupe CFP. B : coupe réalisée sur le foie de souris du groupe CPF+EC. C : coupe réalisée sur le foie de souris du groupe traité par EC+CPF. D : coupe réalisée sur le foie de souris du groupe traité par le CPF+NAC. E : coupe réalisée sur le foie de souris du groupe EC. F : coupe réalisée sur le foie de souris du groupe NAC.

IV. conclusion



Il est clair que l'absence d'informations nécessaires à la caractérisation des dangers des pesticides est un facteur déterminant pour l'évaluation de leurs méfaits. En effet, ces molécules chimique d'origines diverses constituent une menace majeure et permanente pour la santé humaine et l'environnement. Or l'utilisation des pesticides d'une façon générale en Algérie, et celle des insecticides plus particulièrement, est confrontée toujours à l'absence d'une réglementation contraignante et exigeante concernant le respect des normes sanitaires. Par ailleurs, de nombreuses études ont été consacrées à la compréhension des mécanismes d'action de ces substances sans pour autant s'intéresser suffisamment à leur problématique dans le contexte de l'utilisation de plantes médicinales. Ainsi, notre travail s'inscrit dans cette démarche qui tente d'établir ce rapport entre la toxicité des pesticides et l'effet protecteur relevant des propriétés biologiques de certaines substances produites par des plantes.

Nous avons principalement cherché à démontrer l'effet bénéfique des extraits de la plante *centaurea calcitrapa* contre un organophosphoré ; c'est-à-dire, par ses effets antioxydants .Et cela en approuvant deux tests *in vitro* qui sont : le test de DPPH et le test de chélation du fer ferreux. Ainsi, certains paramètres du stress oxydant et des marqueurs biochimiques de l'état de fonctionnement du foie ont été investigués. Egalement, nous avons analysé les dommages histologiques induits dans le foie par le CPF seul ou combiné avec l'extrait Chloroformique.

D'une façon générale, l'étude a permis de montrer que le statut antioxydant a été affecté ; suggérant ainsi la présence d'un stress oxydant généré par le CPF qui a troublé la capacité défensive de l'organisme. Elle a également permis de constater que le traitement par l'extrait avant et après l'administration du CPF ainsi que le traitement par NAC ont provoqué une diminution de la toxicité hépatique ; et cela en réduisant les taux du MDA et en augmentant les taux du GSH et les activités de CAT et de GST. De toute évidence, nous avons observé une amélioration des paramètres biochimiques sériques tels que la phosphatase alcaline et TGP. En revanche, le taux des protéines sériques n'a pas été affecté par le traitement.

Nos résultats ont permis de confirmer la présence d'action préventive très importante de notre extrait. Il est important de signaler que les composés flavonoïdes dont nous avons prouvés la présence dans nos extraits sont connus par leur effet antioxydant et donc impliqués dans de nombreuses activités biologiques. Ces résultats prometteurs restent préliminaires et méritent d'être consolidés et approfondies. Ainsi, à l'échelle moléculaire, des travaux sont nécessaires pour déterminer d'une part les composés actifs de la plante *centaurea calcitrapa* responsables des effets antioxydants et protecteurs et leur mécanisme d'action d'autre part. Enfin, il serait

intéressant de prolonger la durée d'exposition des animaux au gavage à cet insecticide afin de savoir si finalement les perturbations du statut oxydant/antioxydant observées pourraient aboutir à l'apparition de pathologies.

Abdollahi M, Rainba A, Shadnia S, Nikfar S et Rezaie A. (2004). Pesticide and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monitor.* 10: 141-147.

Abou-Donia MB, Khan WA, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Bullman SL et Abdel-Rahman A. (2006). In utero exposure to nicotine and chlorpyrifos alone, and in combination produces persistent sensorimotor deficits and Purkinje neuron loss in the cerebellum of adult offspring rats. *Arch. Toxicol.* 80: 620-31.

Aebi HE. (1984). Catalase in vitro. *Methods of Enzymol.* 105: 114-121.

Ahmed RS, Seth V, Pasha ST et Banerjee BD. (2000). Influence of dietary (Zingiber officinales Rosc) on oxidative stress induced by Malathion in rats. *Food Chem. Toxicol.* 38: 443-50.

Ahmad R, Tripathi AK, Tripathi P, Singh R, Singh S et Singh RK. (2010). Studies on lipid peroxidation and non- enzymatic antioxidant status as indices of oxidative stress in patients with chronic myeloid leukaemia. *Sing. Med. J.* 51: 110-115.

