

جامعة محمد السادس بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 4895

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel

جامعة جيجل

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلية



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie
Option : Pharmacologie Expérimentale

Thème

Contribution à l'étude phytochimique et évaluation
des activités antioxydante et anti-inflammatoire des
extraits de la plante *Thapsia garganica* L. sur des
modèles expérimentaux chez le rat Wistar

Membres du jury :

- Président : Dr. RECHRECHE Hocine
- Examinatrice : Mme HIRECHE Saliha
- Promoteur : Mme BENGUEDOUAR Lamia

Présenté par :

- ATTOUM Faris
- CHABOUNIA Fatima
- LAHOUEL Badreddine

Année universitaire : 2011/2012

A nos familles, et nos amis,

Remerciements

Ce travail laborieux n'aurait pas été réalisé sans la collaboration de plusieurs personnes dont en tiens aujourd'hui à leurs présenter nos sincères remerciements et reconnaissance.

À notre promoteur, Mme BENGUEDOUAR Lamia, qui, par la patience, la bienveillante attention et tous les conseils avisés qu'elle nous a constamment prodigués, conseils qui ne manqueront pas de nous soutenir et de nous éclairer tout au long de notre future carrière.

Nous tenant à lui exprimer toute notre reconnaissance et nos sincères remerciements

À notre jury de mémoire, Docteur RECHRECHE Hocine pour avoir accepté de consacrer du temps, examiner et juger ce travail et pour siéger dans ce jury en y apportant sa compétence et son expertise.

Nous remercions vivement Mme HIRECHE Saliha, pour sa participation à notre jury et pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de juger ce travail, nous la remercions infiniment aussi pour nous avoir venu en aide en nous fournissant le pied à coulisse pour la réalisation de l'étude de l'activité anti-inflammatoire, qu'elle trouve ici l'expression de toute notre respectueuse reconnaissance.

Nous adressons l'expression de notre profonde gratitude au Professeur LAHOUEL Mesbah pour nous avoir permis de réaliser une bonne partie de notre travail dans le laboratoire de toxicologie moléculaire et pour ses précieux conseils qui nous ont marqué le long de notre formation.

Nous adressons nos sincères remerciements au Professeur KHELLILI pour nous avoir permis d'utiliser l'homogénéiser de Dounce et le spectrophotomètre de Laboratoire de pharmacologie et phytochimie.

Nous remercions infiniment Mme ZINE Houria de laboratoire de pédagogie, Mr BOUSDIRA Yahia et Melle BRIHOUM Hadjer de laboratoire de toxicologie moléculaire pour leur patience, leur présence et pour leur bienveillance à ce qu'on aura tout le matériel et produits nécessaires à notre travail, nous les remercions infiniment aussi pour leur assistance et collaboration.

Nous remercions Mr SEBTI Mohammed pour avoir participé à l'identification botanique de la plante Thapsia garganica L. et pour les références utiles qu'il nous a fourni.

Nos remerciements vont aussi à Mme BENCHARIF et à ses étudiants Mehrez et Abdel basset de l'INATAA qui nous ont procuré une partie des animaux de laboratoire.

Nous sommes aussi redevables de l'aide fournie par tout le personnel des laboratoires de pédagogie, de l'animalerie, du département de biologie moléculaire et cellulaire, du laboratoire de recherche en toxicologie moléculaire et du laboratoire de recherche en pharmacologie et phytochimie de l'université de Jijel, nous les remercions pour leur assistance, leurs encouragements et l'atmosphère chaleureuse dans laquelle ils nous ont permis de réaliser ce travail.

Enfin, nous adressons nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce présent travail.

