

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

Université de Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



جامعة جيجل

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتب
رقم الجرد : 2688

Master en Biologie

Option : Pharmacologie Expérimentale

Intitulé

Etude de l'Activité anti-alpha-amylasique *in vitro* et hépatoprotectrice *in vivo* de l'extrait ethanologique des parties aérienne de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens L.*

Membres de jury :

Présidente : M^{me}. BANGUEDOUAR L.

Examineurs: Dr. KEBIECHE M.

Dr. RECHRECHE H.

Encadreur : Dr. ALYANE M.

Présenté par :

BOUSNINA Naïma

KEMIH Chahinez

KOUISSA Sana

Année Universitaire : 2012-2013

Remerciment

Avant toute chose, nous remercions Dieu Tout Puissant de nous avoir aidé et éclairé le chemin pour la réalisation de ce travail.

Nous remercions notre encadreur Dr ALYANE Mohammed pour ses conseils et son aide tout au long de notre travail.

Nous Tenons à remercier également les membres du jury qui ont accepté d'examiner et de jurer ce travail.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Mlles. KRIBECHE Aicha et HIMERE Tawhida

Egalement à Mrs. BOUZZITE Mohammed, AMIOUR Yassine et RIDA Farih pour leur aide précieuse et chaleureuse.

Un grand merci à nos familles, à nos parents qui nous ont soutenus durant toutes ces années d'études et qui nous ont encouragés sans cesse.

A tous, un grand merci.

A Dieu Le Tout Miséricordieux

*Ton amour, Ta miséricorde et Tes grâces à mon endroit m'ont fortifiée
dans la persévérance et l'ardeur au travail.*

A Ma Mère

*En vous, je vois la maman parfaite, toujours prête à sacrifier pour le bonheur
de ses enfants. Merci pour tout.*

A la mémoire de mon grand-père, ma grand-mère

Ton amour et ta sollicitude à mon égard me marqueront à jamais.

A mes frères, sœurs : Raouf, Amine, Zinédine, Nadia et Faiza

*Qui je le sais ma réussite est très importante pour vous. Que dieu vous paye
pour tous vos bienfaits.*

A mes amies et amis

*Vous qui êtes toujours là pour aider. Merci d'être toujours près pour moi
Surtout Nesrine, Naima, Hadger, Mariama, Farid, Choib et
Abd Elghani.*

A mon groupe du travail

Naima et Sana.

Chahinez

Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents.

À mes sœurs

À mon frère.

À toute ma famille.

À mes très chers amis surtout Chahinez

À mes collègues.

À toute personne qui me connaît.

Naima

A mon cher Père

A ma chère Mère

A mon frère et mes sœurs : Housseem, Hana et Roumaïssa.

A ma cousine et m'amiè fidèle Besma

A tous mes oncles et tantes

A m'amiè Aïcha, et mes collègues : Nadjet, Roukia et Sarah

Sana

SOMMAIRE

| | |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| SOMMAIRE | i |
| LISTE DES FIGURES | v |
| LISTE DES TABLEAUX | vii |
| INTRODUCTION | 1 |
| ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE | |
| CHAPITRE1. LES PLANTES MEDICINALES SELECTIONNEES | |
| 1. La plante <i>Centaurea calcitrapa</i> | 3 |
| 1.1. Place de la plante dans la systématique..... | 3 |
| 1.2. Distribution géographique et habitat | 3 |
| 1.3.Composition chimique et activités biologiques..... | 4 |
| 2. La plante <i>Ranunculus repens L.</i> | 4 |
| 2.1. Place dans la systématique | 4 |
| 2.2. Description de la plante | 5 |
| 2.3. Distribution géographique et habitat | 5 |
| 2.4. Composition chimique et activités biologiques | 5 |
| CHAPITRE 2. STRESS OXYDANT ET FLAVONOIDES | |
| 1. Généralités sur le stress oxydant | 6 |
| 2. Les Flavonoïdes | 7 |
| 2.1. Effets biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes | 7 |
| 2.1. 1 Activité antioxydant des flavonoïdes..... | 8 |
| 2.1. 2. Activité anti alpha –amylase des flavonoïdes..... | 9 |
| CHAPITRE 3. ALPHA AMYLASE | |
| 1. Nomenclature | 10 |
| 2. Définition et localisation | 10 |
| 3. Caractéristiques de l’alpha - amylase | 10 |
| 3.1. Caractéristiques biochimiques et moléculaire | 10 |

SOMMAIRE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. Dépendance de l' α -amylase au NaCl, pH et température | 11 |
| 4. Amidon, principal substrat de l' α -amylase..... | 11 |
| 4.1.Mécanisme d'action..... | 12 |
| 5. L' α -amylase pancréatique et le diabète type II | 12 |

CHAPITRE 4. PARACETAMOL ET HEPATOTOXICITE

| | |
|----------------------------------------------------|----|
| 1. Définition du paracétamol | 14 |
| 2. Caractéristiques pharmacocinétiques..... | 14 |
| 2.1. Absorption | 14 |
| 2.2. Distribution..... | 14 |
| 2.3. Métabolisme..... | 15 |
| 3. Mécanisme d'hépatotoxicité du paracétamol | 16 |

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 5. MATERIEL ET METHODES

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Matériel végétal utilisés | 19 |
| 2. Méthodes | 19 |
| 2.1. Préparation des extraits bruts | 19 |
| 2.2. Analyses phytochimiques des extraits | 20 |
| 2.2.1. Dosage des polyphénols | 20 |
| 2.2.2. Dosage des flavonoïdes | 21 |
| 2.2.2.1. Analyse qualitative des flavonoïdes | 21 |
| 2.2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux | 21 |
| 2.2.3. Chromatographie sur couche mince (CCM) | 22 |
| 2.2.4. Analyse qualitative par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)..... | 23 |
| 3. Etude in vitro des extraits bruts | 24 |
| 3.1Activité anti-radicalaire par le test au DPPH° | 24 |
| 3.1.1Test anti-radicalaire par CCM (analyse qualitative) | 24 |

SOMMAIRE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.2. Test anti-radicalaire contre le DPPH° (analyse quantitative) | 25 |
| 3.2. Mesure de l'activité de l'alpha-amylase (Méthode de coloration iodique d'amidon)..... | 25 |
| 4. Etude in vivo des extraits bruts | 26 |
| 4.1. Conditions d'hébergement des animaux | 26 |
| 4.2. Dosages des paramètres sériques..... | 26 |
| 4.3. Dosages tissulaires | 27 |
| 4.3.1. Dosage du glutathion | 27 |
| 5. Etude statistique | 28 |
| CHAPITRE 6. RESULTAT ET DISCUSSION | |
| 1. Extraction | 29 |
| 2. Etude phytochimique | 29 |
| 2.1. Analyse qualitative | 29 |
| 2.1.1. Chromatographie sur couche mince | 30 |
| 2.1.2. Caractérisation par HPLC | 32 |
| 2.2. Analyse quantitative | 33 |
| 3. Dépistage de l'activité anti-oxydante..... | 35 |
| 3.1. Analyse qualitative..... | 35 |
| 3.2. Analyse quantitative..... | 36 |
| 4. Effet des extraits sur l'activité de l'alpha amylase..... | 37 |
| 4.1. Inhibition de l'alpha amylase..... | 37 |
| 4.2. Cinétique d'inhibition..... | 39 |
| 5. Analyse <i>in vivo</i> de l'effet hépatoprotecteur des extraits..... | 40 |
| 5.1. Les transaminases TGO et TGP..... | 40 |
| 5.2. Taux de glutathion (GSH)..... | 42 |

SOMMAIRE

| | |
|----------------------------------------|-----------|
| CONCLUSION..... | 44 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE..... | 45 |
| ANNEXES | |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : <i>Centaurea calcitrapa</i> | 3 |
| Figure 2 : La plante <i>Ranunculus repens</i> L. | 4 |
| Figure 3 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène..... | 6 |
| Figure 4 : Hélice d'amylose | 11 |
| Figure 5 : Formule développée du paracétamol | 14 |
| Figure 6 : Diagramme représentant les différentes possibilités de métabolisation du paracétamol | 16 |
| Figure 7 : Le mécanisme par lequel le paracétamol (AAP) induit des dommages aux cellules du foie. | 18 |
| Figure 8 : Protocole de préparation des extraits bruts de <i>Centaurea calcitrapa</i> , <i>Ranunculus repens</i> L..... | 20 |
| Figure 9 : Forme libre et réduite du DPPH..... | 24 |
| Figure 10: Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits éthanolique de <i>Centaurea calcitrapa</i> (CC) et <i>Ranunculus repens</i> L.(RR) par CCM (dans le système solvant : BAW 60:15:25)..... | 31 |
| Figure 11 : Chromatogrammes d'HPLC des extraits éthanolique de <i>Ranunculus repens</i> L. et <i>Centaurea calcitrapa</i> | 33 |
| Figure 12: Teneur en polyphénols des extraits éthanoliques de <i>Centaurea calcitrapa</i> (CC) et <i>Ranunculus repens</i> L.(RR)..... | 34 |
| Figure 13 : Teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques de <i>Centaurea calcitrapa</i> (CC) et <i>Ranunculus repens</i> L.(RR)..... | 34 |
| Figure 14 : Profils chromatographiques de l'activité antioxydante sur CCM des extraits éthanoliques de <i>Centaurea calcitrapa</i> (CC) et <i>Ranunculus repens</i> L. (RR)..... | 35 |
| Figure 15 : Activité antioxydante des extraits de plantes (<i>Centaurea calcitrapa</i> et <i>Ranunculus repens</i> L.) et de témoin (Acide ascorbique)..... | 36 |
| Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de l'alpha amylase des extraits éthanoliques de <i>Ranunculus repens</i> L. (RR) et <i>Centaurea calcitrapa</i> (CC)..... | 38 |
| Figure 17 : graphe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat en présence de différentes concentrations d'inhibiteur (extrait éthanolique de <i>Ranunculus repens</i> L.)..... | 39 |
| Figure 18 : Représentation de Lineweaver - burk de l'extrait éthanoliques de la plante « <i>Centaurea calcitrapa</i> » | 40 |

LISTE DES FIGURES

Figure 19 : effet du traitement par paracétamol à une dose de 150 mg/kg et du co-traitement par les extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens L.* à 100 mg/kg sur les taux sériques de TGP et TGO. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n=3).41

Figure 20 : Variation du taux de GSH / g de foie après traitement par le paracétamol 150 mg/kg seule ou associée avec les extraits éthanoliques de *Centaureacalcitrapa*(CC) et *RanunculusrepensL.* (RR) 100 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM(n=3).....43

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes | 23 |
| Tableau 2 : Aspects, couleurs et rendements des extraits des parties aériennes de <i>Centaurea Calcitrapa</i> et <i>Ranunculus repens L.</i> | 29 |
| Tableau 3 : Résultats des réactions de caractérisation des flavonoïdes dans nos extraits | 29 |
| Tableau 4 : Résultats de la séparation par CCM des extraits éthanolique des parties aériennes de <i>Centaurea calcitrapa</i> et <i>Ranunculus repens L.</i> dans le système solvant:B.A.W.(60:15: 25).... | 31 |
| Tableau 5 : Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus par la séparation avec HPLC..... | 32 |
| Tableau 6 : pourcentage d'inhibition et IC50 des extraits bruts et de standard | 36 |
| Tableau 7 : L'activité inhibitrice de l'alpha amylase et les valeurs de CI50 des extraits éthanoliques de <i>Centaurea calcitrapa</i> et <i>Ranunculus repens L.</i> à différentes concentrations..... | 38 |

Introduction

De nos jours, il existe un très grand nombre de médicaments dans le marché médical, mis au service de la santé humaine pour des fins curatifs ou préventifs contre de nombreuses maladies tel que le diabète de type 2 et l'hépatotoxicité. Cependant, la majorité de ces médicaments possèdent des effets secondaires indésirables et dans certains cas sont trop toxiques et onéreux, ce qui limite leur utilisation, raison pour laquelle, les recherches récentes sont dirigées vers la découverte de nouveaux médicaments moins chers, moins toxiques et plus efficaces (Santin et al. , 2010)

Malgré les efforts déployés par les chimistes pour la synthèse de nouvelles molécules, le règne végétal reste un réservoir illimité de variétés de molécules (Karou et al, 2005) à intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacologie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes (Bahorun, 1997).

Les flavonoïdes constituent un groupe de produits naturels appartenant à la famille des polyphénols, largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, faisant partie intégrante de notre nourriture quotidienne. Ils possèdent potentiellement des activités biologiques, anti inflammatoires, anti-cancérigènes, anti-microbiennes, anti-oxydantes et anti-diabétique (Bahorun, 1997).

D'autre part, jusqu'à nos jours, le diabète sucré (type II), maladie métabolique caractérisée par un état d'hyperglycémie chronique, reste l'une des maladies chroniques les plus graves se développe dans la population mondiale. Une des approches thérapeutiques pour diminuer l'hyperglycémie postprandiale est de retarder l'absorption de glucose par l'inhibition d'enzymes hydrolysant les hydrates de carbone, par exemple l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase dans le tube digestif (Sneha et al, 2011).

Le foie, organe carrefour par où transite la majorité des composés absorbés au sein du tube digestif et malgré son arsenal de défense, peut être le siège de cytolysse (hépatotoxique) d'origine médicamenteuse suite à un surdosage accidentel ou délibéré. Parmi ces médicaments, le paracétamol dont le surdosage est responsable de la mort par hépatolyse aigue aux USA (Cover et al, 2005).

A cet égard, nous avons choisi, sur la base de l'utilisation traditionnelle, deux plantes médicinales pour essayer de pallier aux thérapeutiques déjà existantes des troubles cités ci-dessus: *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens* L.

Pour cela, nous avons jugés utile d'estimer les vertus de ces deux plantes à travers deux études. Etude *in vivo*, sur des souris ayant reçus une dose aigue de paracétamol, afin de provoquer une hépatolyse. D'autre part étudier l'effet protecteur d'extraits bruts issus des deux plantes.

L'autre étude *in vitro*, comportant une

- Analyse quantitative et qualitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits ethanoliqes de *Centaurea calcitrapa* et de *Ranunculus repens* L.
- Evaluation de l'activité anti-radicaliare des extraits du *Centaurea calcitrapa* et de *Ranunculus repens* L. vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH°).
- Evaluation de l'activité anti-alpha amylasique des extraits du *Centaurea calcitrapa* et du *Ranunculus repens* L.

Etude bibliographique

1. La plante *Centaurea calcitrapa*

Cette plante appartient au genre *Centaurea* qui fait partie de la famille des Asteraceae, une des plus grandes familles des dicotylédones. Cette famille est ré pondue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées et elle est moins fréquente dans les forêts tropicales humides (Ufik et al,2009).

Le genre *Centaurea* comprend plus de 500 espèces dans le monde la plus part des *Centaureés* croissent autour du bassin méditerranée (Gousiadou et Skaltsa, 2003).

1.1. Place de la plante dans la systématique

Selon la classification scientifique classique (Faris et al,1989):

Règne : Plantae
 Sous règne : Tracheobionta
 Division : Magnoliopsida
 Classe : Magnoliopsida
 Sous classe : Asteridae
 Ordre : Asterales
 Famille : Asteraceae
 Genre : *Centaurea*
 Espèce : *Centaureacalcitrapa*
 Nom arabe : Bounaggar
 Nom commun : Chardon étoile



Figure 1 : *Centaurea calcitrapa* (région de Kaous Avril 2013).

1.2. Distribution géographique et habitat :

La Centauré calcitrape est présente en Europe (Hongrie, Suisse, la Tchécoslovaquie, la Fédération de Russie, l'Ukraine, l'Albanie, Grèce, Italie, Roumanie, Yougoslavie, France, Portugal, Espagne), Asie tempéré (Chypre, Liban, Syrie, Turquie) et en Afrique du Nord (Algérie, Egypte, Maroc, Tunisie) (kaya et al, 2010).

Centaurea calcitrapa survient surtout dans les régions tempérées. Elle se trouve sur une large gamme des sols, mais peut se développer très bien dans les sols lourds, fertiles et humides. Elle pousse dans les pâturages pauvres, le long des routes et les zones négligées. (Reis et al, 2000).

1.3. 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 d'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 des flavonoïdes (Karamenderes et al, 2006).

Dans la médecine traditionnelle, *Centaurea calcitrapa* est utilisée fréquemment dans le traitement de la fièvre, et utilisée comme diurétique (Yayli et al, 2004), mais jusqu'à maintenant, très peu d'études ont décrit leurs propriétés biologiques importantes. Cependant, une étude récente a rapporté que *Centaurea calcitrapa* possède vraiment des propriétés anti-pyrétiques, qui ont déjà été signalées par Ibn Bitar, « Le Chardon étoilé est salutaire contre les fièvres anciennes » (Yayli et al, 2004). En outre, une autre étude a montré ses propriétés antioxydantes et cytotoxiques (Pieroni et al, 2002).

2. La plante *Ranunculus repens* L.

Les ranuncules sont un genre de plantes herbacées, annuelles ou vivaces, de la famille des Renonculacées comportant près de 1500 espèces. Elles ont un port très différent selon les espèces et sont le plus souvent des végétaux herbacés vivaces. Aux latitudes tropicales, ce sont plutôt des plantes d'altitude (Fournier, 1961).

2.1. Place dans la systématique (Pierre, 2003)

Phylum : Dictyotylédone.

Famille : Ranunculaceae.

Ordre : Ranale ou polycarpique.

Genre: *Ranunculus*.

Espèce: *Ranunculus repens* L.

Nom Arabe: Mergheris (El-houdane).

Nom commun : Ranunculus rampante



Figure 2 : la plante *Ranunculus repens* L. (région de Taher Avril 2013).

2.2. Description de la plante

Ranunculus repens L. est une plante vivace et rampement, qui s'accroît jusqu'à 91 centimètres de hauteur. Elle émet des rameaux formant des stolons enracinés. Les tiges sont plus ou moins velues, pluri florales, redressées (Welsh, 1974). Les fleurs sont peu, voyantes, jaune et isolées en sommet de tige ou associées en groupes lâches, elles sont également portées par un pédoncule long et pubescent, avec des poils appliqués sur le pédoncule, qui est cannelé. Elles présentent 30 à 50 étamines libres (Douglas et Meidiger, 1999).

2.3. Distribution géographique et habitat

Ranunculus repens L. est indigène à l'Europe, où sa gamme se prolonge au nord en Norvège. Elle a naturalisé dans beaucoup des régions tempérées autour du monde, y compris l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud, l'Asie, l'Afrique, l'Australie, et la Nouvelle-Zélande (Hultén, 1968).

Ranunculus repens L. se développe dans des secteurs dérangés, jardins, prairies, régions boisées, et les communautés semi-aquatiques, telles que des marais, accumulent des marges, des fleuves, et des fossés (Harper, 1957).