Allison K et Daniel S. (2015). Oxidative Stress, Unfolded Protein Response, and Apoptosis in Developmental Toxicity. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 317: 1–66.

Aly N, El-Gendy K, Mahmoud F et El-Sebae AK. (2010). Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pest. Biochem. Phys.* 97: 7-12.

Anderson EJ, Katunga LA et Willis MS. (2012). Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39:179–193. 1440-1681.

Atkin MA, Gasper A, Ullegaddi R et al. (2005). Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: response to antioxidants *in vitro* and to antioxidants supplementation. *Clin. Chem.* 51: 2138-2144.

Arranz L, Fernandez C, Rodriguez A, Ribera JM et de la Fuente M. (2008).The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic. Biol. Med.*45: 1252–1262.

Bakke JE et Price CE. (1976). Metabolism of OO-dimethyl-O-(3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate in sheep and rats and of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol in sheep. *J. Environ. Sci. Health B.* 11:9– 22.

- Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. (2001). Pesticide induced oxidative stress: perspective and trends. *Rev. Environ. Health.* 16: 1-40.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. *Tox. Lett.* 107: 33-47.
- Banks CN et Lein PJ. (2012). A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compound and inflammation. *Neuro.Toxicology.* 33: 575–584.
- Barr DB et Angerer J. (2006). Potential uses of biomonitoring data: a case study using the organophosphorus pesticides chlorpyrifos and malathion. *Environ Health Perspect.* 114: 1763-1769.
- Beloued A. (2005). Plantes Medicinale d'Algérie. Office des publications universitaires. 69:71.
- Berlett BS et Stadtman ER. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol.Chem.* 272:20313–20316.
- Bicha S, Amrani A, Benaissa O, León F, Zama D, Brouard I, Benayache S, Bentamene A et Benayache F.(2013) . A flavonoid with high antioxidant effect from *Centaurea acaulis* L. *Der Pharmacia Lettre.* 5 (6):24-30.
- Boutellets I. Les glutation S-transphérasés. (1985). *DEA de biologie cellulaire et moleculaire. (ROUEN, France).*
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein–dye binding. *Analy. Biochem.* 72:248-254.
- Buyukokuroglu ME, Cemek M, Yurumez Y, Yavuz Y et Aslan A. (2008). Antioxidant role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. *Cell Biol. Toxicol.* 24: 151–158.
- Çağlıkülekcı M, Pata C, Apa DD, Dirlık M, Tamer L, Yaylak F, Kanik A et Aydın S. (2004). The effect of N-acetylcysteine (NAC) on liver and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide (LPS). *Pharmacol. Res.* 49:227–238.
- Chatterjee R et Mitra A. (2015). An overview of effective therapies and recent advances in biomarkers for chronic liver diseases and associated liver cancer. *Int. Immunopharmacol.* 24: 335–345.
- Chen D, Zhang Z, Yao H, Cao Y, Xing H et Xu H. (2014). Pro- and anti-inflammatory cytokine expression in immune organs of the common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos, *Pestic. Biochem. Physiol.* 114 8–15.

- Chihuailaf RH, Contreras PA et Wittwer FG. (2002). Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. *Vet. Méx.* 33(3): 265-283.
- Cohen-Naftaly M et Friedman SL. (2011). Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 4: 391–417.
- Colville A, Jones P, Pablo F, Krassoi F, Hose G et Lim R. (2008). Effects of chlorpyrifos on Macro- invertebrate communities in coastal stream mesocosms. *Ecotoxicology* .17: 173–180.
- Cooke MS, Evansm D, Dizdaroglu M et Lunec J. (2003).Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal.*17:1195-1214.
- Costa LG. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin .Chim. Acta.* 366: 1-13.
- Costa LG, Giordano G, Guizzetti M et Vitalone A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front. Biosci* .13:1240-1249.
- Costantini D et Verhulst S. (2009). Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress?. *Funct. Ecol.* 23: 506-509.
- Cui Y, Guo J, Xu B et Chen Z. (2011). Genotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin to ICR mouse hepatocytes. *Toxicol. Mech. Methods* .21:70-74.
- Dinis TCP, Madeira VMC et Almeida MLM. (1994). Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 161-169.
- Davis KJA. (2000). Oxidative stress, antioxidant defences and damage removal, repair and replacement systems. *IUBMBL* .50 : 279-289.
- De Andrade KQ, Moura FA, Santos JMD, de Araújo ORP, de Farias Santos JC et Goulart MOF. (2015). Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *Int. J. Mol. Sci.*16: 30269–30308.
- Deng X, Luyendyk JP, Ganey PE et Roth RA. (2009).Inflammatory stress and idiosyncratic hepatotoxicity: Hints from animal models. *Pharmacol. Rev.* 61: 262- 282.
- Derkaoui A, Elbouazzaoui A, Elhouari N, Achour S, Labib S, Sbai H, Harrandou M, Khatouf M, et Kanjaa N. (2011) .Intoxication aiguë sévère par les pesticides organophosphorés: à propos de 28 cas. *Pan African Medical Journal.* 8:16.