Sommaire

Sommaire.....	i
Liste des abréviations.....	iv
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Introduction.....	1
Partie 1 : Analyse bibliographiques	
Chapitre 1 : Stress oxydatif	
I. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène.....	3
I.1. Les sources exogènes.....	3
I.2. Les sources endogènes.....	3
II. Les antioxydants.....	4
II.1. Système antioxydant enzymatique.....	4
II.2. Système antioxydant non-enzymatique.....	5
III. Conséquences du stress oxydatif.....	6
III.1. La peroxydation lipidique.....	6
III.2. Les dommages oxydatifs de l'ADN.....	7
III.3. Les dommages des protéines.....	7
III.4. Les dommages sur les sucres.....	8
IV. Stress oxydatif et chimiothérapie.....	8
IV.1. Structure et mécanisme d'action de la doxorubicine.....	9
IV.2. Toxicité de la doxorubicine.....	10
Chapitre 2 : Inflammation	
I. Mécanisme physiopathologique de l'inflammation.....	11
II. Les médiateurs de l'inflammation.....	12
III. Pharmacologie anti-inflammatoire.....	13
Chapitre 3 : Les composés phénoliques	
I. Principales classes des composés phénoliques.....	14
I.1. Les acides phénoliques simples.....	14
I.2. Les flavonoïdes.....	14
I.2.1. Classification des flavonoïdes.....	15
I.2.2. Activités pharmacologiques des flavonoïdes.....	15
Chapitre 4 : La plante <i>Thapsia garganica</i> L.	
I. Aspect botanique.....	17

I.1. Taxonomie.....	17
I.2. Identification.....	17
I.3. Localisation.....	18
II. Ethnopharmacologie.....	18
III. Les activités biologiques de <i>T. garganica</i>	19
Partie 2 : Matériel et Méthodes	
I. Matériel végétal et contribution à l'étude phytochimique.....	21
I.1. Préparation de l'extrait brut de <i>T. garganica</i>	21
I.1.1. A partir des racines.....	21
I.1.2. A partir de la partie aérienne.....	22
I.2. Extraction des composés phénoliques.....	22
I.3. Dosage des polyphénols totaux.....	24
I.4. Dosage des flavonoïdes.....	24
II. Etude de l'activité anti-radicalaire de <i>T. garganica</i>	25
III. Etude des effets de <i>T. garganica in vivo</i>	25
III.1. Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne de <i>T. garganica</i> sur le stress hépatique induit par la doxorubicine.....	25
III.1.1. Traitement des animaux.....	26
III.1.2. Sacrifice des animaux et prélèvement de foie.....	26
III.1.3. Evaluation du stress oxydatif dans la cellule hépatique.....	26
III.2. Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut de <i>T. garganica</i>	32
III.2.1. Traitement des animaux.....	32
III.2.2. Calcul.....	33
III.3. Evaluation statistique.....	33
Partie 3 : Résultats et Discussion	
I. Etude phytochimique.....	35
I.1. Extraction des composés phénoliques.....	35
I.2. Dosage des composés phénoliques.....	36
II. Evaluation de l'activité anti-radicalaire de <i>T. garganica in vitro</i>	38
III. Etude des effets de <i>T. garganica in vivo</i>	40
III.1. Effets des flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne de <i>T. garganica</i> sur le stress hépatique induit par la doxorubicine.....	40
III.1.1. Activité de la superoxyde dismutase et de la catalase hépatiques.....	41

III.1.2. Activité de la glutathion-S-transferase hépatique et variation des concentrations hépatiques en glutathion	43
III.1.3. Variation des concentrations hépatiques en Malonyldialdéhyde.....	45
III.2. Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut de <i>T. garganica</i>	47
Partie 4 : Conclusion.....	52
Partie 5 : Références bibliographiques.....	54
Résumés.....	61
Annexe.....	65

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: oxygène singulet

A2 : Phospholipase

AINS : Anti-Inflammatoires Non Steroïdiens

BSA: Bovin Serum Albumin

CAT: Catalase

CDNB: Chlorodinitrobenzène

Cox : Cyclo-oxygenase

DOX : Doxorubicine

DTNB : acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque

EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion-S-transferase

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

HO° : Radical hydroxyle

LO° : Radical alcoxyle

LOO° : Radical peroxile

LOOH: Hydroperoxyde lipidique

MDA: Malonyldialdéhyde

NaCN : Cyanide de sodium

NAD^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé

NADPH, H^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NBT : nitroblue tetrazolium