2.4. Composition chimique et activités biologiques

Jusqu'à nos jours, aucune étude phytochimique n'a eu pour objet la détermination de la composition chimique de *Ranunculus repens* L. Dans la médecine traditionnelle, les feuilles séchées sont utilisées sous forme d'infusion pour traiter le diabète sucré et la jaunisse en petite Kabylie (Est D'Algérie) (Kebieche, 2009).

Une étude récente effectuée par Kebieche et al, (2011) a démontré que les extraits de flavonoïdes de *Ranunculus repens* L. ont une vertu thérapeutique anti-diabétique et un fort potentiel antioxydant et anti-radicalaire lui conférant ainsi un effet cytoprotecteur.

1. Généralités sur le stress oxydant

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leurs destructions par des systèmes de défense antioxydants. Les radicaux libres, forme particulière des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire ou non apparié, peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques (Angelos et al, 2005 ; Wolin et al, 2005 ; Wassmann et al, 2004).

Par ailleurs, l'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle (OH^{\cdot}), mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Favier, 2003).

La formation de radicaux libres dans le corps humain peut causer des dommages aux cellules et engendrer des pathologies, tels le cancer et les maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la Maladie de Parkinson (Aurousseau, 2002).

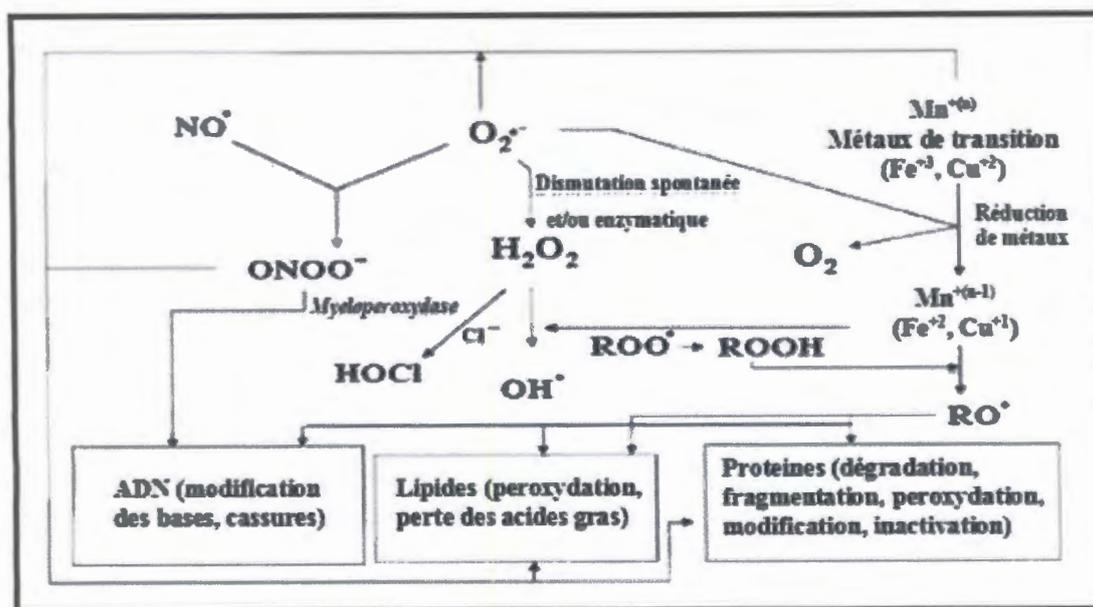


Figure 3 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Kohen et Nyska, 2002).

D'autre part, l'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défense très efficaces contre la surproduction des ROS. Dans le système de défense antioxydant de notre organisme, on distingue des systèmes enzymatiques tels que les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT) et les glutathions peroxydases (Gattás et al, 2004), et des systèmes non enzymatiques parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, les

hormones sexuelles, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit. D'autres composés, tels que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), les caroténoïdes, apportés par les aliments ou d'autres composés naturels comme les flavonoïdes, les dérivés d'acide phénolique et plusieurs autres molécules extraites à partir des fruits et des légumes, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Vertuani et al, 2004).

Il importe de savoir que le terme antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Wassmann et al, 2004).

2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin « flavus », signifiant « jaune », désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments des végétaux. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaunes, mais aussi d'autres couleurs ou incolores (Havsteen, 2002).

Dans les plantes, la majorité des flavonoïdes sont sous forme glycosylée soit sous forme de C- ou O- glycosides (Sugiyama et al, 1997), ils peuvent occasionnellement y être présents sous forme aglycone (Ishii et al, 2003). La plupart des flavonoïdes aglycones sont hydrophobes. Alors que la liaison d'un groupement glucidique à un flavonoïde diminue son hydrophobicité et facilite leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines. (Benavente- Garcia et al, 1997 ; Williamson et al, 2000).

2.1. Effets biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

La principale propriété, initialement attribuée aux flavonoïdes, est d'être vasculoprotectrices et veinotoniques, car ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (Bruneton, 1999). Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmaco-biologiques comme entre autres des effets, antiviraux (Pietro et al, 2002), antimicrobiens et anticancéreux (Narayana et al, 2001 ; Seyoum et al, 2006), antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépatoprotecteurs (Middleton et al, 2000). Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés Antioxydantes de ces composés naturels.

2.1.1. Activité antioxydante des flavonoïdes

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes, qui sont thermo dynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants ($R\cdot$) comme le superoxyde, le radical peroxyde, le radical alkoxy et le $OH\cdot$ par transfert d'hydrogène. Le radical aroxyde résultant ($Fl-O\cdot$) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (Rice-Evans, 1996).

En effet, de nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres (Cotelle, 2001 ; Seyoum et al, 2006). Ces travaux ont pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants (Hendrich, 2006) :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C_2-C_3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité antiradicalaire des flavonoïdes.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C_2-C_3 augmente également la capacité antiradicalaire des flavonoïdes.

En outre, les flavonoïdes sont considérés comme des bons chélateurs des ions métalliques comme le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) (Brown, 1998). Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs (1996) sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont pu ressortir les sites potentiels pour la chélation des ions métalliques, un noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Pietta, 2000).

Par ailleurs, les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du $O_2^{\bullet-}$ et d'autres ROS, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipooxygénase, monooxygénase microsomales, et la glutathion S-Transférase. (Marfak, 2003).

2.2.2. Activité anti-alpha-amylase des flavonoïdes

La majorité des études récentes sont concentrées sur l'activité anti alpha-amylase des composés phénoliques. Afin de déterminer le mécanisme par lequel les flavonoïdes inhibent l'alpha amylase. Piparo et al, (2008), ont étudié l'interaction entre les flavonoïdes et α -amylase humaine. Ils ont montré que la puissance de l'inhibition est corrélée avec le nombre de groupes hydroxyles sur le cycle B du squelette flavonoïde, et les interactions se produisent par la

formation des liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyle en position R6 ou R7 du cycle A et la position R4 'ou R5' du cycle B des ligands polyphénols avec les résidus catalytiques du site de liaison de l'enzyme. Ainsi, la formation d'un système π -conjugué qui permet de stabiliser l'interaction avec le site actif. De ce fait, les flavonoïdes sont des inhibiteurs d' α -amylase. En revanche, les groupes de flavonols (narcisine, quercétine, rutine) (Al-Dabbaset al, 2006) et groupe de flavones (Luteoline, apigetrine, scutellareine) sont observés comme les inhibiteurs les plus puissants (Kim et al, 2000 ; Funkeet Melzing, 2006).

Alpha-amylase

1. Nomenclature

Nom systématique : α -(1-4) D-glucanoglucanohydrolase.

Nom codifié : E. C. 3.2.1.1

Nom recommandé : Alpha-amylase.

Synonymes: glycogenase, endoamylase, maxilase, taka amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, anylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin (Graber, 1989).

2. Définition et localisation

L'alpha-amylase, comme toutes les enzymes, est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons α -(1,4) glycosidiques des composants d'amidon, du glycogène, et de divers oligosaccharides.

Chez les mammifères, elle est présente à la fois dans la salive et les sécrétions du pancréas. Les comparaisons de séquences d'acides aminés ont montré qu'il existe un degré élevé d'identité entre l'alpha-amylase pancréatique des humains, des porcs, des souris et des rats (Pasero et al, 1986 ; Minxie et al, 1997 ; Michelle de sales et al, 2012).

Chez l'Homme, on trouve deux isoformes d' α -amylase, l' α -amylase salivaire humaine (HSA) et l' α -amylase pancréatique humaine (HPA). La digestion initiale de l'amidon commence dans la bouche où HSA dégrade l'amidon polymère en oligomères plus courts (Michelle de sales et al, 2012). La digestion est ensuite effectuée par l'HPA et l'hydrolysate résultant contient principalement du maltose, maltotriose, et d'autres α -(1,6) et α -(1,4) oligoglucanes. Ces composés peuvent être dégradés en glucose par d'autres α -glucosidases (Mizuno et al, 2008).

3. Caractéristiques de l'alpha-amylase**3.1. Caractéristiques biochimiques et moléculaires**

Les α -amylases ont la capacité d'hydrolyser les liaisons de types α (1-4) glycosidiques à l'intérieur des chaînes d'amidon, des maltodextrines et malto-oligosaccharides. Ce sont donc des endo-enzymes (Payan, 2004), elles sont constituées de 496 acides aminés dans une chaîne polypeptidique unique avec un ion chlorure et un ion calcium. Ces deux ions sont essentiels pour la stabilité de α -amylase ; elles sont donc des métalloenzymes (Brayer et al, 2000).

L' α -amylase humaine est composée de 512 acides aminés en une seule chaîne oligosaccharidique avec un poids moléculaire de 57,6 kDa (Whitcomb et Lowe, 2007). Il ya cinq gènes d' α -amylase regroupés dans le chromosome 1, au lieu 1q21, chez l'homme. Trois d'entre

Alpha-amylase

eux codent pour l' α -amylase salivaire, AMY1A, AMY1B et AMY1C, et les deux autres gènes AMY2A et AMY2B sont exprimés dans le pancréas (Gumucio et al, 1998 ; Michelle de sales et al, 2012). L' α -amylase humaine salivaire et pancréatique partage un grand degré de similarité aux séquences des acides aminés avec 97 % des résidus identiques en général et 92 % dans le domaine catalytique (Michelle de sales et al, 2012).

Les acides aminés 304-310 sont conservés dans l' α -amylases des mammifères et sont soupçonnés d'être impliqués dans le mécanisme enzymatique (Cozzone et al, 1970).

3.2. Dépendance de l' α -amylase au NaCl, pH et température

L' α amylase fait partie des protéines halophiles (Tan et al, 2008), protéines inactives ou instables à faibles concentrations du sel. Mais, l'amylase a été encore active 45 % à l'absence du sel. Avec l'amidon soluble en tant que substrat, l'enzyme conserve l'activité de 20 % dans la gamme de pH 5.2 à 9.3, avec un optimum à pH 7.

D'autre part, l' α -amylase est une enzyme thermophile, *i.e.*, active dans une gamme de température relativement large. Dans une gamme de températures de 37 à 80°C, l'enzyme conserve une activité de 40 % sur l'amidon soluble, avec un optimum à 65°C (Tan et al, 2008).

4. Amidon, principal substrat de l' α -amylase

L'amidon est un polymère de glucose où les liaisons se font entre les fonctions alcools portées par les carbones 1-4 et 1-6. En réalité les amidons sont constitués d'un mélange d'amylose (liaison 1-4) et d'amylopectine (liaison 1-6) qui permettent de réaliser des ramifications de l'arbre de l'amidon (Dupin et al, 1992). Les structures de l'amylose et amylopectine sont représentées dans les schémas ci-dessous :

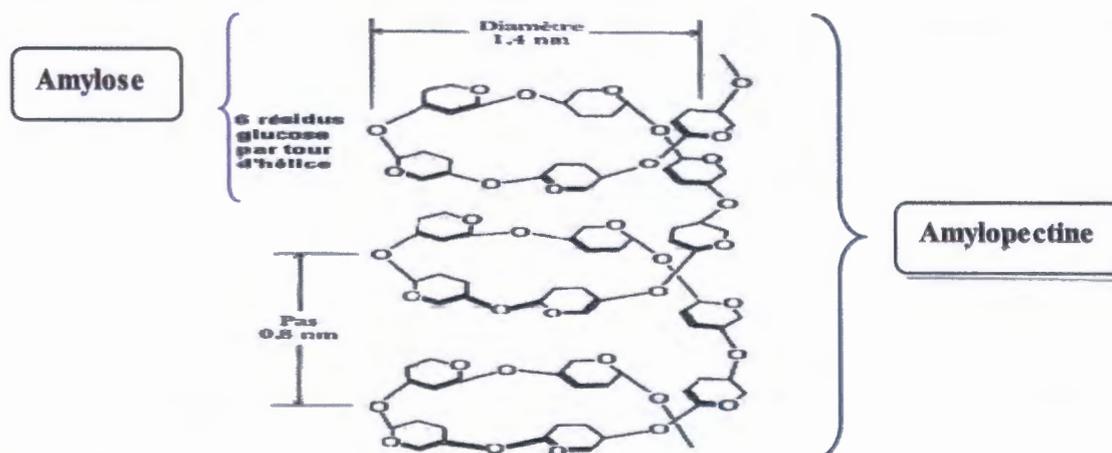


Figure 4 : Hélice d'amylose (Chiba, 1988).

1. Définition du paracétamol

Le paracétamol, de formule brute « $C_8H_9NO_2$ », est la dénomination commune internationale (DCI) de la substance active de plusieurs spécialités pharmaceutiques de la classe des antalgiques-antipyrétiques. Son nom chimique systématique est « para-acétamido-phénol » (Figure 5). Il est néanmoins désigné par acétaminophène. Quant à son nom commun « paracétamol », il est dérivé de la contraction de son nom chimique systématique (Olaleye et Rocha, 2008).

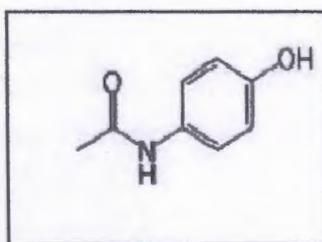


Figure 5 : Formule développée du paracétamol (Olaleye et Rocha, 2008).

2. Caractéristiques pharmacocinétiques

2.1. Absorption

Administré par voie orale, le paracétamol est rapidement et presque totalement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal par diffusion passive. L'absorption est beaucoup plus rapide dans l'intestin grêle que dans l'estomac. Quoiqu'elle soit un peu ralentie par l'alimentation, l'absorption permet l'obtention d'un pic plasmatique au bout de 30 à 60min après ingestion (James et al., 2003).

Le paracétamol subit une biotransformation hépatique dès le premier passage hépatique, quant à sa biodisponibilité absolue, elle est satisfaisante et avoisine les 80%, voire les 90% pour les formes effervescentes (Thomas, 1993).

2.2. Distribution

La distribution du paracétamol est rapide et uniforme: il diffuse dans tous les milieux liquidiens (sang, liquide céphalorachidien, salive, lait, liquide interstitiel) et tissus de l'organisme. Sa liaison aux protéines plasmatiques est faible (15 à 20 %) et son volume de distribution varie de 0,9 à 1 l/kg (James et al., 2003).

2.3. Métabolisme

La demi-vie plasmatique du paracétamol est d'environ 2h. Elle est très courte et témoigne ainsi d'une forte métabolisation dont ce médicament fait l'objet au niveau de l'organisme. Le métabolisme du paracétamol est essentiellement hépatique en raison de la situation « carrefour » du foie, du débit sanguin élevé et de la richesse en enzymes diverses de cet organe. Il est aussi rénal, mais accessoirement (Nagi et al., 2010). Dans le foie comme dans les reins, le paracétamol est substrat d'enzymes microsomaux (des transférases et des oxydases) qui le conjuguent en dérivés très hydrosolubles donc facilement excrétables (Figure 6) (James et al., 2003)

Les transférases microsomaux appartiennent à deux sous classes différentes : l'uridine diphosphate glucuronyl transférase (UDP-glucuronyl transférase) dont l'acide uridine-5'-diphospho- α -D-glucuronique (en abrégé : UDPGA) est le coenzyme, qui transforme le paracétamol en un dérivé glucuroconjugué par transfert de groupement glucuronate porté par le coenzyme, la sulfotransférase dont le coenzyme est le 3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (en abrégé : PAPS), qui transforme le paracétamol en un dérivé sulfoconjugué par le transfert de groupement sulfate inorganique porté par le coenzyme (Thomas, 1993 ; Olaley et Rocha, 2008). Les oxydases sont des mono-oxygénases à cytochrome P450, essentiellement les cytochromes CYP2E1 et CYP3A4, qui transforment le paracétamol en N-Acetyl-p-Benzoquinone-imine (en abrégé : NAPQI) qui est ensuite conjugué au glutathion (Kumari et Kakkar, 2012).

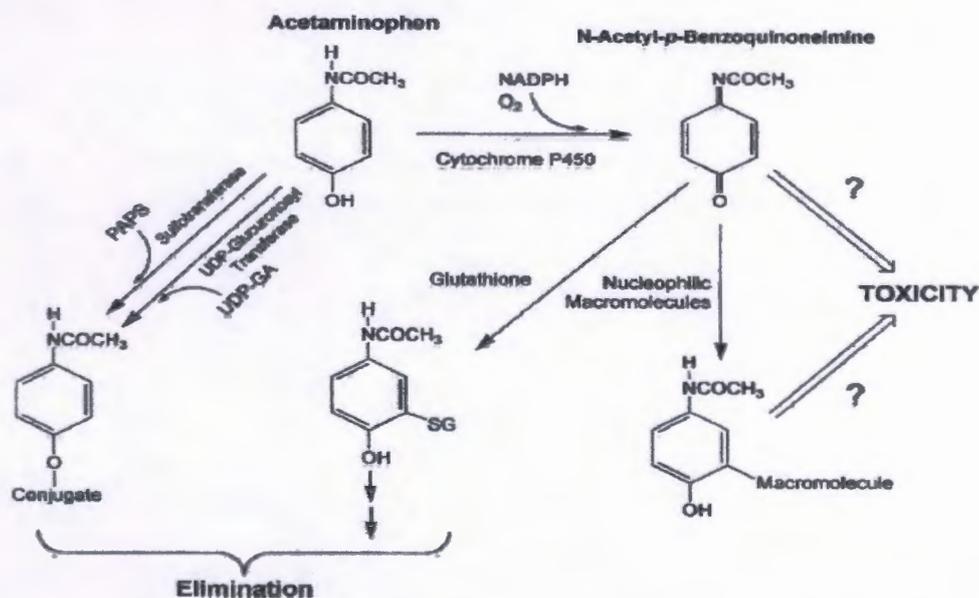


Figure 6 : Diagramme représentant les différentes possibilités de métabolisme du paracétamol (James et al., 2003)

oxydation des lipoprotéines de basse densité, l'activation des plaquettes et de génération de thrombine (Chitra et al, 2013). Par conséquent, le retard de digestion de l'amidon par l'inhibition de l' α -amylase jouerait un rôle clé dans le contrôle du diabète (Radulian et al, 2009).