- Ditomaso JM, Kyser GB et al. (2013). Weed control in Natural Areas in the Western United states. *Weed Research and Information Center, University of California*. pp544.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P et Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *J. Food. Chem.* 97: 654–660.
- Dominguez Z, Ruiz E, Gussinye M et Carrascosa A. (1998). Oxidative stress at on set and in early stages of type diabetes in children and adolescents. *Diabetes care.* 21: 1736 - 1742.
- Dröge W. (2002) .Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev* 82:47–95.
- Duffield JS. (2003).The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin. Sci. I (Lond)*.104:27–38.
- Eddleston M, Buckley NA, Cheeketts H et al. (2004). Speed of initial atropinisation in significant organophosphorus pesticide poisoning a systematic comparison of recommended regimens. *J. Toxicol Clin. Toxicol.* 42:865–75.
- Eddleston M, Mohamed F, Davies JO et al. (2006). Respiratory failure in acute organophosphorus pesticide self-poisoning. *QJM* .99:513–522.
- Ellman GL. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch BiochemBiophys.* 82:70-77.
- Eesha BR, Mohanbabu Amberkar V, Meena Kumari K, Sarathbabu, Vijay M, Lalit M et Rajput R.(2011). Hepatoprotective activity of Terminalia paniculata against paracetamol induced hepatocellular damage in wistar albino rats. *Asian pacific Journal of Tropical Medicine.* 466- 469.
- Eskenazi B, Bradman A et Castorina B.(1999). Exposure of children to organophosphate pesticide and their potential adverse effects. *Env. Helth. Persp.* 107: 409-419.
- Favier A.(2003) .Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique Review. *l'actualite chimique.* pp: 108-115.
- Fortunato JJ, Agostinho FR, Reus G Z, Petronilho FC, Dal-Pizzol F et Quevedo J. (2006). Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotox. Res.* 9: 23–28.
- Gallicchio VS, Casal GP, Watts T. (1987). Inhibition of human bone marrow-derived stem cell colony formation (CFU-E, BFU-E, and CFU-GM) following in vitro exposure to organophosphates. *Exp.Hematol.*15:1099-1102.

Habig WH, Pabst MJ et Jakoby WB. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.

Hollwell B et Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology.* 142:31-2.

Hou Y, Wang L, Yi D, Ding B, Yang Z, Li J, Chen X, Qiu Y et Wu G. (2013). N-acetylcysteine reduces inflammation in the small intestine by regulating redox, EGF and TLR4 signaling. *Amino Acids.* 45:513–522.

Hreljac I, Zajc I, Lah T et Filipic M. (2009). Effects of model organophosphorous pesticides on DNA damage and proliferation of HepG2 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 49: 360-367.

Huen K, Harley K, Bradman A, Eskenazi B et Holland N. (2010). Longitudinal changes in PON-1 enzymatic activities in Mexican, American mothers and children with different genotypes and haplotypes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244:181-189.

International Program on Chemical Safety (IPCS). (1986). Environmental Health Criteria 63: Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. *World Health Organization (WHO) Geneva.* p181.

Jafri M, Jalis S, Kalim J et Surender S. (1999). Hepatoprotective activity of leaves of *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. *Journal of ethopharmacology.* 66:355-361.

Jaeschke H. (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present Concepts. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26: 173–179.

Jusman SWA et Halim AS. (2009). Oxidative stress in liver tissue of rat induced by chronic systemic hypoxia. *MakaKese.* 13: 34-38.

Kalra J, Mantha SV et Prasad K. (1994). Oxygen free radicals: key factors in clinical diseases. *Lab. Med. Int.* 1: 16-21.

Karamenderes C, Bedir E, Pawar R, Baykan S et Khan IA. (2007). Elemnolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from hierapolitana. *phytochem.* 68:609-615.

Kedderis GL. (1996). Biochemical basis of hepatocellular injury. *Toxicol. Pathol.* 24: 77-83.