NO° : Oxyde nitrique

NOS: Nitric oxyde synthase

O₂[°] : Anion superoxide

Prx : Thiorédoxines peroxydases

ROS; reactive oxygen species

SOD: Superoxyde dismutase

TBA: Acide Thiobarbiturique

TBARS: Thiobarbituric acid-reactive substances

TCA: Trichloroacide Acétique

TNB: Acide Thionitrobenzoïque

TPII: Topoisomérase II

XO: Xanthine oxidase

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de la doxorubicine.....	9
Figure 2 : Cycle redox de la doxorubicine.....	10
Figure 3 : Les étapes du processus inflammatoire.....	12
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.....	14
Figure 5 : La plante <i>Thapsia garganica</i> L dans son milieu naturel.....	17
Figure 6 : Structure de thapsigargine.....	19
Figure 7 : Schéma de l'extracteur Soxhlet.....	21
Figure 8 : Schéma de fractionnement des flavonoïdes.....	23
Figure 9 : Réaction d'Ellman.....	30
Figure 10 : Effet scavenger in vitro de l'extrait des flavonoïdes monoglycosides de <i>T. garganica</i> à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C...	39
Figure 11 : Effet scavenger in vitro de l'extrait brut de la partie aérienne de <i>T. garganica</i> à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C..	39
Figure 12 : Effet scavenger in vitro de l'extrait brut des racines de <i>T. garganica</i> à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.....	40
Figure 13 : Effet des flavonoïdes sur l'activité de la SOD dans le foie.....	41
Figure 14 : Effet des flavonoïdes sur l'activité de la CAT dans le foie.....	42
Figure 15 : Effet des flavonoïdes sur l'activité de la GST dans le foie.....	44
Figure 16 : Effet des flavonoïdes sur le niveau cytosolique de GSH dans le foie.....	44
Figure 17 : Effet des flavonoïdes sur la production du MDA dans les cellules hépatiques	46
Figure 18 : Pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème après un traitement ou non avec l'extrait brut des racines de <i>T. garganica</i> ou le diclofénac.....	49

Liste des tableaux

Tableau I : Systématique de la plante <i>T. garganica</i> L.....	17
Tableau II : Rendement d'extraction des composés phénoliques à partir des racines et de la partie aérienne de <i>T. garganica</i>	35
Tableau III : Evaluation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes des racines et de la partie aérienne de <i>T. garganica</i>	37
Tableau IV : Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides.....	41
Tableau V : Variation de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique hépatique chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides.....	42
Tableau VI : Variation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides.....	43
Tableau VII : Variation des concentrations hépatique en glutathion chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides.....	44
Tableau VIII : Variation du taux du MDA cytosolique chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides.....	46
Tableau IX : Effet de l'extrait brut de <i>T. garganica</i> et du Diclofénac sur l'œdème inflammatoire de la patte de rat induit par la carragénine.....	48
Tableau X : Pourcentage d'inhibition de l'œdème après un traitement ou non avec l'extrait brut des racines de <i>T. garganica</i> ou un anti-inflammatoire de référence le diclofénac.....	49

Introduction

Les plantes médicinales ont été utilisées depuis l'antiquité pour la prévention et le traitement des diverses maladies et les médicaments actuels ont, pour la majorité d'entre eux, une origine naturelle. La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis des années, et la recherche de nouveaux composés actifs, se dirige de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles.

Parmi ces sources naturelles dont notre région Jijelienne en est riche nous avons choisi la plante *Thapsia garganica* L., qui est une plante utilisée en médecine traditionnelle algérienne, principalement sous forme de préparations à partir des racines contre les douleurs rhumatismales et les bronchites, mais, à cause de sa toxicité, l'utilisation de cette plante est limitée. Ainsi, les travaux de recherche sont beaucoup plus concentrés sur la thapsigargine, un sesquiterpène lactone issu de cette plante et qui possède la propriété de provoquer l'apoptose via des mécanismes de perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire en inhibant les pompes Ca^{2+} ATPase du réticulum endoplasmique et sarcoplasmique (SARCA), cette propriété est devenu un moyen très répandu pour l'étude de l'apoptose. Récemment, Des études cliniques ont été lancées pour tester un nouveau anticancéreux à base de thapsigargine qui vise le traitement des tumeurs prostatiques.