Certains inhibiteurs actuellement utilisés en clinique sont l'acarbose et le miglitol qui inhibent les glycosidases comme α -glucosidase et α -amylase tandis que d'autres tels que voglibose et inhibent α -glucosidase. Cependant, beaucoup de ces agents hypoglycémiants synthétiques peuvent produire des effets secondaires graves et ne parviennent pas à élever les complications diabétiques. Les principaux effets secondaires de ces inhibiteurs sont à savoir gastro-intestinal, des ballonnements, des douleurs abdominales, la diarrhée et les flatulences (Sudha et al, 2011).

Par ailleurs, des constituants végétaux ayant une activité inhibitrice enzymatique comprennent les composés polyphénoliques et des glycoprotéines. Par exemple, des anthocyanes et des ellagitanins présents dans les framboises et les fraises ont été signalés à inhiber l'activité de l' α -glucosidase et de l' α -amylase, respectivement (Tundis et al, 2010). En outre, les theaflavins et les catéchines présentes dans le thé vert et noir ont été rapportés à inhiber l' α -amylase (Barrett et Udani, 2011).

En outre, un nombre de légumes et d'extraits de plantes riches en polyphénols, principalement des flavonoïdes ont montré une activité inhibitrice de l' α -amylase et α -glucosides, et sont donc considérés comme agents antidiabétiques alimentaires pour le contrôle d'hyperglycémie postprandiale (Oboh et al, 2012 ; Chitra et al, 2013). Les plantes médicinales ont une grande importance dans le traitement du diabète car ils sont exempts d'effets secondaires et ils sont moins coûteux par rapport aux hypoglycémiants synthétiques. (Sneha, 2011 ; Chitra et al, 2013).

1. Définition du paracétamol

Le paracétamol, de formule brute « $C_8H_9NO_2$ », est la dénomination commune internationale (DCI) de la substance active de plusieurs spécialités pharmaceutiques de la classe des antalgiques-antipyrétiques. Son nom chimique systématique est « para-acétamido-phénol » (Figure 5). Il est néanmoins désigné par acétaminophène. Quant à son nom commun « paracétamol », il est dérivé de la contraction de son nom chimique systématique (Olaleye et Rocha, 2008).

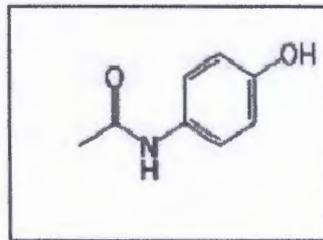


Figure 5 : Formule développée du paracétamol (Olaleye et Rocha, 2008).

2. Caractéristiques pharmacocinétiques

2.1. Absorption

Administré par voie orale, le paracétamol est rapidement et presque totalement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal par diffusion passive. L'absorption est beaucoup plus rapide dans l'intestin grêle que dans l'estomac. Quoiqu'elle soit un peu ralenti par l'alimentation, l'absorption permet l'obtention d'un pic plasmatique au bout de 30 à 60min après ingestion (James et al, 2003).

Le paracétamol subit une biotransformation hépatique dès le premier passage hépatique, quant à sa biodisponibilité absolue, elle est satisfaisante et avoisine les 80%, voire les 90% pour les formes effervescentes (Thomas, 1993).

2.2. Distribution

La distribution du paracétamol est rapide et uniforme: il diffuse dans tous les milieux liquidiens (sang, liquide céphalorachidien, salive, lait, liquide interstitiel) et tissus de l'organisme. Sa liaison aux protéines plasmatiques est faible (15 à 20 %) et son volume de distribution varie de 0,9 à 1 l/kg (James et al, 2003).

2.3. Métabolisme

La demi-vie plasmatique du paracétamol est d'environ 2h. Elle est très courte et témoigne ainsi d'une forte métabolisation dont ce médicament fait l'objet au niveau de l'organisme. Le métabolisme du paracétamol est essentiellement hépatique en raison de la situation « carrefour » du foie, du débit sanguin élevé et de la richesse en enzymes diverses de cet organe. Il est aussi rénal, mais accessoirement (Nagi et al., 2010). Dans le foie comme dans les reins, le paracétamol est substrat d'enzymes microsomaux (des transférases et des oxydases) qui le conjuguent en dérivés très hydrosolubles donc facilement excrétables (Figure 6) (James et al., 2003)

Les transférases microsomaux appartiennent à deux sous classes différentes : l'uridine diphosphate glucuronyl transférase (UDP-glucuronyl transférase) dont l'acide uridine-5'-diphospho- α -D-glucuronique (en abrégé : UDPGA) est le coenzyme, qui transforme le paracétamol en un dérivé glucuroconjugué par transfert de groupement glucuronate porté par le coenzyme, la sulfotransférase dont le coenzyme est le 3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (en abrégé : PAPS), qui transforme le paracétamol en un dérivé sulfoconjugué par le transfert de groupement sulfate inorganique porté par le coenzyme (Thomas, 1993 ; Olaleye et Rocha, 2008). Les oxydases sont des mono-oxygénases à cytochrome P450, essentiellement les cytochromes CYP2E1 et CYP3A4, qui transforment le paracétamol en N-Acétyl-p-Benzoquinone-imine (en abrégé : NAPQI) qui est ensuite conjugué au glutathion (Kumari et Kakkar, 2012).

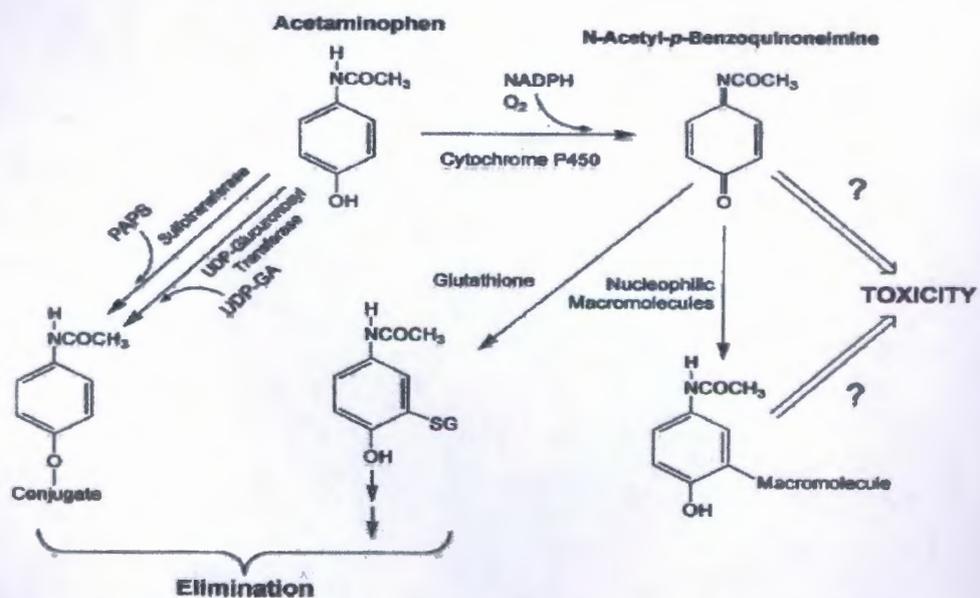


Figure 6 : Diagramme représentant les différentes possibilités de métabolisme du paracétamol (James et al., 2003)

D'un part l'importance de la glucuroconjugaison sur les autres formes de conjugaison, environ 55% du paracétamol ingéré subit une glucuroconjugaison. La sulfoconjugaison intervient quant à elle, pour 35% environ, alors que l'oxydation pour seulement 7% (Kupeli et al., 2006).

3. Mécanisme d'hépatotoxicité du paracétamol

Suite à des doses toxiques d'acétaminophène, le métabolite NAPQI épuise le réserve en glutathion, ce métabolite réactif va se lier de façon covalente aux protéines cellulaires y compris les protéines de la membrane plasmique et de mitochondrie (Smith et Jaeschke, 1989) ce qui entraîne une réduction de l'activité de l'ATPase et une augmentation de Ca^{+2} cytosolique (Wendel et al, 1988). Ces modifications directe sur les protéines mitochondriales et sur le taux d'absorption de Ca^{+2} peut à la fois conduire à la réduction de la respiration mitochondriale et de la synthèse d'ATP (Jaeschke et al, 2003).

En plus de la réduction des niveaux cellulaires de l'ATP, les mitochondries génèrent des quantités accrues de superoxyde, ce qui entraîne une augmentation des taux de peroxydes intracellulaires, provoquant un stress oxydatif par l'intermédiaire d'un mécanisme de Fenton (Brand et al, 2004). Ce mécanisme implique la réduction du peroxyde par les ions ferreux en formant le radical hydroxyle hautement réactif qui peut à son tour oxyder les lipides conduisant à l'initiation de la peroxydation des lipides, ainsi que l'oxydation des protéines et des acides nucléiques (Casteilla et al, 2001).

A cet égard, Younes et al (1986) a rapporté que l'administration d'acétaminophène à des souris n'a pas causé de peroxydation lipidiques (expiration éthane), mais l'administration simultanée de sulfate ferreux a provoqué une augmentation de la peroxydation lipidique. Par la suite, Gibson et al, (1996) ont examiné les aldéhydes protéines hépatiques chez les souris traitée à des doses toxiques de l'acétaminophène. Comme avec la peroxydation lipidique, la formation d'aldéhyde protéine est également médiée par un mécanisme de Fenton.

En effet, Le stress oxydatif comprend non seulement la réaction du Fenton :

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{+3}$$

mais implique également de l'oxydenitrique (NO), qui réagit rapidement avec le superoxyde pour former le peroxyde nitrite. Le Peroxyde nitrite est à la fois un agent oxydant et un agent de nitration. Il est détoxifié par le glutathion (Sies et al, 1997), qui est épuisée par NAPQI dans l'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène (Mitchell et al, 1973).

En outre, le peroxy-nitrite conduit à la formation du biomarqueur de 3-nitrotyrosine et de protéines nitrées, qui sont utilisés comme biomarqueurs de stress azoté (Beckman et Koppenol, 1996). Les seuls hépatocytes qui développent une nécrose sont ceux où le stress oxydatif se produit, et suggèrent en outre que l'oxygène réactif et les composés azotés sont essentiels pour le développement de la toxicité d'acétaminophène (Hinson et al., 1998).

Alors que la mort cellulaire par nécrose est consécutive à l'ouverture des pores de transition mitochondriaux au niveau de la membrane interne, induisant une diminution des capacités de production de l'ATP (Chen et al., 2008), les mécanismes d'apoptose provoquent l'ouverture de pores et canaux au niveau de la membrane externe. Ces pores de la membrane externe permettent le relargage de protéines pro-apoptotiques de l'espace membranaire vers le compartiment cytosolique (Antonsson et al., 2000). La quantité intracellulaire d'ATP est un facteur primordial dans l'aiguillage de l'hépatocyte vers la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose.

En effet, les phénomènes de nécrose se produisent alors même que les stocks cellulaires en ATP sont effondrés, contrairement à l'apoptose (Dejean et al., 2005).

Les travaux de Kon ont montré que les cultures d'hépatocytes mourraient essentiellement par nécrose lors d'intoxication au paracétamol. L'adjonction de fructose, générateur d'ATP, et de glycine, stabilisant de membrane, promeut à l'inverse l'apoptose. L'ensemble de ces constatations permet d'inscrire les transitions de perméabilité mitochondriale, induites par l'intoxication au paracétamol, au sein de l'aiguillage de la mort cellulaire, intimement lié à l'inhibition respiratoire mitochondriale (Kon et al., 2007).

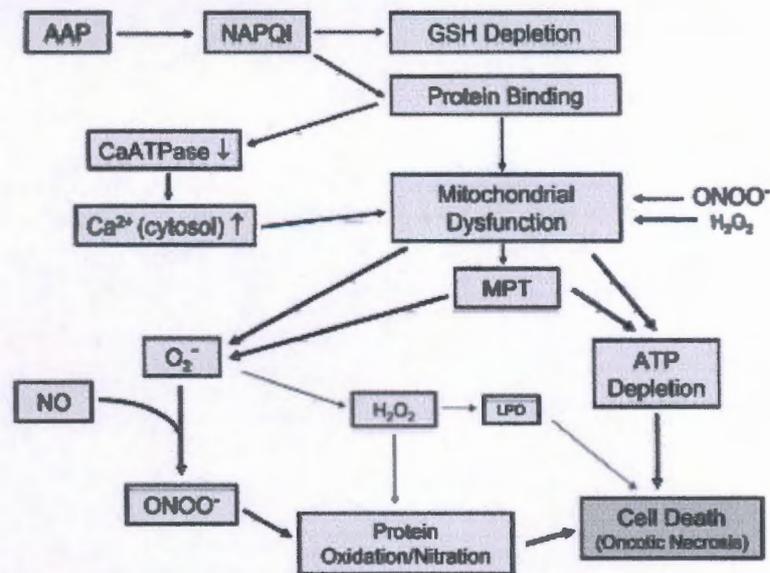


Figure 7: Le mécanisme par lequel le paracétamol (AAP) induit des dommages aux cellules du foie. MPT, transition de perméabilité de la membrane mitochondriale ; NAPQI, N-acétyl-p benzoquinone imine ; NO, oxyde nitrique ; LPO, peroxydation des lipides ; ONOO, peroxy nitrite (Jaeschke et al., 2003).

Matériel et Méthodes

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de pharmacologie du département de biologie à l'université de Jijel. Il est consacré à l'évaluation de l'effet de l'extrait des plantes *Centaurea calcitrapa*, *Ranunculus repens* L., sur l'activité de l'alpha amylase et leurs effets antiradicalaires *in vitro* ainsi que l'activité antioxydante contre le stress oxydant du paracétamol chez les souris.

1. Matériel végétal utilisé

Le matériel végétal ou les plantes qui ont fait l'objet de notre étude, il s'agit de *Centaurea calcitrapa*, *Ranunculus repens* L. La récolte a été réalisée au cours du Mois d'Avril 2013, au niveau des deux régions de la wilaya de Jijel: Kaous (*Centaurea calcitrapa*) et Taber (*Ranunculus repens* L.). Après élimination des parties mortes et lavage, les parties aériennes des deux plantes sont coupées en petits morceaux pour subir un séchage dans une étuve à 37 °C pendant 4 à 5 jours à l'abri de la lumière. Enfin, les plantes sèches sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique suivie d'un tamisage pour obtenir de fines poudres qui ont servi à la préparation des différents extraits.

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits bruts

Les extraits éthanoliques ont été obtenus par trois macérations successives, sous agitation permanente, des poudres des plantes pendant 24 h dans un mélange éthanol/eau (80 /20 : V/V). Le rapport solvant/poudres des plantes était de 1/10 (ml/g).

Après filtration sur papier Wattman, les filtrats sont conservés dans des flacons sombres au réfrigérateur pendant 72 h. Après décantation, une distillation de l'éthanol, sous pression réduite, est réalisée au rotavapor à 55 °C jusqu'à séchage complet. Les résidus secs ont été repris avec de l'eau distillée avec un rapport de 1/10 (p/v) pour chaque extrait (Marston et Hostettmann, 2006).

Le pourcentage de rendement de chaque extrait des plantes a été calculé selon l'équation :

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

L'extrait aqueux de chaque plante a été épuisé par l'éther de pétrole (v/v) dans une ampoule à décanter afin d'éliminer la chlorophylle et les lipides. Après élimination de la phase organique, la phase aqueuse obtenue représente l'extrait brut riche en molécules actives qui a servi à l'analyse phytochimique et le dépistage, qualitatif et quantitatif, de l'activité antiradicalaire et l'activité anti alpha amylasique ainsi qu'à l'étude *in vivo*.

Matériel et Méthodes

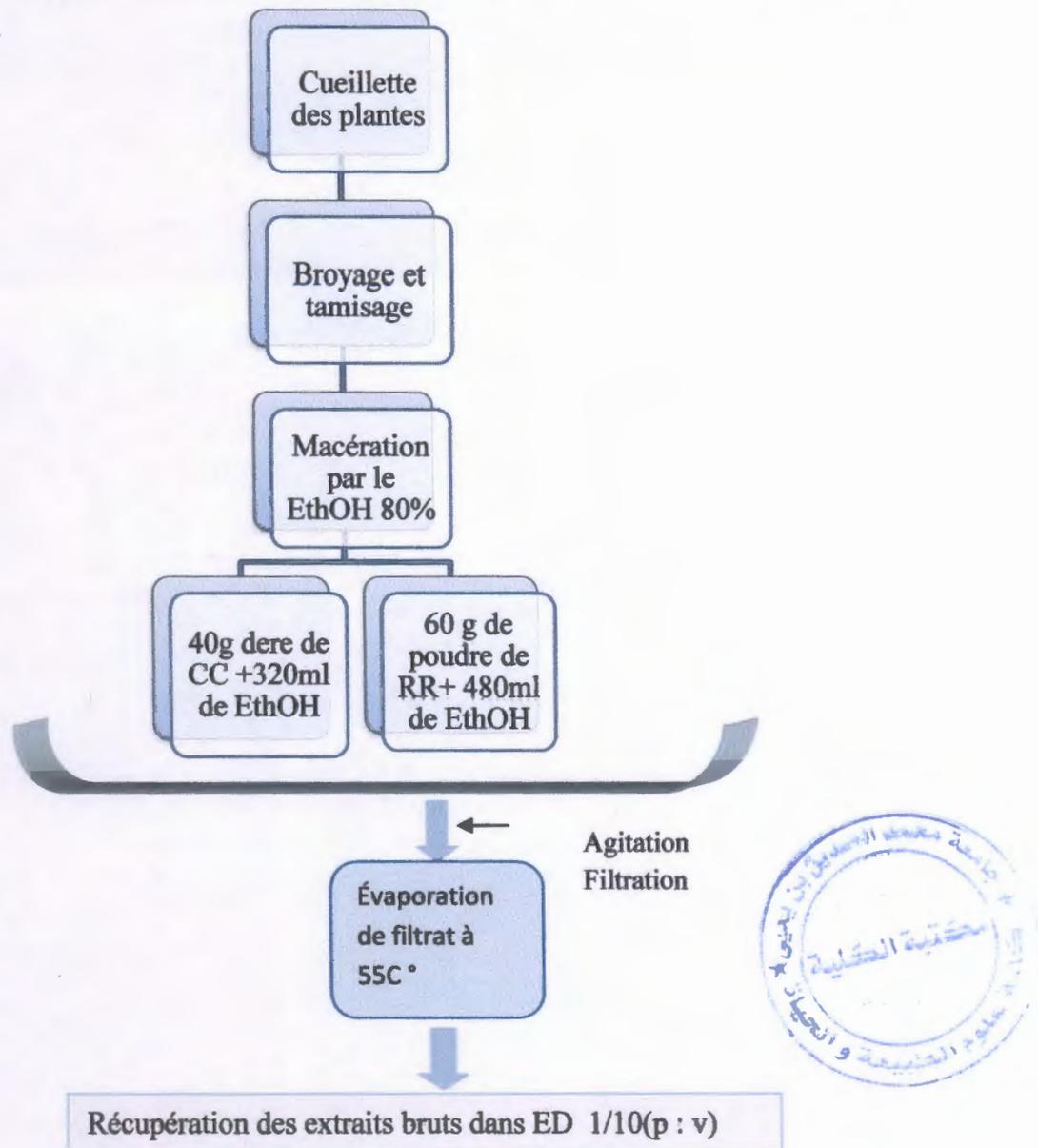


Figure 8 : Protocole de préparation des extraits bruts de *Centaurea calcitrapa*, *Ranunculus repens* L. CC : *Centaurea calcitrapa*, RR : *Ranunculus repens* L., ED : eau distillé, EthOH : éthanol.