Kehrer JP. (1993). Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 23: 21-48.

Khanna A, Shukla P et Tabassum S. (2011). Role of Ocimum sanctum as a Genoprotective Agent on Chlorpyrifos induced Genotoxicity. *Toxicol Int.*18: 9-13.

Kono Y et Fridovich I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem.* 257: 5751-4.

Kurutas EB, Doran F et Ciralik H. (2006). The effect of endosulfan on lactic dehydrogenase enzyme system in liver of musculus: a histochemical study. *Eur J Gen Med.* 3: 148-51.

Lauwerys R. (1993). Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring. 2^{ème} édition. p 318.

Li Q, Kobayashi M et Kawada T. (2007). Organophosphorus pesticides induce apoptosis in human NK cells. *Toxicology.* 239:89-95.

Li X, Zhang X, Zhang J, Zhang X, Starkey SR et al. (2009). Identification and characterization of eleven glutathione S-transferase genes from the aquatic midge Chironomus tentans (Diptera: Chironomidae). *Insect Biochem Mol. Biol.* 39:745-754.

Lotti M. (2002). Promotion of organophosphate induced delayed polyneuropathy by certain esterase inhibitors. *Toxicology.* 27:181-182.

Malik J et Summer K. (1982). Toxicity and metabolism of Malathion and its impurities in isolated rat hepatocytes: role of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol.* 66: 69-76.

Marnett LJ. (1999). Lipid peroxidation DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ.* 424: 83-95.

Mehta A, Verma RS et Srivastava N. (2009). Chlorpyrifos-induced alterations in the levels of hydrogen peroxide nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pest. Biochem. Phys.* 94:55-59.

Meister A. (1998). Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263: 17205-17208.

Murray PJ et Wynn TA. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 11:723-737. *cells. FASEB J.* 9:200-209.

Nakadai A, LI Q et Kawada T. (2006). Chlorpyrifos induces apoptosis in human monocyte cell line U937. *Toxicology.* 224:202-209.

Navarro VJ, et Senior JR. (2006). Drug-related hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* 354: 731-739.

- Niki E. (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim.Biophys.Acta*. 1840: 809–17.
- Njie-Mbye YF, Kulkarni-Chitnis M, Opere CA, Barrett A et Ohia SE. (2013). Lipid peroxidation: pathophysiological and pharmacological implications in the eye. *Front. Physiol.* 4:1–10.
- Othman A, Ismail A, Ghani AN et Adenan I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food. Chemistry*.100: 1523–1530.
- Papay JI, Clines D, Rafi R, Yuen N, Britt SD et al. (2009). Drug-induced liver injury following positive drug rechallenge. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54: 84-90.
- Parasassi T, Brunelli R, Bracci-Laudiero L, Greco G, Gustafsson AC, Krasnowska EK, Lundeberg J, Lundeberg T, Pittaluga E, Romano MC et al. (2005) . Differentiation of normal and cancer cells induced by sulfhydryl reduction: Biochemical and molecular mechanisms. *Cell.Death .Differ*.12:1285-1296.
- Parent, Massin D et Thouvenot D. (1993). In vitro study of pesticide hematotoxicity in human and rat progenitors. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 30:203-207.
- Park E, Yu KH, Kimdo K, Kim S, Sapkota K, Kim SJ, Kim CS et Chun S. (2014). Protective effects of N-acetylcysteine against monosodium glutamate-induced astrocytic cell death. *Food Chem. Toxicol.* 67:1–9.
- Pieroni A , Janiak V, Dürr CM, Lüdeke S, Trachsel E et Heinrich M. (2002). In vitro Antioxidant activity of non –cultivated vegetables of Ethnic Albanians in southern Italy . *phytother . Res*.16:467-473.
- Poet TS, Wu H, Kousba AA et Timchalk C. (2003). In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicol .Sci* .72:193-200.
- Possamai FP, Fortunato JJ, Feier G, Agostinho FR, Quevedo J, Wilhelm Filho D et Dal-Pizzol F. (2007). Oxidative stress after acute and sub-chronic Malathion intoxication in Wistar rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23: 198–204.
- Poovala VS, Huang H et Salahudeen AK. (1999). Role of oxygen metabolites in organophosphate-bidrininduced renal tubular cytotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 1746–1752.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok J, Sasvari M, Nyakas C et Goto S. (2001). Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neuro.chem.Int.* 38:17–23.

- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S et Dhama K . (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *Bio.Med. Research. International*.19:1-19.
- Rahman MF, Mahboob M, Danadevi K, Banu B et Grover P. (2002). Assessment of genotoxic effects of chloropyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutat.Res.* 516: 139-147.
- Ravi K, Ramachandran B et Subramanian S. (2004). Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*.75: 2717 – 2731.
- Rosenbaum C, Steven B et Bird. (2010). Non-muscarinic Therapeutic Targets for Acute Organophosphorus Poisoning . *J. Med. Toxicol.* 6:408–412.
- Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS et Britigan BE. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* .9:200–209.
- Samuni Y, Goldstein S, Dean OM et Berk M. (2013) .The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim .Biophys. Acta*.1830: 4117–4129.
- Savage EP, Keefe TJ, Mounce LM, Heaton RK, Lewis JA et Burcar PJ. (1988). Chronic neurological sequelae of acute organophosphate pesticide poisoning. *Archives of Environmental Health*. 43: 38-45.
- Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA et al. (2006). An Official ATS Statement: Hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am .J .RespirCrit Care Med*. 174: 935-952.
- Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S et al.(2005). Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum. Exp.Toxicol.* 24: 439-445.
- Sidell FR. (1994). Clinical effects of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *J Appl.Toxicol*.14:111–113.
- Singh KP, Ahmad AH, Hore SK, Singh V, Lohani M et Rahal A. (2006). Effect of *Emblicoefficialison* antioxidative and haematological parameters following mercury induced toxicity. In *Proceedings of the 6th Annual conference of ISVPT, Patna, India*.
- Singh KP, Ahmad AH, Singh V, Pant K et Rahal A. Effect of *Emblicoefficialisfruit* in combating hepatic oxidative stress in rats. (2011). *Indian Journal of Animal Sciences* .81:260- 262.
- Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS et al. (2011). Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol .Appl. Pharmacol.* 252:130-137.

- Stapleton AR et Chan VT. (2009). Subtoxic chlorpyrifos treatment resulted in differential expression of genes implicated in neurological functions and development. *Arch Toxicol.* 83: 319-33.
- Subat T, Qun L, Faye L et Lopez JR. (2007). Catalase alleviates cardiomyocyte dysfunction in diabetes : role of Akt, forkhead transcriptional factor and silent information regulator 2. *Life sciences.* 81:895-905.
- Sultana R, Perluigi M et Butterfield DA. (2013). Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic.Biol. Med.* 62:157–169.
- Taleb-Senouci D, Ghomari H, Krouf D, Bouderbala S, Prost J, Lacaille-Dubois MA et Bouchenak M. (2009). Antioxidant effect of *Ajugaiva* aqueous extract in Streptozotocin-Induced diabetic rats. *Phytomedicine: International journal of phytotherapy and Phytopharmacology.* 16: 623-31.
- Tamara G et Richard H. (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology.* 12:345-363.
- Tang SY et Halliwell B. (2010). Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 394:1-5.
- Timchalk C, Poet TS et Kousba AA. (2006). Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicology.* 220: 13- 25.
- Thiermann H, Szinicz L, Eyer P et al. (2005). Correlation between red blood cell acetyl -cholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem. Biol. Interact.* 157–158: 345–347.
- Trachootham D, Alexandre J et Huang P. (2009). Targeting cancer cells by ROS mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 8: 579–591.
- Thrasher JD, Heuser G et Broughton A. (2002). Immunological abnormalities in humans chronically exposed to chlorpyrifos. *Arch. Environ.Health.* 57:181-187.
- Tripathi S et Srivastav AK. (2010). Nephrotoxicity induced by long-term oral administration of different doses of Chlorpyrifos. *Toxicol.Ind. Health.* 26: 439-47.
- Tuzmen N, Canadan N, Kaya E et Demiryas N. (2008). Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidants defence mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochem. Funct.* 26: 119-124.