Cependant, peu de travaux ont été effectués sur les autres métabolites de la plante et principalement les polyphénols et les flavonoïdes et leurs activités pharmacologiques potentielles.

Le but de notre travail est de tester l'effet antioxydant et anti-inflammatoire des extraits de *Thapsia garganica* L. Pour cela notre travail a été réparti en trois étapes essentielles, comme première étape la réalisation des extractions à partir des différentes parties de la plante (racines, feuilles et fleurs). Une extraction par Soxhlet a été effectuée pour extraire la majorité des composés dans un extrait brut qui a été soumis à une série d'affrontements par différents solvants dans le but de séparer des molécules selon leur solubilité. Après la récupération des différentes fractions, des tests *in vitro* visant le dosage des teneurs en composés phénoliques et flavonoïdiques ont été effectués, puis une évaluation de l'activité antioxydante par la méthode au DPPH° des différentes fractions et extraits bruts obtenus. Le screening des différents extraits aboutissant à une fraction intéressante de la partie aérienne qui a été choisie pour l'étude de l'activité antioxydante *in vivo*. L'extrait brut des racines a été utilisé pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*.

Analyse Bibliographique

Dans les systèmes vivants, une production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) se fait d'une manière continue et volontairement programmée, vu leur participation à de nombreuses réactions essentielles pour les organismes aérobies. Les radicaux libres (RL) sont des espèces chimiques indépendantes possédant un ou plusieurs électrons célibataires qui leurs confèrent une réactivité vis-à-vis d'autres molécules (Delattre, 2005). Les ROS regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires d'oxygène tels l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) et le radical hydroxyle OH° mais aussi non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'oxygène singulet 1O_2 . En plus des fonctions biologiques, la réactivité particulière des ROS ajoute des propriétés toxiques qui sont à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé « stress oxydant ».

Le stress oxydant peut être défini comme étant un déséquilibre entre la production et l'élimination des ROS en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels et à des dégâts cellulaires (Durackova, 2010).

I. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène

On distingue deux origines principales des ROS ; endogène et exogène :

1. Les sources exogènes

Les sources exogènes peuvent être représentées par les facteurs environnementaux, exposition prolongée au soleil, à l'ozone, tabagisme, consommation excessive d'alcool, pollutions diverses, produits chimiques, contact avec des agents cancérogènes, consommation de médicaments, les rayonnements qui produisent les anions superoxydes ou de l'oxygène singulier après activation de photosensibilisants. Ainsi que des contaminations par des métaux lourds (Priyadarsini, 2005) comme le chrome, le vanadium et le cuivre mais aussi le fer libre qui génère en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) des radicaux hydroxyles très réactifs par la réaction de Fenton selon l'équation suivante :



2. Les sources endogènes

Dans l'organisme il y a de nombreuses sources de ROS dont l'importance varie selon les tissus. Les sources cellulaires des ROS sont classées en enzymatiques et non enzymatiques (Droge, 2001). Parmi ces sources enzymatiques, la NADPH oxydase qui est une enzyme présente dans la paroi vasculaire et qui génère $O_2^{\circ-}$ en utilisant NADPH comme substrat (Salvayre et al., 2003). La xanthine-oxydase joue de son côté un rôle important dans la

production des ROS particulièrement O_2^- et H_2O_2 en réduisant l'hypoxanthine en xantine et la xantine en acide urique (Harrison, 2002). Beaucoup de cellules sont aussi capables de produire le monoxyde d'hydrogène (NO°) à partir de l'argénine et de l'oxygène, par une réaction catalysée par la NO synthase. Le réticulum endoplasmique contient des enzymes qui catalysent les réactions de détoxification des drogues liposolubles, la plus connue de ces enzymes et le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques et produit ainsi des ROS. De plus, dans l'organisme, l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries par voie enzymatique en molécules non toxiques comme H_2O , il peut néanmoins subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'anion superoxyde. Le peroxydosome est l'une des sources non enzymatiques importantes dans la production cellulaire de H_2O_2 car cet organite contient de nombreuses enzymes générant du H_2O_2 .