2.2. Analyses phytochimiques des extraits

2.2.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode colorimétrique de FolinCiocalteu (McDonald et al, 2001).

Principe

Le dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune

acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (Daels-rakotoarison, 1999).

Mode opératoire

Un aliquote dilué dans l'eau distillée de chaque extrait (100 μ L) est mélangé à 500 μ L de réactif de Folin Ciocalteu (dilué au 1/10), le mélange réactionnel est laissé 5 min à température ambiante puis addition de 400 μ L de Na₂CO₃ (75g/l dans de l'eau distillée). Après incubation pendant 30min à l'abri de la lumière, l'absorbance est déterminée au spectrophotomètre à 765nm.

La quantité de composés phénoliques totaux a été déterminée par l'étalon réalisé avec différentes concentrations d'acide gallique dans le méthanol : eau (50:50, v/v) (0-200 μ g/ml). La teneur en polyphénols est exprimée en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ gEqAG/mg d'ext).

2.2.2. Dosage des flavonoïdes

2.2.2.1. Analyse qualitative des flavonoïdes

Ils sont recherchés dans les extraits aqueux par la méthode *Shibata* ou réaction à la cyanidine.

1 ml de l'extrait à étudier est dissout dans du méthanol à 50 %. On y ajoute un fragment de tournure de magnésium (0.5g) puis quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) concentré. Il se produit une réaction exothermique mousseuse. À la fin d'une réaction positive il apparaît :

- ❖ Une coloration rouge indiquant la présence des flavonols aglycones ;
- ❖ Une coloration orange indiquant la présence des flavonones aglycones (Debray, 1970).

2.2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Principe

La méthode du trichlorure d'aluminium (Yi et al, 2007) est employée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait aqueux. La réaction est basée sur la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones des flavonoïdes, ce qui donne une coloration jaune dont l'intensité est quantifiée à 430 nm.

Mode opératoire

1 ml de l'échantillon (préparé dans le méthanol avec les dilutions convenables) est ajouté à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2 % dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. Une courbe d'étalonnage établie par la quercétine (0 - 40 $\mu\text{g/ml}$), réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{gEqQ/mg d'ext}$).

2.2.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice), en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage.

Pour analyser l'extrait brut des plantes, une CCM est utilisée sur plaques de gel de silice (20×20 cm). Dans un système de migration constitué de n-Butanol /Acide acétique/Eau :60 : 15 : 25 (V/V/V). 5 μl de chaque extrait sont déposés et les plaques sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par les vapeurs de la phase mobile.

Après développement, les plaques sont séchées sous hotte, puis visualisées séparément par un système de révélation :

- ✓ révélation physique sous lampe UV à 254 nm et à 366 nm.

Les spots flavonoïdiques représentant les constituants du dépôt sont caractérisés par leur fluorescence (couleur) sous lampe UV (Biallo et al, 2004).

Matériel et Méthodes

Relation : structure – fluorescence

L'examen sous lumière ultraviolette fournissait des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. En effet, il apportait des indications particulières concernant les substitutions.

Tableau 1 : Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes (Markham, 1982).

| Spots colorés | Types de flavonoïdes |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Noir | Flavonols 5,6,7 tri- OH libres |
| | Flavonols 5,7, 8 tri-OH libres |
| Brun noir | 3-OH absent ou 3-OH substitué |
| Violet | Flavones 5-OH et 4'-OH |
| | Flavones 3-OH et 5-OH, 4'-OH |
| | Flavones ou flavonols 5-OH avec 4'-OH absent ou substitué en 3 |
| | Flavone 6- ou 8-OH |
| | Chalcones ,isoflavones ,dihydroflavonols ,flavonones |
| Bleu clair fluorescent | Flavones sans 5-OH libre |
| | Flavonols sans 5-OH libres avec 3-OH substitué |
| Jaune terne, jaune orangé | Flavonols 3-OH libres avec ou sans 5-OH substitué |
| Jaune vert brillant | 5-OH libres ou 5- OH substitué |
| Jaune fluorescent | Flavonols avec 3- OH libre |
| Jaune pale | dihydroflavonols |

2.2.4. Analyse qualitative par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

30 µl de l'extrait à une Concentration de 1–5 mg/ml est injecté sur une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125 x 4.6 mm. La phase mobile est constituée de deux éluants : méthanol - eau (60 : 40 V/V) tous les deux acidifiée à 1 % avec l'acide acétique. Le gradient d'éluion appliqué est de type isocratique étalé sur 30 min. Le débit est de 0.5 ml/min. La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à une longueur d'onde égale 366 nm et une Pression de travail : 100-150 bars. Différentes substances sont identifiées dans nos extraits par comparaison des chromatogrammes des standards avec ceux des échantillons (Kuntic et al, 2007).

3. Étude *in vitro* des extraits bruts

3.1. Activité antiradicalaire par le test au DPPH°

Principe

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH° est réduit par un capteur de radicaux libres



où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH° (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H (Brand-Williams et al., 1995).

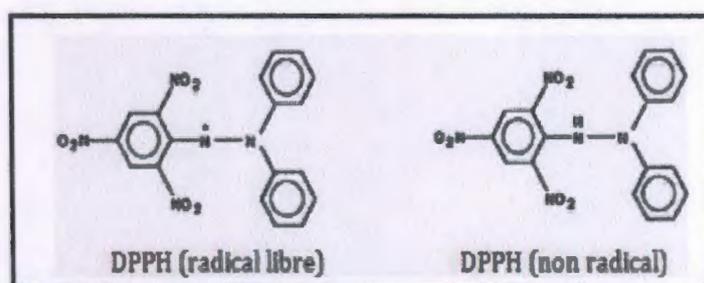


Figure 9 : Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams et al., 1995).

Mode opératoire

3.1.1. Test anti-radicalaire par CCM (analyse qualitative)

La méthode utilisée mise au point par Takao et ses collaborateurs (1994). Sur plaques à gel de silice possédant un support en aluminium, 10 µl de chaque solution d'extrait sont déposés. La plaque est placée dans une cuve à chromatographie contenant le système solvants suivant : n Butanol - Acide acétique - Eau (60 : 15 : 25 V/V/V).

Après migration, les chromatogrammes ont été séchés, puis révélés à l'aide d'une solution de DPPH° (0,1 % dans le méthanol). Les constituants de l'extrait présentant une activité anti-radicalaire apparaissent sous forme de spots de couleur jaune-blanc sur fond violet.

3.1.2. Test anti-radicalaire contre le DPPH° (analyse quantitative)

La méthode décrite par Tepe et al, (2005) a été employée. Différentes concentrations comprises entre 0-50 mg/ml de l'extrait aqueux ainsi que de la vitamine C sont testés.

Pour cela, des volumes (50 µl) de chaque extrait aqueux contenant des composés fonctionnels ont été incubés avec 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH° (3 mg de DPPH° dans 100 ml de méthanol) pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances à 518 nm ont été enregistrées contre le blanc correspondant.

L'activité anti-radicalaire est estimée par l'équation suivante :

$\% \text{ d'activité antioxydante} = [\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs blanc}] \times 100$ (Bidie A. dit Philippe et al, 2011).

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures. Le paramètre IC₅₀ (concentration équivalente à 50 % de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité de DPPH (couleur).

3.2. Mesure de l'activité de l'alpha-amylase (Méthode de coloration iodique d'amidon)

Mode opératoire :

Le test d'inhibition d'alpha-amylase dans nos extraits a été réalisé selon la méthode de Xiao et al, 2006 avec des modifications, basées sur la coloration iodique d'amidon cité par Chitra et al, 2013. Brièvement, Le mélange total réactionnel est composé de 120 µl de tampon phosphate 0.02M (pH 6.9 contenant 6 ml de chlorure de sodium), 20000 U CEIP d'enzyme α-amylase (une unité CEIP (Centre d'Évaluation et d'Information de la Pharmacodépendance) = quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de 1 mg d'amidon en 10 secondes dans les conditions du dosage.

Et 1 ml des extraits des plantes à des concentrations allant de 0.3-1.5 mg/ml (p/v). Après 10 minutes d'incubation du mélange réactionnel à 37C °, 1 ml d'amidon soluble (1 %, p/v) suivi d'une incubation à 37C ° pendant 15 minutes. La réaction enzymatique est arrêtée par l'addition de 100 µl de HCl (1 M), puis 300 µl du réactif d'iode (0,2 g I₂ dissous dans 100 ml KI à 2%) ont été ajoutés. L'absorbance a été lue à 580 nm.

Le contrôle représenté 100 % de l'activité enzymatique et n'a pas contenir aucun extrait des plantes. Pour éliminer l'absorbance produite par l'extrait de plante, des extraits contrôles appropriés préparés par l'extrait dans le mélange de réaction à l'exception de l'enzyme ont également inclus.

Le pourcentage (%) d'inhibition de l'alpha-amylase est calculé comme suit :

Le % d'activité enzymatique relative de l'alpha amylase = (activité enzymatique de l'extrait testé/activité enzymatique de contrôle) * 100.

Le % d'inhibition de l'activité d'alpha amylase = (100 -% Activité enzymatique relative).

Les valeurs IC50 ont été déterminées graphiquement à partir des régressions logarithmiques en traçant la courbe : Log concentrations inhibitrices en fonction des pourcentages d'inhibitions.

4. Étude in vivo des extraits bruts

4.1. Conditions d'hébergement des animaux

La stabulation des animaux est faite dans une animalerie périphérique dédiée aux dans des cages rectangulaires fabriquées en matière plastique opaque à raison de 4 souris/cage.

Comme le protocole ne s'est y oppose pas, la nourriture et la boisson sont servies ad libitum.

La nourriture de souris est composée d'ingrédients naturels préparés commercialement sous forme de croquettes. Une pesée quotidienne des souris est réalisée.

Les animaux ont été répartis en 4 lots selon le type de traitement qui est donné par gavage quotidien durant 6 jours.

Groupe 1 : Les souris du groupe témoin ont reçu un volume de l'eau distillée.

Groupe 2 : Les souris du groupe contrôle positif ont reçu une dose unique du paracétamol par jour (150 mg/kg du poids) par voie orale.

Groupe 3 : Les souris ont reçu un volume du l'extrait éthanolique de *Centaurea calcitropa* à une dose unique par jour de 100 mg/kg du poids par voie orale après 30 min de l'administration du paracétamol (150 mg/kg).

Groupe 4 : Les souris ont reçu un volume du l'extrait éthanolique de *Ranunculus repens*L. à une dose unique par jour de 100 mg/kg du poids par voie orale après 30 min de l'administration du paracétamol (150 mg/kg).

Après le sixième jour, les animaux laissés pendant 24 h, puis ils sont anesthésiés par l'éther diéthylique. Le prélèvement sanguin est réalisé via une ponction cardiaque par le biais d'une seringue contenant l'EDTA. Le foie est immédiatement enlevé, lavé avec l'eau physiologie glacée, puis conservé à -20 °C jusqu'à l'utilisation dans l'étude hématologique, et tissulaire.

4.2. Dosages des paramètres sériques

Les échantillons de sang provenant de différents groupes ont été centrifugés à 2000 g à 4°C pendant 10 min et le plasma a été conservé. Les marqueurs de fonction du foie, y compris la transaminase glutamate oxaloacétate (TGO), transaminase glutamate pyruvate (TGP), ont été mesurés dans le sérum à l'aide d'un autoanalyseur.

4.3. Dosages tissulaires

4.3.1. Dosage du glutathion (Sedlak et Lindsay, 1967)

Principe

Pour l'évaluation du taux de glutathion réduit chez les rats, nous avons utilisé la méthode de Sedlak et Raymond 1967 utilisant le réactif d'Ellman. Il s'agit d'une réaction chimique évoluant en une seule étape suivie d'une détection colorimétrique. Le réactif d'Ellman (Acide 5,5' -dithiobis-2-nitrobenzoïque) ou DTNB est réduit par les groupes thiol (SH) pour donner une mole d'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque par mole de SH. L'acide mercaptobenzoïque est un anion ayant une intense coloration jaune et par conséquent peut être utilisée pour évaluer les groupes thiols (SH).

Mode opératoire

0.4 g de foie sont coupés et homogénéisés dans 8ml EDTA 0.02M. A 0.5 ml de l'homogénat sont ajoutés 1.5 ml de tampon Tris 0.2M (pH8.2 dans EDTA 0.02M) et 0.1 ml de DTNB 0.01M en méthanol absolu. Le volume est complété à 10 ml par du méthanol absolu, puis incubé pendant 15min à température ambiante. Le mélange est centrifugé à 3000 RPM pendant 15min. L'absorbance du surnageant est lue à 412 nm contre le blanc (0.5 ml eau distillée + 1.5 ml 0.2M Tris + 0.1 ml DTNB 0.01M).

Matériel et Méthodes

Gamme d'étalonnage glutathion

La solution mère de glutathion (PM : 307.33) de 2mM est préparée dans du EDTA 0.02M, différentes concentrations sont préparées (0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7,0.8, 0.9, 1 mM). La solution est préparée le jour de l'utilisation et gardée à 4 °C afin d'éviter son oxydation et son hydrolyse. La solution de EDTA est préparée dans de l'eau distillée, chauffée légèrement pour dissoudre.

| [GSH] mM | Volume de solution mère de GSH (µl) | Volume d'eau distillée (µl) |
|----------|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 500 | 500 |
| 0.9 | 450 | 550 |
| 0.8 | 400 | 600 |
| 0.7 | 350 | 650 |
| 0.6 | 300 | 700 |
| 0.5 | 250 | 750 |
| 0.4 | 200 | 800 |
| 0.3 | 150 | 850 |

DTNB : le dissoudre dans du méthanol absolu

Tris : dissoudre dans EDTA 0.02M

5. Étude statistique

L'analyse des résultats est réalisée par comparaison des lots étudiés en utilisant le test de "t" de student. La limite de significativité est fixée à $p < 0,05$. Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écarts-types. La valeur trouvée par le calcul de la t peut affirmer que :

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative (ns) ;
- $p < 0,05$ = la différence est significative (*) ;
- $p < 0,01$ = la différence est très significative (**) ;
- $p < 0,001$ = la différence est hautement significative (***) .



Résultats et discussions

1. Extraction

La méthode de Marston et Hostettmann (2006) a été utilisée pour la préparation d'extraits bruts solides. La plante (*Centaurea calcitrapa* ou *Ranunculus repens L.*), finement divisée, est mise en contact avec de l'éthanol pendant plusieurs jours à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution, régulièrement agitée est finalement soutirée et le marc résiduel pressé. Cette solution extractive devient un extrait par évaporation du solvant.

Tableau 2 : Aspects, couleurs et rendements des extraits des parties aériennes de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens L.*

| Plante | Extrait | Aspect | Couleur | Rendement (%) |
|-----------------------------|-------------|---------------|------------|---------------|
| <i>Centaurea calcitrapa</i> | Ethanolique | Pâte collante | Vert foncé | 17.07 |
| <i>Ranunculus repens L.</i> | Ethanolique | Pâte collante | Marron | 10.78 |

Le choix de solvant ainsi que de sa polarité est basé sur sa sélectivité vis-à-vis des substances à extraire. Comme on s'intéresse aux composés polaires, l'éthanol à 80 ° a été employé. Des auteurs (Gómez-Caravaca et al., 2006 ; Markham, 1982) ont montré que l'éthanol était en effet un solvant de choix pour extraire ce type de molécules. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Cependant, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Lee et al., 2003).

2. Étude phytochimique

2.1. Analyse qualitative

Dans notre travail, on s'intéresse aux composés polaires entre autres les polyphénols, notamment aux flavonoïdes, dont le test de *Shibata* a permis de les mettre en relief (Tableau 3).

Tableau 3 : Résultats des réactions de caractérisation des flavonoïdes dans nos extraits.

| Plante | extrait | Couleur |
|-----------------------------|-------------|---------|
| <i>Centaurea calcitrapa</i> | Ethanolique | Orange |
| <i>Ranunculus repens L.</i> | Ethanolique | Rouge |

Résultats et discussions

L'apparition de la couleur orange dans l'extrait éthanolique de *Centaurea calcitrapa* a montré la présence des flavonones aglycones, alors que la couleur rouge (extrait éthanolique de *Ranunculus repens L.*) indiquée la présence des flavonols aglycones (Debray, 1970). Ces résultats sont confirmés par CCM et HPLC.

2.1.1. Chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation partielle des différents extraits éthanoliques des parties aériennes de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens L.*, une CCM a été réalisée suivant la méthode de (Biallo et al., 2004). Les résultats sont consignés dans le tableau 4. Le chromatogramme visualisé sous UV à 366 nm (figures 10 et Tableau 4) présente des taches de couleur violet, jaune et orange qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires. A 254 nm, la majorité des spots apparaissent sombres. Selon Bruneton (1993), la fluorescence à 366 nm pourrait indiquer la présence des coumarines, des stérols des triterpènes ou des flavonoïdes. Les différences de couleurs entre les spots issus de la séparation des extraits et leurs témoins correspondants peuvent être expliquées par le fait qu'un composé, présent dans un mélange complexe (extrait), acquière des propriétés différentes de celles du même composé pur. Les résultats sont comparés avec ceux des témoins utilisés ainsi que des témoins d'une étude utilisant le même éluant la rutine et l'acide tannique (Biallo et al., 2004).