- Uchendu C, Suleiman F, Ambali et Joseph OA. (2012). The organophosphate, chlorpyrifos, oxidative stress and the role of some antioxidants: A review. *African Journal of Agricultural Research*. 7:2720-2728.
- Vale JA. (1998). Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Tox. Let.* 102-103: 649-652.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M et Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.Biol .Interact.* 160:1-40.
- Vandana S, Ram S, Ilavazhagan M, Kumar GD et Banerjee PK. (2006). Comparative cytoprotective activity of vitamins C, E and beta carotene against chromium-induced oxidative stress in murine macrophages. *Biomed. Pharmacother.* 60: 71-76.
- Venerosi A, Ricceri L, Tait S et Calamandrei G. (2012). Sex dimorphic behaviors as markers of neuroendocrine disruption by environmental chemicals: the case of chlorpyrifos. *Neurotoxicology*. 33:1420-1426.
- Verma RS, Mehta A et Srivastava N. (2007). In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuated by antioxidant vitamins. *Pest.Biochem. Phys.* 88: 191-196.
- Vuorela S, Kreander K, Karonen M, Nieminen R, Hamalainen M, Galkin A , Laitinen L, Salminen JP, Moilanen E, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P et Heinonen M. (2005). Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry and pine bark phenolics for health related effects. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5922-5931.
- Whyatt RM , Garfinkel R , Hoepner LA, Holmes D, Borjas M, Williams MK, Reyes A, Rauh V, Perera FP et Camann DE. (2007). Within- and between-home variability in indoor-air insecticide levels during pregnancy among an inner-city cohort from New York City, *Environ. Health Perspect.* 115:383–389.
- Willett KL, Roth RA et Walker L. (2004) .Workshop overview: hepatotoxicity assessment for botanical dietary supplements. *Toxicol. Sci.* 79: 4-9.
- Wright JR, Colby HD et Miles PR. (1981). Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 206: 296 – 304.
- Wilson BW, Arrieta DE et Henderson JD. (2005). Monitoring cholinesterases to detect pesticide exposure. *Chem. Biol. Interact.* 157–158.

Yayli N, Baltaci C, Gök Y, Aydın E et Üçünü O. (2004). Sesquiterpene lactones from *centaurae helenioides* Boiss. *Turk .J.Chem.* 30:229-233.

Zhang JL, Qiao CL et Lan WS. (2004). Detoxification of organophosphorus compounds by recombinant carboxylesterase from an insecticide-resistant mosquito and oxime-induced amplification of enzyme activity. *Inc. Environ. Toxic.* 19: 154–159.

Zheng Q, Oliver K, Won YK et Pope CN. (2000). Comparative cholinergic neurotoxicity of chlorpyrifos exposure in preweaning and adult rats. *Toxicol. Sci.* 55: 124-132.

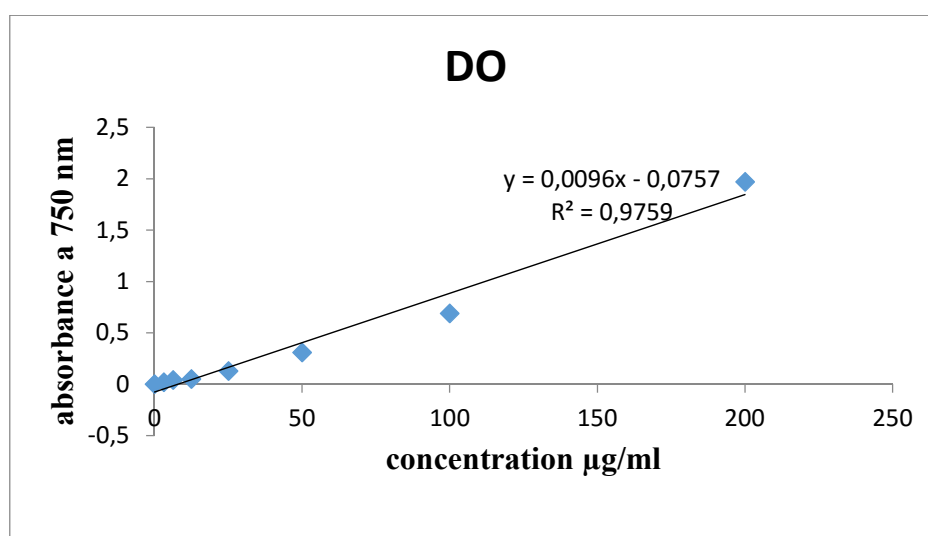
Zihai J, Elias SJA, Ying M, Linda J, Jinming S, Siki Z, Shujun L, Ruiying W, Tianzhu Z, Ganglin Y, Junqiu L, Jiacong S et Guinmin L. (2004). Expression of selenocysteine –containing Glutathione S-transferase in *Escherichia coli*. *Biochem and Bioph Res commun.* 21:94-101.

Annexes

1- Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau 1. Concentration de l'acide gallique ($\mu\text{g/ml}$) pour la réalisation de la gamme d'étalonnage.