II. Les antioxydants

Ce sont des molécules produites par l'organisme ou bien apportées par l'alimentation et qui assurent la diminution des concentrations des entités oxydantes dans l'organisme.

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui, présente à faible concentration, entre en compétition avec un substrat oxydable et ainsi retarde ou inhibe significativement son oxydation (Halliwell et Gutteridge, 1990). Le système de défense contre le stress oxydatif est très large et inclut des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

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

La catalase est l'une des enzymes antioxydantes les plus efficaces. C'est une enzyme tétramérique, chaque unité portant un groupement hème et une molécule NADPH. Elle catabolise les peroxydes d'hydrogène générés lors de la dismutation de l'anion superoxyde en

molécule d'eau (Matès, 2000). La catalase est principalement localisée dans les peroxysomes et dans les érythrocytes.

La glutathion peroxydase (GPx) est la plus importante enzyme neutralisante de l' H_2O_2 chez les mammifères. Elle est formée de quatre tétramères contenant chacun des atomes de sélénium incorporés dans une molécule de sélénocystéine. Elle assure la réduction du H_2O_2 en eau, des hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (ROH), et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires en utilisant comme donneur d'électrons le glutathion réduit (GSH). Les molécules du GSSG ainsi obtenus sont réduites par le glutathion réductase à l'aide du cofacteur NADPH sous forme réduite (NADPH, H^+). La GPx est présente dans les liquides extracellulaires, et dans les cellules au niveau du cytosol, des mitochondries et des membranes (Comhair, 2002 ; Mates, 2000). La GR est également localisée dans le cytosol et les mitochondries.

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

Les Glutathion-S-transférases (GST) représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement cytosoliques. Ce sont des enzymes de détoxification glutathion dépendante, qui catalysent la conjugaison du GSH de nombreux substrats (Volm et coll., 1993).

2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

En plus du système enzymatique, la cellule peut disposer de l'appui des molécules antioxydantes non enzymatiques naturelles ou synthétiques qui sont capables de piéger les ROS en captant leur électron libre et en les réduisant ainsi en molécules plus stables. Parmi ces molécules ; le glutathion (GSH) qui est le thiol intracellulaire le plus abondant présent sous forme de tripeptide (γ -L-Glutamyl cystéinyl glycine) et qui joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydatif. Il permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonctions thiols (R-SH). De plus, il piège le peroxyde d'hydrogène et réagit avec l'oxygène singulet et le radical hydroxyle (Larson, 1988).

Parmi les molécules apportées par l'alimentation et possédants un pouvoir antioxydant important, la vitamine E et C sont des antioxydants très puissants ; en effet la vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules de la famille des tocophérols (α , β , γ , δ). Parmi ces quatre isomères, c'est l'alpha tocophérol liposoluble qui possède les activités antioxydantes les plus intéressantes. Il réduit les RL provenant de l'oxydation des lipides et inhibe ainsi la propagation lipidique en cédant son hydrogène situé dans le noyau phénolique. Devenue radicalaire, la vitamine E sera prise en charge par l'acide L-ascorbique.

La vitamine C (acide ascorbique) de son côté est un excellent piègeur des ROS. Elle peut capter le radical hydroxyle, l'oxygène singulet, l'anion superoxyde et aussi réduire le H_2O_2 en H_2O via l'ascorbate peroxydase (Noctor et Foyer, 1998). Une fois oxydée, la vitamine C sera réduite via les ascorbates réductases ou par l'acide alphalipoïque.

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

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

III. Conséquences du stress oxydatif

1. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras membranaires sous l'action des RL conduisant à la formation d'hydroperoxydes (ROOH) instables, responsables de la diminution de la fluidité membranaire et de sa dégradation.