Résultats et discussions

Tableau 4 : Résultats de la séparation par CCM des extraits éthanolique des parties aériennes de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens* L.

| Extraits/ Témoins | N° Spot | Rf | Observation à 254 nm | Fluorescence à 366 nm | Composants proposés |
|--------------------------------------------------------------|---------|-------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Acide gallique | | 0,83 | - | Violet | |
| Quercétine | | 0,94 | - | Brun | |
| Acide tannique | | 0,87 | - | Violet | |
| Rutine | | 0,60 | - | Brun | |
| Extrait Ethanolique de <i>Centaurea calcitrapa</i> | 1 | 0,28 | - | Bleu violâtre | Flavones ou flavonones |
| | 2 | 0,53 | - | Vert | 5-OH libres ou substitués |
| | 3 | 0,60 | Visible | Orange | Rutine |
| | 4 | 0,83 | Visible | Violet | Acide gallique |
| | 5 | 0,85 | - | Jaunepâle | Dihydroflavonols |
| | 6 | 0,94 | Visible | Orange | Quercétine |
| Extrait Ethanolique de <i>Ranunculus repens</i> L. | 1 | 0,28 | - | Bleu violâtre | Flavones ou flavonones |
| | 2 | 0,53 | - | Vert clair | 5-OH libres ou substitués |
| | 3 | 0,83 | Visible | Violet | Acide gallique |
| | 4 | 0,85 | Visible | Jaune | Flavonols avec 3-OH libre |
| | 5 | 0,87 | Visible | Violet | Acide tannique |
| | 6 | 0,94 | Visible | Orange | Quercétine |

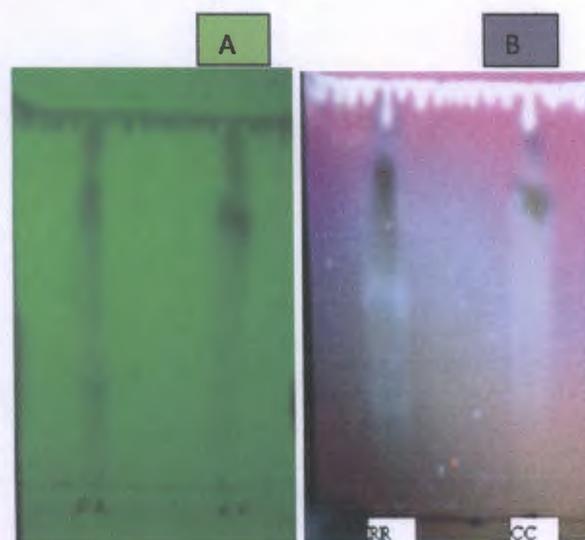


Figure 10 : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits éthanolique de *Centaurea calcitrapa* (CC) et *Ranunculus repens* L. (RR) par CCM (dans le système solvant : BAW 60 : 15 : 25).

A : chromatogramme photographié sous lampe UV à 254 nm.

B : chromatogramme photographié sous lampe UV à 366 nm

Résultats et discussions

Tableau 4 : Résultats de la séparation par CCM des extraits éthanolique des parties aériennes de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens L.*

| Extraits/ Témoins | N° Spot | Rf | Observation à 254 nm | Fluorescence à 366 nm | Composants proposés |
|--------------------------------------------------------------|---------|------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Acide gallique | | 0,83 | - | Violet | |
| Quercétine | | 0,94 | - | Brun | |
| Acide tannique | | 0,87 | - | Violet | |
| Rutine | | 0,60 | - | Brun | |
| Extrait Ethanolique de <i>Centaurea calcitrapa</i> | 1 | 0,28 | - | Bleu violâtre | Flavones ou flavonones |
| | 2 | 0,53 | - | Vert | 5-OH libres ou substitués |
| | 3 | 0,60 | Visible | Orange | Rutine |
| | 4 | 0,83 | Visible | Violet | Acide gallique |
| | 5 | 0,85 | - | Jaunepâle | Dihydroflavonols |
| | 6 | 0,94 | Visible | Orange | Quercétine |
| Extrait Ethanolique de <i>Ranunculus repens L.</i> | 1 | 0,28 | - | Bleu violâtre | Flavones ou flavonones |
| | 2 | 0,53 | - | Vert clair | 5-OH libres ou substitués |
| | 3 | 0,83 | Visible | Violet | Acide gallique |
| | 4 | 0,85 | Visible | Jaune | Flavonols avec 3-OH libre |
| | 5 | 0,87 | Visible | Violet | Acide tannique |
| | 6 | 0,94 | Visible | Orange | Quercétine |

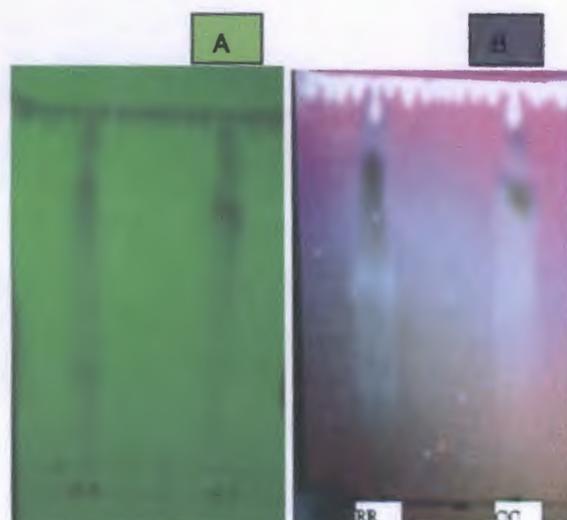


Figure 10 : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits éthanolique de *Centaurea calcitrapa* (CC) et *Ranunculus repens L.* (RR) par CCM (dans le système solvant : BAW 60 : 15 : 25).

2.1.2. Caractérisation par HPLC

Après extraction, les extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens L.* ont été analysés par HPLC (Figure 11). Les résultats enregistrés montrent que ces extraits sont riches en substances chimiques, confirmant les résultats obtenus par CCM. La comparaison des temps de rétention obtenus avec des témoins utilisés montre l'éventuelle présence de dérivés de quercétine et d'acide gallique. Le fait que ces composés soient présents dans la fraction aqueuse laisse supposer qu'ils sont glycosylés (Galati et al., 2003). L'HPLC a permis d'identifier les deux polyphénols dans tous les deux extraits éthanoliques de *Ranunculus repens L.* et *Centaurea calcitrapa*, dont la quercétine est le composé majoritaire dans l'extrait éthanolique de *centaurea calcitrapa*, tandis que l'acide gallique est représenté par le plus haut pic dans le chromatogramme de *Ranunculus repensL.*

Deux composés phénoliques purs (acide gallique et quercétine) ont été utilisés dans l'analyse HPLC comme témoins. Leurs chromatogrammes sont représentés dans la figure 2 (annexe 2) et leurs temps de rétentions (Tr) dans le tableau ci-suitant.

Tableau 5 : Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus par la séparation avec HPLC.

| Standards | Tr (min) |
|----------------|----------|
| Acide gallique | 3,8 |
| Quercétine | 10,1 |

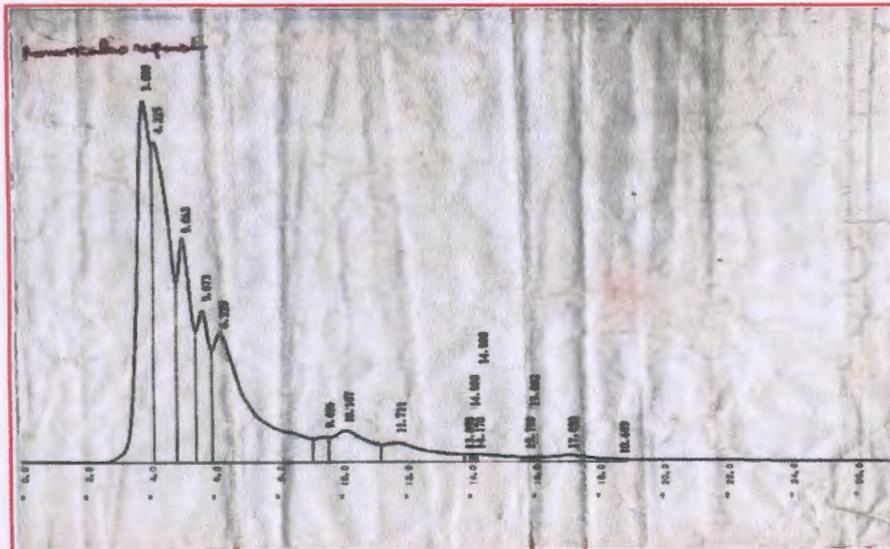
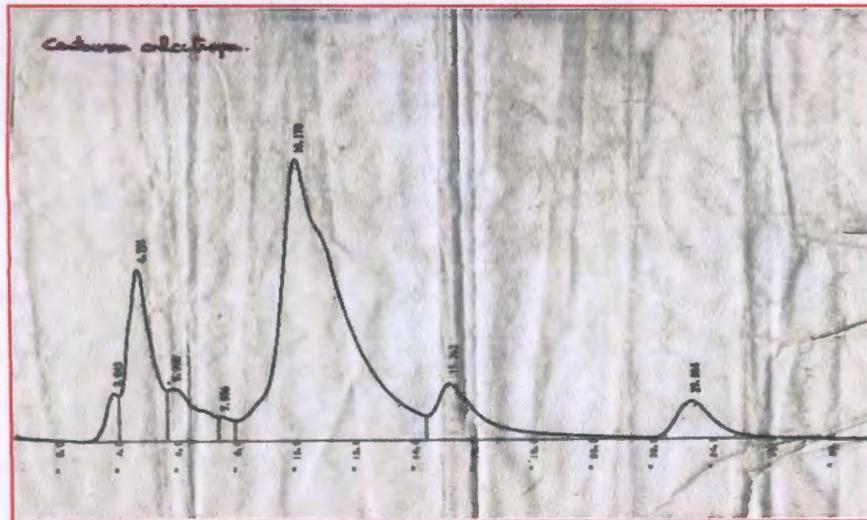


Figure 11 : Chromatogrammes d'HPLC des extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens* L.

2.2. Analyse quantitative

Le dosage quantitatif des composés phénoliques totaux dans l'extrait de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens* L. a révélé que les parties aériennes renferment une teneur notable en phénols totaux à savoir 28,53 et 23,15 μg EqAG/mg d'extrait sec respectivement (Figure 12). La raison principale pour le choix du dosage de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués, tels l'effet antioxydant (Seyoum *et al.*, 2006) et l'effet anti alpha amylase (Al-Dabbas *et al.*, 2006).

Résultats et discussions

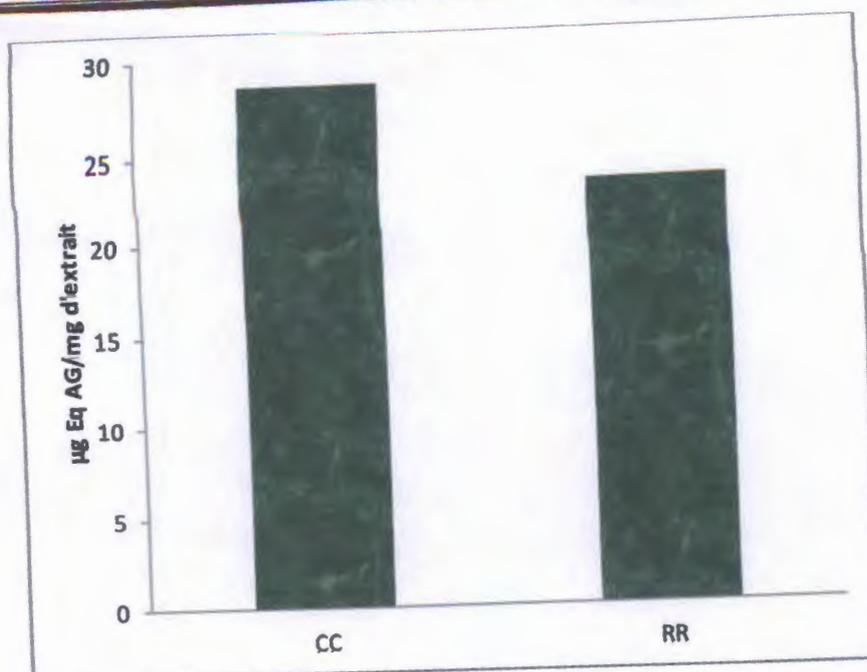


Figure 12 : Teneur en polyphénols d'extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa* (CC) et *Ranunculus repens* L. (RR).

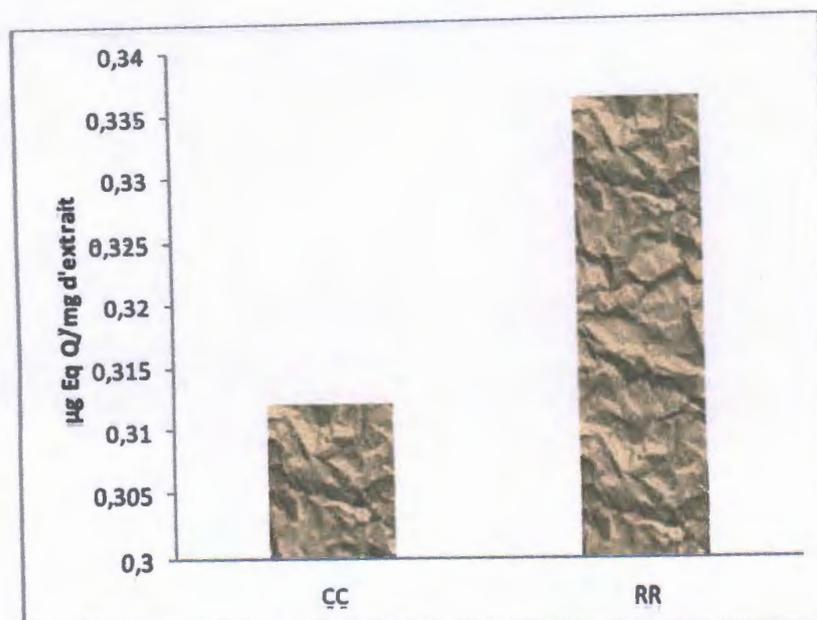


Figure 13 : Teneur en flavonoïdes d'extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa* (CC) et *Ranunculus repens* L. (RR).

D'autre part, la teneur en flavonoïdes au sein des deux extraits a été déterminée (Figure 13) : $0,312 \mu\text{g EqQ/mg d'extrait sec}$ pour *Centaurea calcitrapa* et $0,336 \mu\text{g EqQ/mg d'extrait sec}$ pour *Ranunculus repens* L.. Il est remarquable de constater que *Centaurea calcitrapa* est la plus riche en polyphénols cependant, *Ranunculus repens* L. a le contenu le plus

élevé de flavonoïdes, résultat attendu étant donné que l'extrait brut de *Ranunculus repens L.* était préparé à partir des feuilles, tiges et fleurs alors que pour *Centaurea calcitrapa* seulement les feuilles et les tiges ont été employées (Bruneton, 1993).

La faible teneur en polyphénols et en flavonoïdes constatés dans notre étude par rapport à la littérature (Erol-Dayi et al., 2011 ; Kebieche et al., 2011), s'expliquerait par le fait que la quantité des composés phénoliques des extraits éthanoliques des plantes dépend essentiellement, de leur origine (Ebrahimzadeh et al., 2008), la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (Park et Cha, 2003) et la durée de conservation (Özgüven et al., 1998).

3. Dépistage de l'activité antioxydante

3.1. Analyse qualitative

L'activité antioxydante de l'extrait de *Centaurea calcitrapa* et de *Ranunculus repens L.* a été testée sur CCM avec le DPPH (Mensah, 2004 ; Mamyrbékova-Békro et al., 2008). La Figure 14 met en évidence la présence de spots jaune-pâle sur fond violet. Ce qui dénote que ces extraits renferment des phytoconstitués susceptibles de piéger des radicaux libres.

Le potentiel antioxydant de l'extrait de *Ranunculus repens L.* est plus élevée que celui de *Centaurea calcitrapa* étant donné que l'extrait a donné une tâche massive étendue presque le long du chromatogramme (Figure 14). La richesse de cet extrait en flavonoïdes (Figure 13) serait probablement à l'origine de cette activité antioxydante, car les flavonoïdes sont reconnus comme d'excellents antioxydants (Bruneton, 1999).



Figure 14 : Profils chromatographiques de l'activité antioxydante sur CCM des extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa* (CC) et *Ranunculus repens L.* (RR).

Résultats et discussions

3.2. Analyse quantitative

Après incubation avec le DPPH°, les cinétiques de décoloration à 518 nm ont été déterminées. La capacité de capture des radicaux libres a été exprimée, par rapport à une solution de vitamine C (Figure 15 et tableau 6). On remarque que le pouvoir scavenger est dépendant de la dose utilisée de l'extrait.

Tableau 6 : pourcentage d'inhibition et IC50 des extraits bruts et de standard

| Concentration de l'extrait en mg/ml | % d'inhibition de l'extrait de <i>Centaurea calcitrapa</i> | % d'inhibition de l'extrait de <i>Ranunculus repens</i> L. | % d'inhibition de la vitamine C |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 5 | 73,48 | 80,93 | 91,86 |
| 10 | 77,90 | 88,13 | 95,34 |
| 15 | 86,04 | 92,32 | 96,51 |
| 20 | 90,23 | 94,18 | 97,67 |
| IC50 (mg/ml) | 3,00 | 2,80 | 2,40 |

Cependant, nos extraits présentent une capacité de capture des radicaux libres légèrement inférieure à celle de la vitamine C, prise comme référence. En effet, la vitamine C présente un IC50 de 2.4 versus 2.8 et 3 pour *Ranunculus repens* L. et *Centaurea calcitrapa* respectivement. Nos résultats corroborent presque les données de la littérature (Erol-Dayi et al, 2011 ; Kbieche et al, 2011).