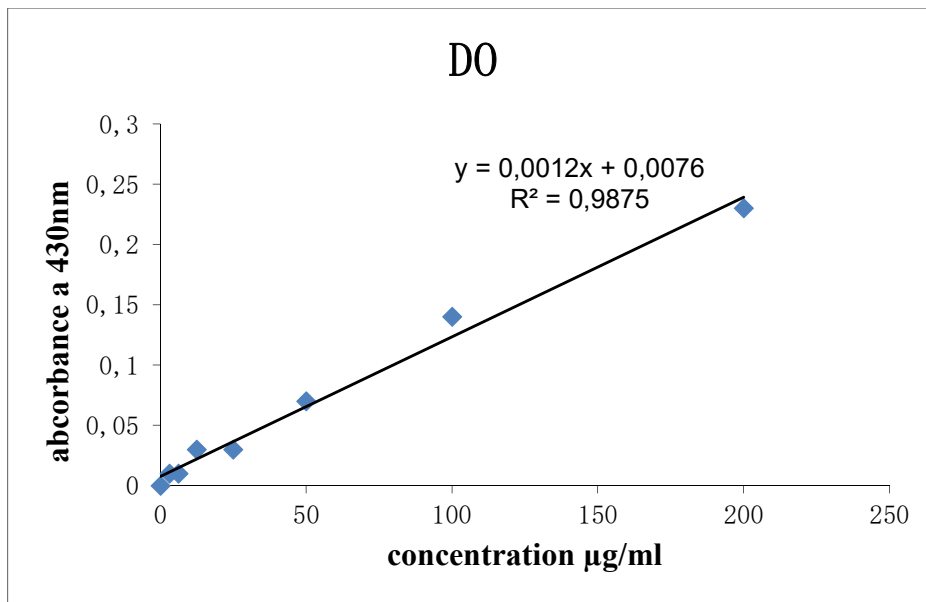
AG [$\mu\text{g/ml}$]	2	5	6.25	13.5	25	50	100	200
Absorbance	0.110	0.120	0.130	0.155	0.230	0.360	0.589	1.901



2- Courbes d'étalonnage de la quercétine

Tableau 1. Concentration de la quercétine ($\mu\text{g/ml}$) pour la réalisation de la gamme d'étalonnage.

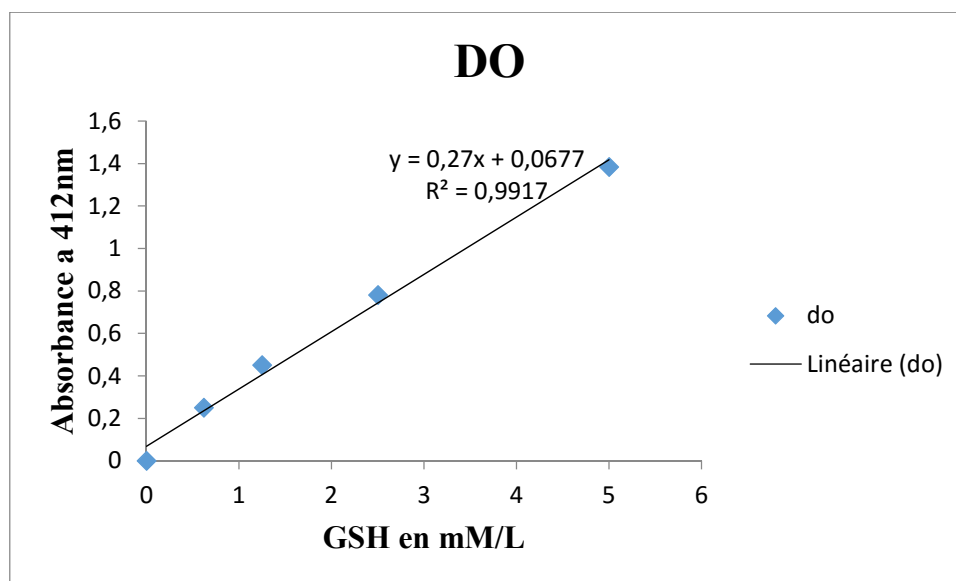
AG [$\mu\text{g/ml}$]	2	5	6.25	13.5	25	50	100	200
Absorbance	0.019	0.024	0.025	0.041	0.040	0.065	0.130	0.240



3. Courbe d'étalonnage de GSH

Tableau 3. Concentration en GSH (mM) pour la réalisation de la gamme d'étalonnage

Concentration GSH (mM)	0.1	0.6	1.3	2.5	5
Absorbance	0.090	0.289	0.495	0.791	1.301