La cible lipidique principale des ROS est les acides gras polyinsaturés très abondants dans la composition des phospholipides membranaires. Le processus général de la peroxydation lipidique se compose en trois étapes essentielles ; l'initiation, la propagation et la terminaison (Catala, 2011). La phase d'initiation commence par une cassure hémolytique d'une liaison suite

à l'attaque d'un radical hydroxyle et parfois même peroxyde (LOO°) ou alcoxyde (LO°), sur l'acide gras pour lui arracher un atome d'hydrogène en formant un site radicalaire sur le carbone avec un électron célibataire. Les phospholipides membranaires sont particulièrement sensibles à cette action vue leur richesse en double liaison qui affaiblissent les liaisons C-H voisines et facilitent l'arrachement de l'hydrogène déclenchant la cascade de peroxydation lipidique. Cette réaction initiale du OH° sur l'acide gras polyinsaturé produit un radical lipidique qui va réagir à son tour avec l'oxygène moléculaire pour former un radical lipidique peroxyde (LOO°). Ce dernier peut avoir deux destins, soit il réagit avec un autre acide gras pour former un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et un nouveau site radicalaire qui répartit dans le circuit de peroxydation et assure donc la propagation, soit il réagit avec une autre entité radicalaire pour former une liaison covalente qui signifie la fin de la cascade de peroxydation.

L'hydroperoxyde lipidique (LOOH) formé au cours de la dernière réaction peut subir un clivage réducteur par les métaux réduits tels que le fer ferrique (Fe^{2+}) ou l'ion du cuivre (Cu^{2+}) et qui aboutit à la formation des radicaux lipidiques alcoxyde dont le MDA et le HNE (Catala, 2009) qui stimulent encore la propagation de la peroxydation lipidique.

2. Les dommages oxydatifs de l'ADN

Il existe cinq altérations majeures que peut causer le stress oxydant sur l'intégrité de l'ADN dont l'oxydation des bases azotées, la formation des sites abasiques, d'adduits intracaténaux, les cassures des brins et les pontages ADN-protéines (Cadet et al., 2002). Ces atteintes peuvent être classées en atteinte par oxydation directe ou indirecte selon le mécanisme en cause.

Ces différents dommages de l'ADN semblent impliqués dans des phénomènes de cancérisation et de mort cellulaire ainsi que dans la perturbation de la signalisation cellulaire et de l'homéostasie en général (Favier, 2003). Cependant, l'élimination des lésions oxydatives de l'ADN est essentielle pour limiter leurs effets mutagènes et cytotoxiques.

3. Les dommages oxydatifs des protéines

Le mécanisme d'oxydation des protéines par les ROS comporte généralement l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine, Les protéines les plus sensibles à cette modification sont ceux qui ont un groupement sulfhydryle (SH), c'est le cas de plusieurs enzymes cellulaires et protéines de transport. L'action des ROS sur les protéines est fortement influée par les métaux de transition comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} (Favier, 2003). Il en résulte plusieurs types de

modifications selon l'intensité du stress subit. Ainsi il peut y avoir formation de liaison croisée entre deux protéines le plus souvent par des ponts disulfures ou formation d'intermédiaires radicalaires ou des coupures de la chaîne peptidique si le stress est très fort ; il peut y avoir aussi une addition de produits de peroxydation lipidique comme le 4-HNE et des modifications des acides aminés de la chaîne latérale. Tous les acides aminés peuvent être oxydés d'une façon réversible ou non, ainsi l'oxydation de la méthionine va donner la méthionine sulfoxyde et la tyrosine la nitrotyrosine. En effet dans le cas de la méthionine celles-ci peut être régénérée par des enzymes méthionine sulfoxyde réductase.

De telles modifications conduisent à la perte de la fonction catalytique ou structurale des protéines affectées dans la majorité des cas, cette perte d'activité rend la protéine plus sensible à l'action des protéases et particulièrement le protéasome et sera donc dégradée.

4. Les dommages oxydatifs sur les sucres

Les atteintes induites par les ROS sur les sucres au cours d'un stress oxydant sont les moins étudiées parmi les biomolécules concernées par ces modifications. Cependant, il est connu que l'oxydation du glucose en présence de métaux peut produire des espèces radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxydes mais c'est surtout les céto-aldéhydes issus de cette réaction qui peuvent causer des dégâts cellulaires en s'attachant aux protéines formant un produit de glycation avancé (AGE, Advanced Glycation End product) et qui peut se terminer par la coupure de la protéine et la perte de sa fonction (Wolff et al., 1989).