Résultats et discussions

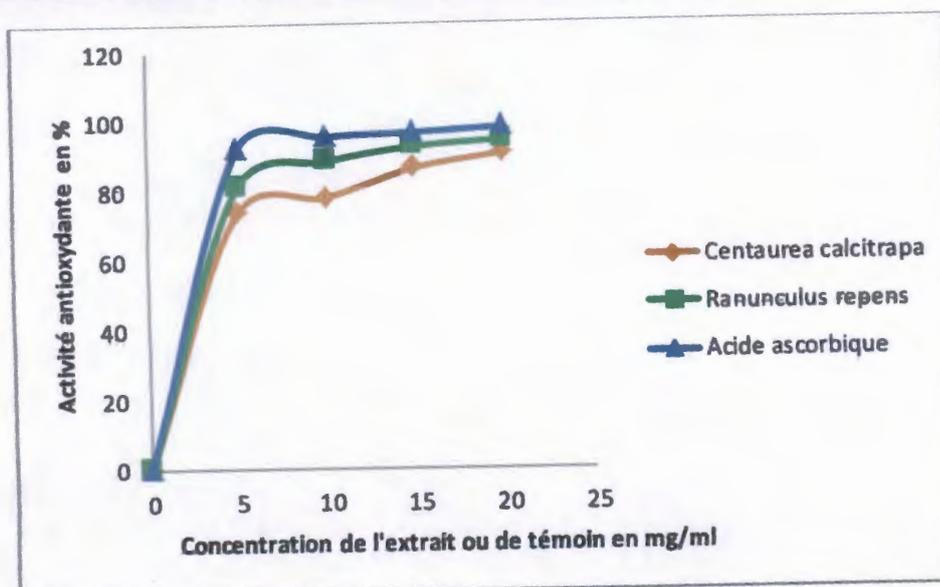


Figure 15 : Activité antioxydante des extraits de plantes (*Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens* L.) et de témoin (*Acide ascorbique*).

4. Effet des extraits sur l'activité de l'alpha amylase

4.1. Inhibition de l'alpha amylase

Le diabète sucré est une des plus graves maladies métabolique et chronique qui se développe dans la population mondiale. Cette maladie est caractérisée par un état d'hyperglycémie chronique.

Une des approches thérapeutiques pour diminuer l'hyperglycémie postprandiale est de retarder l'absorption intestinale du glucose par l'inhibition des enzymes hydrolysant les hydrates de carbone, tels que l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase dans le système digestif (Sneha et al., 2011). Dans cette optique, nous avons analysé in vitro, l'éventuel effet inhibiteur de nos extraits sur l'activité alpha-amylasique.

La méthode spectrophotométrique, basée sur le suivi de la décoloration d'une solution d'amidon en présence d'une quantité fixe (20.000 CEIP) d'alpha amylase et avec différentes concentrations d'extraits de plante, a été utilisée pour étudier l'éventuel effet inhibiteur des extraits sur l'activité de l'enzyme.

Les résultats obtenus (Tableau 7 et Figure 16) montrent que les extraits possèdent une activité inhibitrice de l'activité amylasique. L'extrait de RR, aux mêmes concentrations que CC, possède le pourcentage d'inhibition le plus élevé : 56.51 à 97.07 % avec un IC50 de 4.55mg/ml versus 49.46 à 90.07 % avec un IC50 de 5.75mg/ml pour CC. D'autre part, le taux d'inhibition augmente lorsque la concentration d'extrait augmente.

Résultats et discussions

Tableau 7 : L'activité inhibitrice de l'alpha amylase et les valeurs de IC50 des extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens L.* à différentes concentrations

| Extrait de plantes et Concentration en mg/ml | Pourcentage d'inhibition (%) de l' α amylase | Régression logarithmique $y=a \ln (x)+b$ | IC50 en mg/ml |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------|
| <i>Ranunculus repens L.</i> | | | |
| 5 | 56,51 | $Y=27,21\ln(x) +8,747$ | 4,55 |
| 10 | 65,51 | | |
| 15 | 77,62 | | |
| 20 | 97,07 | | |
| <i>Centaurea calcitrapa</i> | | | |
| 5 | 49,46 | $Y=28,37\ln(x) +0,239$ | 5,75 |
| 10 | 59,38 | | |
| 15 | 74,91 | | |
| 20 | 90,07 | | |

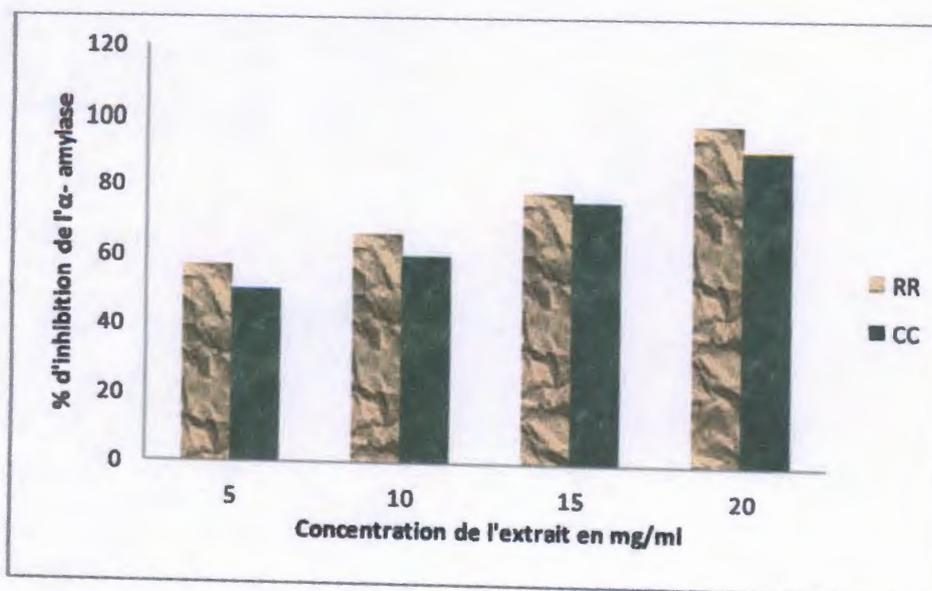


Figure 16: Pourcentage d'inhibition de l'alpha amylase par les extraits éthanoliques de *Ranunculus repens L.* (RR) et *Centaurea calcitrapa* (CC).

Résultats et discussions

Effet inhibiteur exercé par les extraits peut en partie être attribué aux composés phénoliques (Oboh et al, 2012 ; Piparo et al, 2008). Ainsi, l'inhibition de l'alpha amylase dans le tractus digestif de l'homme est considérée comme un contrôle effectif du diabète par la diminution de l'absorption de glucose à partir de l'amidon (Dineshkumar et al, 2010) en retardant l'hydrolyse de l'amidon, le glycogène et les oligosaccharides en sucres simples (Kavitha et al, 2012).

4.2. Cinétique d'inhibition

La représentation de Lineweaver-Burk a été utilisée d'une part pour déterminer les constantes cinétiques de l'enzyme en présence et en absence d'extrait ainsi que l'établissement du type d'inhibition (Figures 17 et 18). Le choix de cette méthode revient au fait que l'enzyme étudié est une enzyme michaelienne, car elle comporte une seule sous unité (Whitcomb et Lowe, 2007).

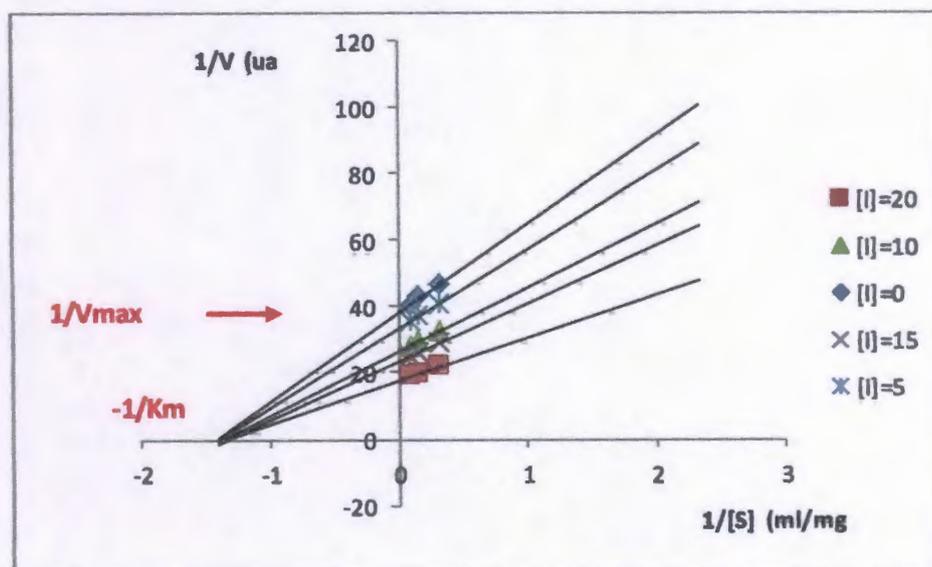


Figure 17 : graphe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat en présence de différentes concentrations d'inhibiteur (extrait éthanolique de *Ranunculus repens*L.).

Utilisation de concentrations croissantes de substrat et en présence de différentes concentrations d'extraits, montre que l'extrait éthanolique de *Ranunculus repens* L. exerce une inhibition non-compétitive (Figure 17) vis-à-vis de l'enzyme, étant donné que le K_m reste inchangé (0.71mg/ml) en présence et en absence d'inhibiteur par contre la vitesse maximale (V_{max}) diminue. Ce type d'inhibition peut être expliqué par le fait que notre extrait possède des composés qui se lient à un site autre que le site actif de l'alpha amylase et diminue sa vitesse réactionnelle en modifiant sa conformation tridimensionnelle. L'effet d'un inhibiteur non

Résultats et discussions

compétitif ne peut être inversé par une élévation des concentrations du substrat (Hames et al., 2000).

Pour l'extrait éthanolique de *Centaurea calcitrapa*, la représentation de lineweaver-Burk (Figure 18) révèle que l'inhibition est de type incompétitive suggérant la présence de composés qui se combinent de façon réversible et exclusivement au complexe enzyme-substrat. L'inhibition n'est pas levée par l'addition de substrat. (Weinman Serge, 2004).

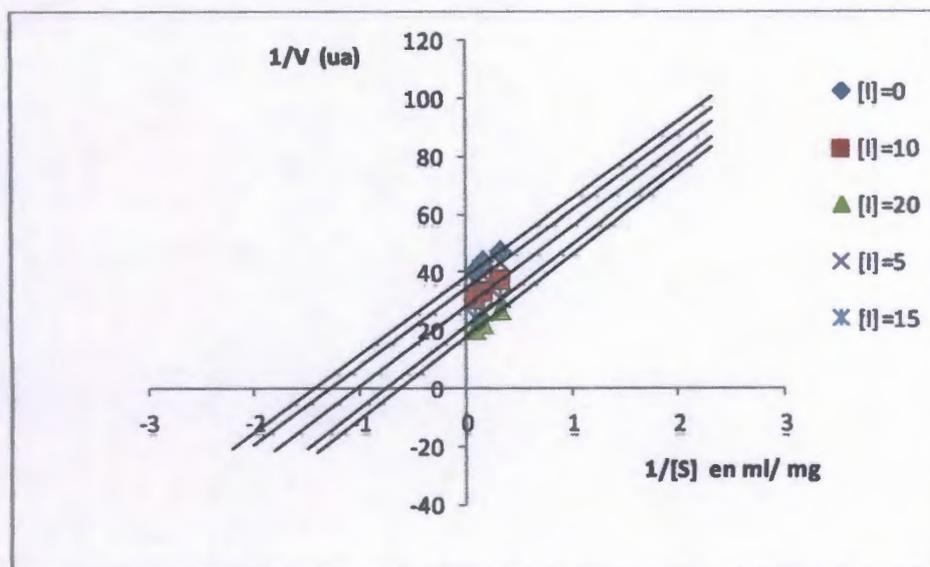


Figure 18 : Représentation de Lineweaver-burk de l'extrait éthanolique de la plante *Centaurea calcitrapa*.

5. Analyse *in vivo* de l'effet hépatoprotecteur des extraits

5.1. Les transaminases TGO et TGP

En pathologie, l'augmentation de la destruction cellulaire normale ou cytolyse pathologique des cellules hépatiques entraîne une augmentation de l'activité de certains enzymes dans le plasma est un reflet précoce des lésions hépatiques.

Les transaminases (TGO et TGP) font historiquement partie des premières enzymes utilisées chez l'homme dans l'évaluation de la souffrance hépatique. Le jour du sacrifice, les valeurs moyennes des activités sériques des enzymes TGP et TGO (Figure 19) étaient respectivement égales à $143 \pm 9,64 \text{ UI/L}$ et à $254 \pm 9,16 \text{ UI/L}$ chez les souris traitées *versus* $31 \pm 4,58 \text{ UI/L}$ et $57 \pm 9 \text{ UI/L}$ chez le lot témoin, traduisant une augmentation significative ($p < 0,001$) des activités des deux enzymes. Ceci s'expliquerait par une fuite cellulaire d'enzyme suite à la

Résultats et discussions

perte de l'intégrité de la membrane cellulaire du foie, ce qui confirme l'effet délétère des doses toxiques du paracétamol sur le foie (McGill et al, 2012, Lahouel et al, 2004).

D'autre part, le co-traitement des souris par des extraits éthanolique des deux plantes entraîne une diminution significative ($p < 0.01$) des activités enzymatiques ($TGP_{CC} = 64 \pm 9,64 \text{ UI/L}$; $TGP_{RR} = 49 \pm 4,58 \text{ UI/L}$; $TGO_{CC} = 106 \pm 9,16 \text{ UI/L}$; $TGO_{RR} = 86 \pm 7,54 \text{ UI/L}$), mais sans se normaliser. Cependant, l'extrait de CC semble être moins efficace que l'extrait de RR étant donné que la diminution du taux de TGP et TGO était moins importante mais significative ($p < 0,01$) par rapport aux souris traitées au paracétamol. Cette différence d'efficacité entre les deux extraits peut être attribuée à la teneur relativement élevée de flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de *Ranunculus repens L.*

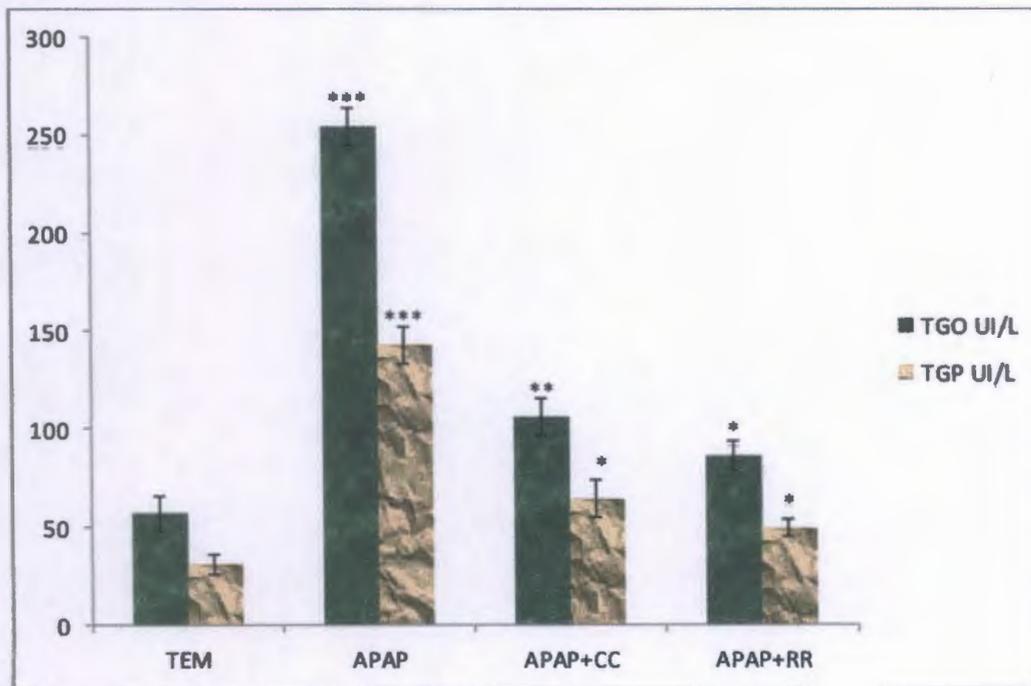


Figure 19 : effet du traitement par paracétamol à une dose de 150 mg/kg et du co-traitement par les extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa* et *Ranunculus repens L.* à 100 mg/kg sur les taux sériques de TGP et TGO. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n=3$).

Effet bénéfique donné par les extraits de plante s'expliquerait par l'éventuel pouvoir des composés phytochimiques de prévenir la fuite de ces enzymes intracellulaire et ceci par la stabilisation de l'activité des membranes hypatoctaires. Ceci est en accord avec l'idée courante et acceptée que les taux sériques des transaminases reviennent à la normale avec la guérison de parenchyme hépatique et leur régénération (Bhadoria et Kumar, 2009)

5.2. Taux de glutathion (GSH)

Le paracétamol est un médicament antipyrétique et analgésique largement utilisé pour soigner la fièvre, les maux de tête et autres douleurs (Kupeli et al., 2006). Lorsqu'il est pris dans des doses toxiques, il devient une hépatotoxine puissante, générant une fulminée hépatique et une nécrose tubulaire rénale qui sont mortelles chez les Hommes et les animaux expérimentaux (Das et al., 2010).

En accord avec la littérature (Shiekh et al., 2012 ; Manimaran et al., 2010 ; Lahouel et al., 2004), nous avons constaté une déplétion des réserves hépatiques de GSH ($p < 0.001$) après administration *pers os* de 150mg/kg de paracétamol pendant 6 jours (Figure 20). Le taux tissulaire du GSH était de $0,88 \pm 0,03$ mM/g de foie chez les souris recevant du paracétamol contre $1,74 \pm 0,04$ mM/g de foie chez les témoins.

Le co-traitement des animaux par les extraits a permis de maintenir dans les normes le taux de GSH, lorsque l'extrait de *Ranunculus repens L.* est employé ($1,7 \pm 0,04$ mM/g de foie, $p > 0.05$). Cependant, l'extrait de *Centaurea calcitrapa* permet aussi de maintenir dans les normes les taux de GSH, mais avec une efficacité moindre ($1,51 \pm 0,07$ mM/g de foie ($P < 0,05$)).

Le paracétamol, à dose thérapeutique, est principalement métabolisé et détoxifié par glucuronidation et sulfatation, avant d'être excrété par les reins (Olaleye et Rocha, 2008). Cependant, lorsque ce médicament est pris dans des doses toxiques, le composé est converti à un intermédiaire électrophile, NAPQI, qui est oxydé par le cytochrome P450, et qui réagit principalement avec le glutathion (GSH) (Kumari et Kakkar, 2012).

En outre, NAPQI peut augmenter la formation de radicaux libres et les espèces réactives d'azote comme le peroxy-nitrite (Nagi, 2010). Des niveaux excessifs de radicaux libres peuvent entraîner l'épuisement des défenses antioxydantes entre autres le GSH (Feng-Lin et al., 2007).