Résumé :

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer la toxicité hépatique aiguë induite par le CPF chez la souris d'une part, de rechercher les effets antioxydant de l'extrait brut chloroformique de la plante *Centaurea Calcitrapa* contre cette intoxication d'autre part. Ainsi, certains paramètres du stress oxydatif et de marqueurs biochimiques ont été analysé(s), ainsi que les dommages histologiques au niveau du foie. Nous avons démontré que l'extrait chloroformique est le plus riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes avec des teneurs de 155.25 µg EAG/mg d'extrait et 170.1 µg EQ/mg d'extrait, respectivement. L'activité de cet extrait était très importante (IC50 = 766.38 µg/ML). Les résultats de l'analyse de l'état de stress oxydatif ont montré une augmentation des activités de la catalase (CAT) et de la glutathion-S-transférase (GST), ainsi que des taux de GSH chez les animaux traités par l'extrait de ce même extrait. En revanche, nous avons observé une diminution des taux hépatiques du MDA. De plus, une baisse des taux des paramètres sériques (Pal et TGP) a été remarquée. Par ailleurs, les concentrations des protéines sériques ont été inchangées. Enfin, nous avons constaté une normalisation très significative des structures histologiques du foie. Nous avons conclu que l'extrait brut Chloroformique de cette plante est doué d'effets hépato-protecteurs antioxydants, préventif ou curatif contre le chlorpyrifos.

Mots clés : Hépato-toxicité, Chlorpyrifos, centaurea calcitrapa, stress oxydant.

Abstract:

The main objective of this work was to evaluate the acute hepatic toxicity induced by CPF in mice on the one hand, and on the other, to search for the antioxidant matory crude chloroformic extract of the plant *Centaurea calcitrapa* against suchpoisoning. Thus, some parameters of oxidative stress and biochemical markers were analyzed, as well as histological damage to the liver. We argued that chloroformic extractis the richest in total polyphenols and flavonoids with grades of EAG 155.25 ug / mg of extract and 170.1 mcg EQ / mg extract, respectively. The activity of this extract was very important (IC50 = 766.38 g / ml). The results of the analysis of the condition of oxidative stress showed an increase in catalase (CAT), and also in glutathione-S-transferase (GST) and GSH levels in the animals treated with the extract of the same extract. In contrast, we observed a decrease in the hepatic MDA levels. In addition, a lower rate of serum parameters (Pal and GPT) was noticed. Furthermore, the concentrations of serum proteins were unchanged. Finally, we found a highly significant normalization of histological structure of the liver. We concluded that the Chloroformerude extract of this plant has hepato-protective effects antioxidant, and it is preventive or curative against chlorpyrifos.

Keywords: Hypato-toxicity, Chlorpyrifos, centaurea calcitrapa, oxidative stress.

المخلص:

الهدف الأساسي من هذا العمل هو تقييم التأثير المضاد لمستخلص الكلوروفورم ل *centaurea calcitrapa* على معايير الاجهاد التأكسدي. والأضرار التي تمس الكبد الناجمة عن تسمم كبدي حاد نتج عن تأثير الكلوربيريفوس. أثبتت النتائج أن مستخلص الكلوروفورم يحتوي على نسبة عالية من متعدد الفينول و الفلافونويدات قدرت قيمتهما 155.25 µg EAG/mg و 170.1 µg EQ/mg على التوالي. هذه القيم كانت أعلى مقارنة بالقيم المحصل عليها من مستخلص الايثانول والميثانول. كما كان (IC50= 766.38 µg/ml). كما أثبتت النتائج وجود انخفاض في مستويات الكاتالاز (CAT) و الجلوتاثيون-S-ترانسفيراز (GST) و الجلوتاثيون بعد العلاج بالمستخلص المحصل عليه من النبتة. من ناحية أخرى هناك انخفاض في مستوى الدهن البيروكسيدي في الكبد و كما لوحظ انخفاض نسبة معايير معلمات المصل (TGP, PAL) غير أن نسبة بروتينات المصل لم تتأثر بالعلاج. وقد توضح أن التركيب النسيجي العام للكبد قد تحسن. حيث كان النزيف أقل وضوحا و تسلسل الالتهابات أقل شيوعا. نستنتج أنه تم البرهان على أن لمستخلص الكلوروفورم تأثير حامي للكبد.

الكلمات المفتاحية: التسمم الكبدي، السننوريا كالسيتراپا، الكلوربيريفوس، الاجهاد التأكسدي.