Résultats et discussions

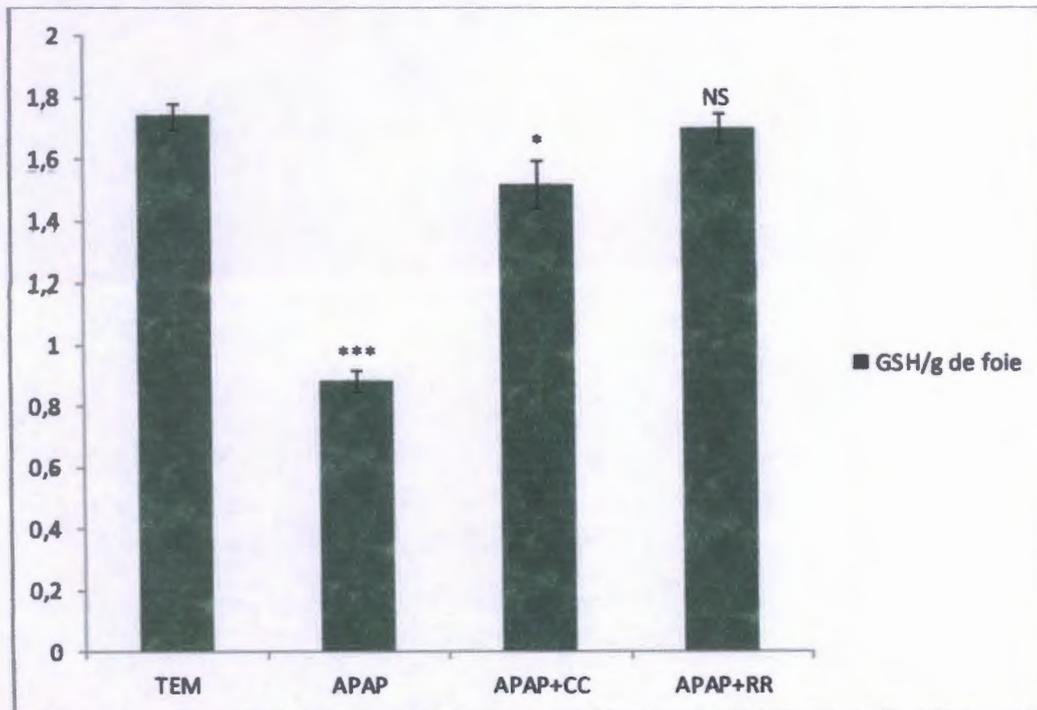


Figure 20 : Variation du taux de GSH/g de foie après traitement par le paracétamol 150 mg/kg seule ou associée avec les extraits éthanoliques de *Centaurea calcitrapa*(CC) et *Ranunculus repens L.* (RR) 100 mg/kg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n=3$).

Par ailleurs, l'analyse phytochimique par (CCM et HPLC-UV) des extraits de *Ranunculus repens L.* et de *Centaurea calcitrapa* révèle comporte entre autres des composés phénoliques et flavonoïques et dont l'effet protecteur observé peut leur être attribué. En effet, ces composés remplissent les critères structuraux nécessaires à une activité antioxydante *i.e.*, des piègeurs efficaces des radicaux libres (Hendrich, 2006). En outre, ils peuvent stimuler la régénération de GSH à partir de glutathion réduit ou GSSG (Eesha et al., 2011 ; (Shiekh et al., 2012).

Conclusion

Conclusion

Malgré l'intérêt biologique et médicinal que représentent les plantes étudiées, ces espèces végétales n'ont pas été suffisamment explorées. Notre étude a montré leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes, métabolites secondaires doués d'activité antioxydante. En effet ces composés se sont révélés avoir un potentiel de capture des ROS presque similaire que la vitamine C, prise comme référence. En outre, un effet inhibiteur de l'alpha-amylase a été évalué par la technique de décoloration de l'amidon en présence de l'iode qui démontre que le potentiel hypoglycémiant des deux plantes est avéré. En outre, ce travail montre l'intérêt d'un apport concomitant d'extraits de plantes riches en polyphénols pour protéger le foie contre l'effet néfaste du paracétamol. En effet, le co-traitement des animaux a permis de réduire, cas de *Centaurea calcitrapa*, voire empêcher, cas de *Ranunculus repens*L., la lyse des hépatocytes ; observation confirmée par le dosage des transaminases. Le mécanisme expliquant un tel constat trouve son origine dans l'activité anti-oxydante des extraits de plantes, étant donné que leur administration a permis de préserver les réserves cellulaires de GSH et dont la concentration intracellulaire est considérée comme un véritable marqueur de l'état de santé d'un individu. Ces résultats restent préliminaires, Il serait intéressant d'isoler les molécules qui sous-tendent les diverses activités détectées dans nos extraits. De plus, des études complémentaires approfondies concernant l'identification des composés phénoliques par des méthodes plus performantes sont nécessaires.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Al-Dabbas M.M., Kitahara K., Suganuma T., Hashimoto F., Tadera K. (2006). Antioxidant and α -Amylase Inhibitory Compounds from Aerial Parts of *Varthemia iphionoides* Boiss. *Biosci. Biotech. Biochem.* 70: 2178-2184.
- Angelos M., Kutala G., Torres V.K., Stoner G., Oerannan K. (2005). Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 290: 341-347.
- Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R., Martinou J.C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 345:271-278.
- Aurousseau B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *Inra. Prod. Anim.* 15: 67-82.
- Ayyasamy M., Souvendra N .S. ,Palanisamy S. (2010). Influence of repeated preexposure to arsenic on acetaminophen-induced oxidative stress in liver of male rats. *Food. Chem .Tox.* 48:605-610.
- Azhari R., Lotan N. (1991). Enzymic hydrolysis of biopolymers via single-scission attack pathways: A unified kinetic model. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2: 9-18.
- Bahorun T. (1997). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric Res. Cou.* 48:83-94.
- Barrett M.L., Udani J.K. (2011). A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr J.* 10: 1475-2891.
- Beckman J.S., Koppenol W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271: 1424-1437.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F. R., Ortuno A., Del Rio J. A. (1997). Uses and properties of Citrus flavonoids. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 4505-4515.
- Bhadoria M., Nirala S.K. (2009). Reversal of acetaminophen induced subchronic hepatorenal injury by propolis extract in rats. *Env. Toxicol. Pharmacol.* 27: 17-25.
- Biallo D., Sanogo R., Yasambou H. (2004) Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae). *C. R. Chimie.* 7: 1073-1080.
- Bidie A., N'guessan B.B., Yapo A. F., N'guessan J.D., Djaman D.J. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Scien. Natur.* 8 : 1 - 11.
- Bijttebier A., Goesaert H., Delcour J. (2008). Amylase action pattern on starch polymers. *Biologia.* 63: 989-999.
- Bijttebier A., Goesaert H., Delcour J.A. (2007). Temperature impacts the multiple attack action of amylases. *Biomacromol.* 8: 765-772.

Références Bibliographiques

- Dejean L.M., Martinez-Caballero S., Guo L., Hughes C., Tejjido O., Ducret T., Ichas F., Korsmeyer S.J., Antonsson B., Jonas E.A., Kinnally K.W. (2005). Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol. Biol. Cell.* **16**:2424-2432.
- Di Pietro A., Conseil G., Pérez-Victoria J. M., Dayan G., Baubichon-Cortay H., Trompier D., Stenfels E., Jault J. M., de Wet H., Maitrejean M., Comte G., Boumendjel A., Mariotte A.M., Dumontet C., McIntosh D. B., Goffeau A., Castanys S., Gamarro F., and Barron D. (2002). Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell. Mo. Life. Sci.* **59**: 307-322.
- Dineshkumar B., Analava M., Manjunatha M. (2010). A comparative study of alpha amylase inhibitory activities of common anti-diabetic plants at Kharagpur 1 block. *Int. J. Green. Pharm.* **4**: 115-121.
- Douglas G.W., Meidiger D. (1999). *Ranunculaceae*. In: Douglas, G.W., D. Meidinger, and J. Pojar, editors.. Decotyledons (*Orobanchaceae* through *Rubiaceae*). Illustrated flora of British Columbia. British Columbia: *Minist of Envir. Lands .Parks, Minist of Forest.* **4**:208-244 pp.
- Dupin H., Cup J.L., Malewiak M.I. (1992). Amidon. Alimentation et nutrition humaine. *Esf Ed., Paris, 127-135pp.*
- Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F. , Hafezi S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turk. J.biol.* **32** :43-49.
- Eesha B.R., Mohanbabu A.V., Kumari M.K., Sarath B., Vijay M., Lalit M., Rajput R. (2011). Hepatoprotective activity of Terminalia paniculata against paracetamol induced hepatocellular damage in Wistar albino rats. *Asi. Pac. J.Trop.Med.* **54**: 466-469.
- Erol-Dayi Ö., Pekmez M., Bona M., Aras-Perk A., Arda N. (2011). Total Phenolic contents, Antioxidant Activities and cytotoxicity of three Centaurea Species: *C. calcitrapa* , *C. ptosimopappa* and *C. spicata*. *Free. Rad. Antiox.* **1**: 31-36.
- Faris Y.S., Husain A.A., Kamel N.M. , Tarir N.T. (1989), Taxonomic study on distributed weeds and their control by some selective herbicides in wheat fields in Erbil. *Zarco.* **2** : 79 -81.
- Favier A. (2003). Le stress oxidant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Lact .chim* : 501-512.
- Funke L., Melzing M.F. (2006). Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* **16**: 1-5.
- Galati E. M., Mondello M. R., Giuffrida D., Dugo G., Miceli, N., Pergolizzi , Taviano M. F. (2003). Chemical characterisation and biological effects of sillician *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Fruit juice: Antioxidant and antiulcerogenic activity. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 4903-4908 .
- Gattas G., Kato J., SoaresVieira M., Siraque J.A., Kohler M.S., Gomes P., Rego L., Bydlowski M.A. (2004). Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz. J. Med .Biol. Res.* **337**:451-458.

Références Bibliographiques

- Gibson J.D., Pumford N.R., Samokyszyn V.M., Hinson J.A.(1996).Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. *Chem .Res. Toxicol.*9:580-585.
- Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D. (2006) .Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmaceut .Biomed.Anal.* 41: 1220 - 1234.
- Gousiadou C., Skaltsa H. (2003). Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*. *Biochem.Syst. Ecol.*31:389-396.
- Graber M. ,Combes D. (1989). Microbial α -amylases.*Enz. Microb. Tech.* 2:663-687.
- Gumucio D.L., Wiebauer K., Caldwell R.M., Samuelson L.C., Meisler M.H.(1988). Concerted evolution of human amylase genes. *Mol. Cell.Biol.* 8: 1197-1205.
- Hames B.D., Hooper N. M. , Houghton J. D. (2000) .Biochimie. *Ed Berti.Paris.* 61- 77pp.
- Harper, J.L. (1957). *Ranunculus acris* L. *J. Ecol.*45: 289-342.
- Havsteen B. H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therap.* 96: 67-202.
- Hendrich A.B. (2006) .Flavonoid-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta. pharmacol. Sin.* 27: 27-40.
- Hinson J.A., Pike S.L., Pumford N.R., Mayeux P.R. (1998).Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem Res Toxicol.*11:604-607.
- Hultén E. (1968). Flora of Alaska and Neighboring Territories. *Stanford University Press.* 1008 pp.
- Ishii K., FurutaT., Kasuya Y. (2003). High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *J.Chromatog.* 749: 49-56.
- Jaeschke H., Knight T.R., Bajt M.L. (2003). The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol.Let.*144 : 279- 288.
- James L.P., Mayeux P. R., Hinson J. A. (2003). Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Am Socie.Pharmacol. Exp.* 31: 1499-1506.
- Karamenderes C., Bedir E., Pawar R., Baykan S. , Khan I.A (2007). Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*.. *Phytochem.* 68: 609-615.
- Karou D., Dicko M.H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S., Traoré A.S. (2005). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du burkina faso. *Anal. Risq. agroalim.*278 : 8-11.

Références Bibliographiques

- Kavitha S., Kamaraj M., Rajeshwari S. (2012). *In vitro* alpha amylase and alpha glucosidase inhibition activity of crude ethanol extract of *Cissus arnottiana*. *Asi J. Plant Sci. Res.* 2:550-553.
- Kaya Z., Orcan N., Binzet R. (2010). Morphological, Anatomical and palynological study of *Centaurea Calcitrapa* L. SSP. *Cilicica* (BOISS. & BAL.) Wagenitz and *Centaurea Solstitialis* L. SSP. *Carneola* (BOISS.) wagenitz endemic for turkey. *Pak. J. Bot.* 42:59-69.
- Kebîèche M. (2009). Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de magister en Biochimie. *Université Mentouri Constantine.* 32-33pp.
- Kebîèche M., Lakroun Z., Mraïhi Z., Soulimani R. (2011). Effet antidiabétogène et cytoprotecteur de l'extrait butanolique de *Ranunculus repens* L. et de la quercétine sur un modèle expérimental de diabète alloxanique. *Phytothér.* 9:274-282.
- Kim J.S., Kwon C.S., Son K.H. (2000). Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 64: 2458-2461.
- Kohen R., Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicolo. Path.* 30: 620-650.
- Kon K., Ikejima K., Okumura K., Aoyama T., Arai K., Takei Y., Lemasters J.J., Sato N. (2007) Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *J Gastroenterol. Hepatol.* 22: 49-52.
- Kramhøft B., Bak-Jensen K., Mori H., Juge N., Nohr J., Svensson B. (2005). Involvement of individual subsites and secondary substrate binding sites in multiple attack on amylase by barley α -amylase. *Biochem.* 44: 1824-1832.
- Kumari A., Kakkar P. (2012). Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering the Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. *Lif. Scie* 90: 561-570.
- Kuntie V., Pejje N., Ivkovic B., Vugje Z., Ilie K., Micie S., Vukojevic V. (2007) Isocratic R-P-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 43 : 718-721.
- Kupeli E., Orhan D.D., Yesilada E. (2006). Effect of *Cistus laurifolius* L. leaf extracts and flavonoids on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J. Ethnopharm.* 103: 455-460.
- Lahouel M., Boulkour S., Segueni N., Fillastre J.P. (2004). Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Path. Biol.* 52: 314-322.
- Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. et Lee C. Y. (2003) .Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food .Chem.* 51 :7292-7295.
- Lo Piparo E., Scheib H., Frei N., Williamson G., Grigorov M., Chou C.J. (2008). Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human α -Amylase. *J. Med. Chem.* 51: 3555-3561.

Références Bibliographiques

- Mamyrbékova-Békro J. A., Konan K. M., Békro Y. A., Djié Bi M. G., Zomi Bi T. J., Mambo V., Boua B. B. (2008). Phytochemicals of the extracts of four medicinal plants of Côte d'Ivoire and assessment of their potential antioxidant by thin layer chromatography. *Eur. J. Sci. Res.* **24**: 219-228.
- Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de dépsides. *Thèse de doctorat de l'université de Limoges*. 123pp.
- Markham, K.R. (1982). Techniques of flavonoids identification. *Ed. Academic Press, London, 1-113pp.*
- Marston A., Hostettmann K. (2006). Separation and quantification of flavonoids. In Oyvind M.A, Markham K.R. Chemistry, biochemistry and application. *Ed. Crc .Press .Taylor*. 175pp.
- Mc Donald S., Prenzler P.D., Autolovich M. , Robards K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food. Chem.* **73**:73-84.
- McGill M. R., Williams C. D., Xie Y., Ramachandran A., Jaeschke H. (2012). Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: Comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol. App. Pharmacol.* **264**: 387-394.
- Mensah A.Y., Houghton P.J., Akyirem G.N., Fleischer T.C., Mensah M.L., Sarpong K., Adosraku R. (2004). Evaluation of the antioxidant and free radical scavenging properties of *Secamone afzelii* Rhoem. *Phytother. Res.* **18**: 2-1031.
- Michelle de Sales P., Monteiro de Souza P., Simeoni L.A., Pérola de Oliveira M., Dâmaris S. (2012). α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *J Pharm .Pharmaceut. Sci.* **15**:141 - 183.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. rev.* **52**: 673-751.
- Mitchell J.R., Jollow D.J., Potter W.Z., Gillette J.R., Brodie B.B.(1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J.Pharmacol .Exp .Ther.* **187**:211-217.
- Mizuno C.S. , Chittiboyina A. G. , Kurtz T.w. , Pershadsingh H. A. , AveryM. A. (2008). Type 2 diabetes and oral antihyperglycemic drugs. *Cur.Med. Chem.* **15** : 61-74.
- Nagi M. N., Almakki H. A., Sayed-Ahmed M.M., Al-Bekairi A .M. (2010). Thymoquinone supplementation reverses acetaminophen-induced oxidative stress, nitric oxide production and energy decline in mice liver. *Food. Chem. Toxicol.* **48**:2361-2365.
- Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R., Krishina D.R. (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian.J. Pharmacol.* **33**:2-16.
- Oboh G., Ademiluyi A.O., Akinyemi A. J., Henle T., Saliu J.A.,Schwarzenbolz U. (2012). Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) *in vitro*. *J. Func. Foods.* **4** :450-458.

Annexes

Références Bibliographiques

Olaleye M.T., Rocha B.T.(2008). Acetaminophen-induced liver damage in mice: effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. *Exp. Toxicol. Pathol.* **59**:319–27.

Özgüven M. , Tansi S. (1998). Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L as in influenced by ecological and ontogenetical variation. *Turk. J. Agric. forest.* **22** :537-542.

Park H. J., Cha H. C. (2003). Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean. J. Biol. Socie.* **7** :327-330.

Pasero L., Mazzei-Pierron Y., Abadie B., Chicheportiche Y., Marchis-Mouren G. (1986). Complete amino acid sequence and location of the five disulfide bridges in protein pancreatic α -amylase. *Eiochim. Biophys. Acta.* **869**: 147- 157.

Payan F. (2004). Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors . *Biochimica. Biophysica. Acta.* **1696** : 171-180.

Pieroni A., Janiak V., Dürr C. M., Lüdeke S., Trachsel E. and Heinrich M. (2002). In vitro Antioxidant Activity of Non-cultivated Vegetables of Ethnic Albanians in Southern Italy. *Phytother. Res.* **16**: 467-473.

Pietta P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. natur. prod.* **63**: 1035-1042.

Qin X., Ren L., Yang X., Bai F., Wang L., Geng P., Bai G., Shen Y. (2011). Structures of human pancreatic α -amylase in complex with acarviosatins: Implications for drug design against type II diabetes. *J. Struct. Biol.* **174**: 196-202.

Qlan M., Spinelli S., Driguez H., Payan F. (1997) . Structure of a pancreatic α -amylase bound to a substrate analogue at 2.03 Å resolution . *Pro .Sci.* **6**:2285-2296.

Radulian G., Rusu E., Dragomir A., Posea M. (2009). Metabolic effects of low glycaemic index diets. *Nutr. J.* **8**: 5pp.

Reis P.M., Lourenco P.L., Domingos A., Clemente A.F., Pais M.S ,Malcata F.X. (2000). Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese. *Int. Dairy. J.* **10**: 775-780.

Rice-Evans C. (2001) Flavonoid as Antioxidants. *Cur. Med. chem.* **8**: 797-807.

Santin J. R., Lemos M; Klein L.C. C., Niero R. , Andrade S. F.(2010). Antiulcer effects of *Achyrocline saturoides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Marcela), a folk medicine plant, in different experimental models. *J. Ethnopharm.* **130**: 334-339.

Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K.(2006) .Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids . *J. phytochem* .**67**: 2058-2070.

Shiekh T. A., Arjumand W., Nafees S., Seth A., Nemat A., Rashid S., Sultana S. (2012). Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation . *Toxicol. Let.* **208** :149- 161.

Sies H., Sharov V.S., Klotz L.O., Briviba K.(1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J. Biol. Chem.* **272**:27812–27817.

Références Bibliographiques

Smith C.V., Jaeschke H. (1989). Effect of acetaminophen on hepatic content and biliary efflux of glutathione disulfide in mice. *Chem. Biol. Interact.* 70: 241-248.

Sneha J. A., Chaudhari S. (2011) Alphaamylase inhibitory and hypoglycemic activity of clerodendrone multiflorum lim stems. *Asi. J. Pharm. Clin. Res.* 4 : 99102.

Sudha P., Smita S.Z., Shobha Y.B., Ameeta R. K. (2011). Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *Bmc. Compl. Alter. Med.* 11:51472-6882.

Sugiyama T., Sadzuka Y., Shimoi K., Kinai N., Hirota S. (1997). Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol. Let.* 92: 1-7.

Svensson B., Jensen M., Mori H., Bak-Jensen K., Bonsager B., Nielsen P., Kramhøft B., Praetorius-Ibba M., Nohr J., Juge N., Greffe L., Williamson G. & Driguez H. (2002). Fascinating facets of function and structure of amyolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13. *Biol. Bratis.* 57 : 5-19.

Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K. (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shell fish. *Brusci. Biotech. Biochem.* 58 : 1780-1783.

Tan T.C., Mijts B.N., Swaminathan K., Patel B.K. C., Divne C. (2008). Crystal Structure of the Polyextremophilic α -Amylase AmyB from Halothermothrix orenii: Details of a Productive Enzyme-Substrate Complex and an N-Domain with a Role in Binding Raw Starch. *J. Mol. Biol.* 378 : 852-870.

Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food. Chem.* 90: 333-340.

Thomas S. H. L. (1993). Paracetamol (Acetaminophen) Poisoning. *Pharmac. Ther.* 60: 91-120.

Tundis R., Loizzo M.R., Menichini F. (2010). Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini. Rev. Med. Chem* 10:315-331.

Ufuk K., Pes I. (2009). In Sutar, Keles H., Yesilada E., Kupeli E. A. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng article. *J. Ethnopharm.* 126: 551-556.

Van Acker S.A.B.E., Van Den Berg D.J., Tromp M.N.L., Griffioen D.H., Bennekou W.P.V., Van Der Vijgh W.J.F., Bast A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free. Rad. Biol. Med.* 20: 331-342.

Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. (2004). The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Cur. Pharm Des.* 10: 1677-1694.

Wassmann S., Wassmann K., Nickenig G. (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten.* 44: 381-386.

Weinman S. (2004). *Toute la biochimie. Ed. Dunod. Paris. 142pp.*

Références Bibliographiques

- Welsh S. L. (1974). Anderson's flora of Alaska and adjacent parts of Canada. *Brigham University Press*. 724 pp.
- Wendel A., Jaeschke H., Kleinwaechter C. (1988). Xenobiotic-induced lipid peroxidation and glutathione status of mouse liver. In: Sevanian, A. (Ed.), *Lipid Peroxidation in Biological Systems*. Aocs Press, Champaign, IL: 71-83pp.
- Whitcomb D.C., Lowe M.E. (2007). Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Dig. Dis. Sci.* 52: 1-17.
- Williamson G., Day A.J., Plumb G.W., Couteau D. (2000). Human metabolic pathways dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 16-22.
- Wolin M.S., Ahmed M., Gupte S.A. (2005). Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms : basic concepts ,current controversies ,and potential importance of cytosolic NADPH. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 289: 159-173.
- Yayli N., Baltaci C., Gök Y., Aydin E , Üçün O. (2004). Sesquiterpene lactones from *Centaurea helenioides* Boiss.. *Turk. J. Chem.* 30: 229 -233.
- Yen F.L., Wu T.H., Lin L.T., Lin C.C. (2007). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *J. Ethnopharm.* 111: 123-128.
- Yi Z. B., Yu Y., Liang Y. Z., Zeng B. (2007). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *Lwt. Food. Sci. Tech.* 4: 1000-1016.
- Younes M., Cornelius S., Siegers C.P. (1986). Ferrous ion supported *in vivo* lipid peroxidation induced by paracetamol - its relation to hepatotoxicity. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 51:89-99.

Annexe 1

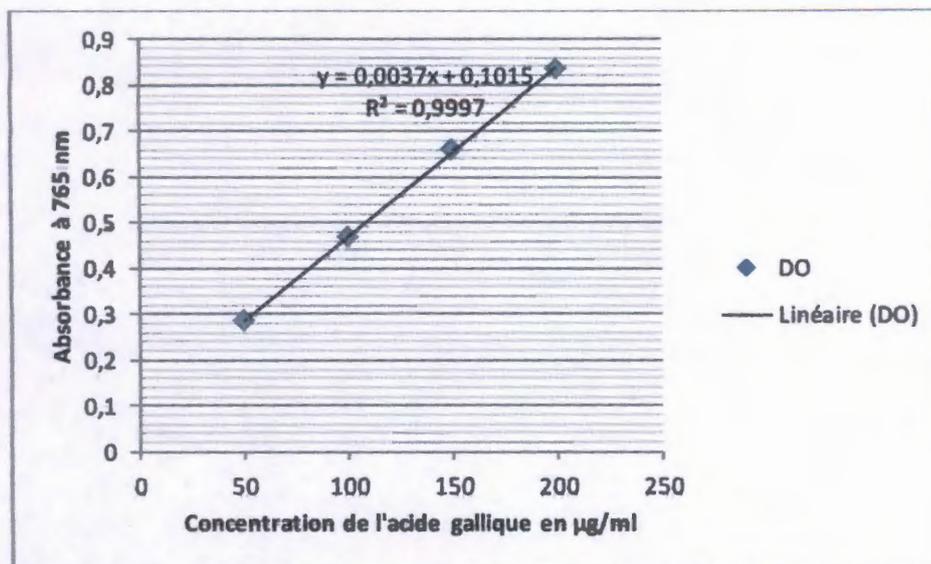


Figure 1 : courbe d'étalonnage de dosage des polyphénols

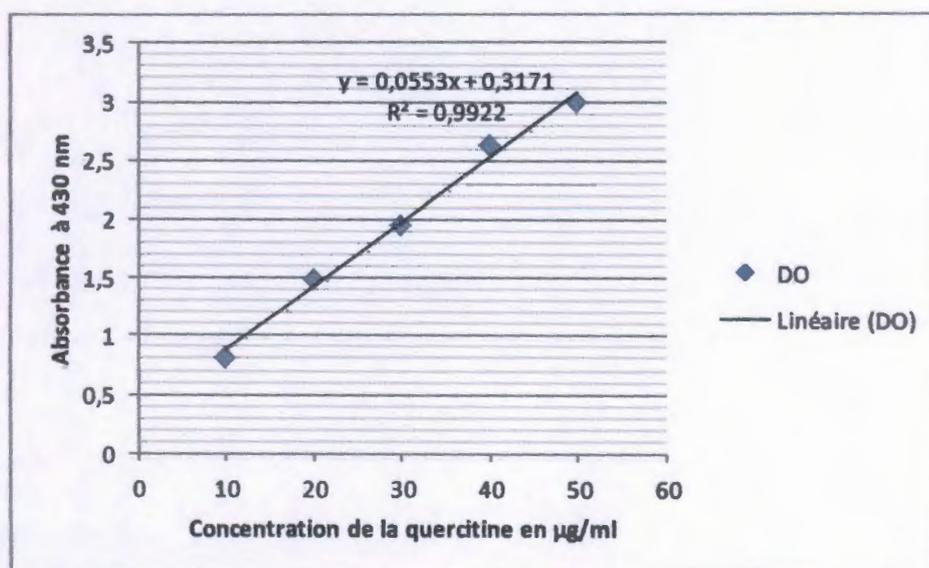


Figure 2 : courbe d'étalonnage de dosage des flavonoïdes

Annexes

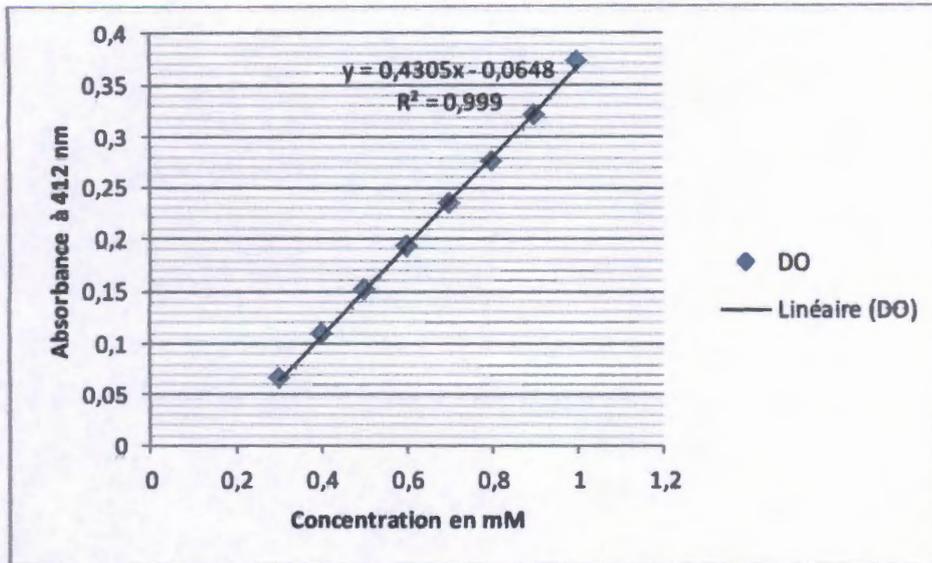


Figure 3: courbe d'étalonnage de dosage du glutathion

Annexes 2

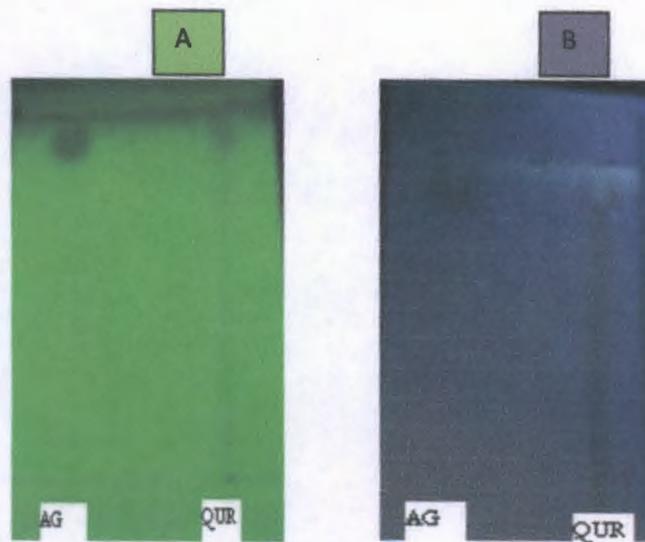


Figure1: Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des témoins : Acide gallique(AG) et Quercitine (QUR) par CCM (dans le système solvant : BAW 60 : 15 : 25).

A : chromatogramme photographié sous lampe UV à 254 nm.

B : chromatogramme photographié sous lampe UV à 366 nm

Annexes

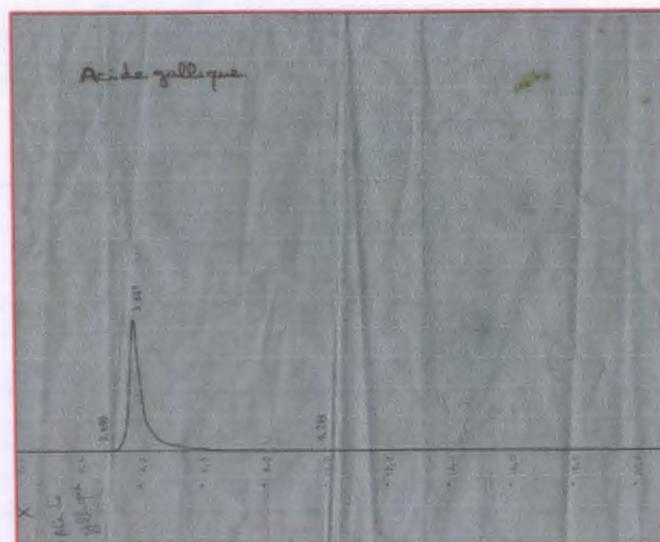
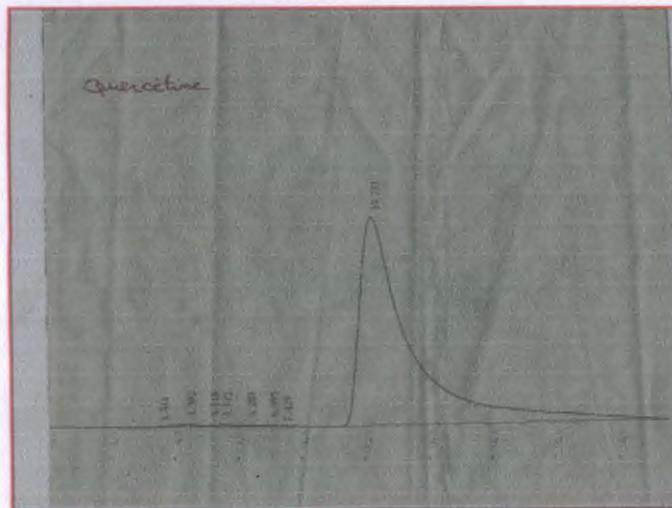


Figure 2 : Chromatogrammes d'HPLC des standards ; Quercetine et Acide gallique

الملخص

ارتكز عملنا على دراسة التأثير البيولوجي لمستخلصي نباتين (*Ranunculus repens L.* منطقة الطاهير) و (*Centaurea calcitrapa* منطقة قاوس) بين التحليل الكيفي بواسطة CCM و HPLC ان المستخلصين يحتويان على بعض المركبات الفينولية والفلافونيدية بنسب معتبرة (حمض القليليك والكرستين)، والتي يتوقع أن تعود إليهما الخصائص العلاجية، كما أن تقييم النشاط المضاد للاكسدة بتقنية الجدرالحر DPPH بينت ان المستخلصين يظهران كمصائد جيدة للجذور، وكذلک اوضحت دراسة نشاط هذين المستخلصين على النشاط الانزيمي الفا اميلاز انهما مثبطان لهذا الانزيم بطريقة لاتنافسية (*Ranunculus repens L.*) أو بطريقة غيرتنافسية (*Centaurea calcitrapa*). Incompetitive أما الدراسة المجراة على الفئران، قد كشفت أن المعالجة المتزامنة بواسطة المستخلصين بجرعة 100 مغ/كغ يوميا لمدة 6 أيام عن طريق الفم له تأثير علاجي محتمل ضد التسمم الكبدی و الملاحظ لدى المجموعة التي أخذت فقط جرعة واحدة من البراسيتامول 150 مغ/كغ يوميا لمدة 6 أيام عن طريق الفم. هذه الجرعات تسببت في حدوث زيادة معتبرة في أنشطة TGO و TGP، وانخفاض انظمة الدفاع المضادة للاكسدة الغير انزيمية الأكثر أهمية في العضوية الغلوتاثيون (GSH) لكن المعالجة المتزامنة خفضت هذه السمية من خلال احتمال ترميم و/ أو حماية الأنظمة المضادة للاكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Ranunculus repens L.*, *Centaurea calcitrapa*, DPPH, الفا اميلاز, المركبات الفلافونيدية التسمم الكبدی, البراسيتامول, الغلوتاثيون.

Resumé

Notre travail a porté sur l'étude des propriétés biologiques d'extraits bruts de deux plantes *Ranunculus repens L.* (Taher) et *Centaurea calcitrapa* (Kaous). L'analyse qualitative par CCM et HPLC a illustré que nos extraits sont riches en composés phenoliques et flavonoidiques (acide galique et quercetine) dont les effets bénéfiques peuvent leurs êtres attribués dont l'activité anti-radicalaire (test au DPPH°) qui a révélé que nos extraits sont des bons piègeurs de radicaux libres. L'autre potentiel analysé pour nos deux plantes, est l'activité anti-apha-amylasique, qui a montré une importante inhibition de l'activité de cette enzyme, inhibition qui est soit non-compétitive (*Ranunculus repens L.*) ou incompétitive (*Centaurea calcitrapa*). Etude *in vivo*, menée sur des souris, a révélé l'éventuel effet hepatoprotecteur d'un co-traitement *per os* par les extraits bruts à raison de 100mg/kg/6j pour prévenir l'hépatotoxicité observé avec le lot recevant uniquement du paracétamol (150 mg/kg/6j) où le paracétamol a provoqué une augmentation significative des activités des TGO, TGP et une diminution du système de défense antioxydant non-enzymatique le plus important de l'organisme (GSH). Cependant, le co-traitement réduit cette toxicité à travers une restauration et/ou protection des systèmes antioxydants.

Mots clés : *Ranunculus repens L.*, *Centaurea calcitrapa*, composés flavonoidiques, DPPH, hépatotoxicité, paracetamol, alpha amylase, GSH.

Abstract

Our work focused on the study of biological effect of the rough extracts of two natural plants which are called *Ranunculus repens L.* (Taher) and *Centaurea calcitrapa* (Kaous). The qualitative analysis by CCM and HPLC showed that the extracted products are rich in phenolic and flavonoids compounds (galic acid and quercetine), the researched activities could be attributed to them. However the anti-radicalar activity (DPPH test) have showed that our extracts seemed to be good free radicals scavengers. The other potential analysed of our plants is anti-alpha-amylasic activity, which has revealed an important inhibition of this enzyme activity, which is either a noncompetitive (*Ranunculus repens L.*) or uncompetitive (*Centaurea calcitrapa*). The *in vivo* study which carried out on mice has revealed the hepatoprotector effect of co-treatment with rough plant extract (100 mg/kg/ 6days) to prevent induced hepatotoxicity with paracetamol (150/mg/kg), revealed by a rise activities of TGO and TGP, and a diminution of anti-oxidant defending system GSH. The co-treatment reduces this toxicity throughout an storage or anti-oxidant protection system.

Key words: *Ranunculus repens L.*, *Centaurea calcitrapa*, flavonoids compounds, DPPH, alpha amylase, hepatotoxicity, paracetamol, GSH.