IV. Stress oxydatif et chimiothérapie

Peu de familles médicamenteuses ont connu un développement aussi important et rapide que celle des agents anticancéreux. Toutefois, et malgré les progrès réalisés dans la spécificité des molécules développées, ces agents restent incapables d'épargner les cellules normales. Les mécanismes de toxicité varient d'un organe à un autre et aussi d'un agent à un autre. Cependant, l'induction d'un stress oxydatif dans les tissus normaux est impliquée dans un nombre important de ces mécanismes (Jungsuwadee et al., 2012).

La doxorubicine (DOX, Adriamycine ; antibiotique de la famille des anthracyclines) est l'un des agents anticancéreux les plus utilisés vue son efficacité dans le traitement surtout des leucémies et des tumeurs solides mais dont l'utilisation est limitée en raison des effets secondaires qui affectent plusieurs organes, essentiellement le cœur, mais les changements

2. Toxicité de la doxorubicine

La génération des ROS semble être le mécanisme principal de la toxicité des agents anticancéreux. La doxorubicine induit la génération d'une quantité importante des ROS qui peuvent initier la peroxydation lipidique. Cette capacité est due au groupement quinone présent dans sa structure chimique. En présence du NADH, comme donneur d'électrons, ce groupement quinone peut être réduit en un radical semi-quinone. Ce radical peut lui-même être re-oxydé en sa forme quinone en présence de l'oxygène moléculaire avec production d'un anion superoxyde. Le cycle redox entre la forme quinone et semi-quinone de la doxorubicine induit une production accrue du $O_2^{\bullet-}$, et donne ainsi naissance à d'autres ROS (H_2O_2 , OH^-) (Jungsuwadee et al., 2012).

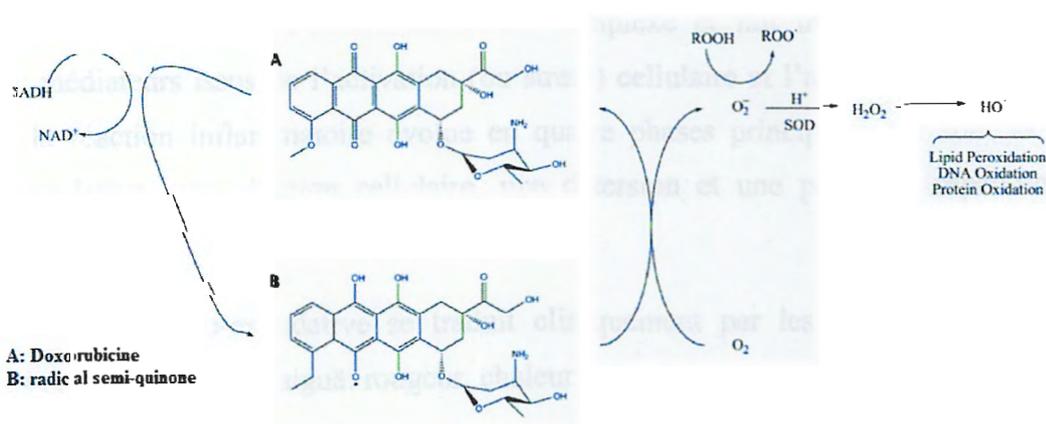


Fig. 2: Cycle redox de la doxorubicine (Pereira et Oliveira, 2008)

L'hépatotoxicité de la doxorubicine est principalement due à l'augmentation de la peroxydation lipidique (Bagchi et al., 1995) mais aussi l'induction du ARNm hépatique, des changements nucléaires, réduction du glutathion, inhibition de la phosphorylation oxydative et l'inhibition de l'enzyme NADPH cytochrome réductase (Zima et al., 2001).

quantité variable les polynucléaires, les histiocytes et des cellules immunologiquement compétentes (lymphocytes et plasmocytes).

La phase de détersion consiste en l'élimination des tissus nécrosés (issus de l'agression initiale ou du processus inflammatoire lui-même), des agents pathogènes et de l'exsudat.

La réparation tissulaire suit une détersion complète. Elle aboutit à une cicatrice si le tissu lésé ne peut régénérer (exemple : neurones ou cellules musculaires myocardiques) ou lorsque la destruction tissulaire a été très importante et/ou prolongée

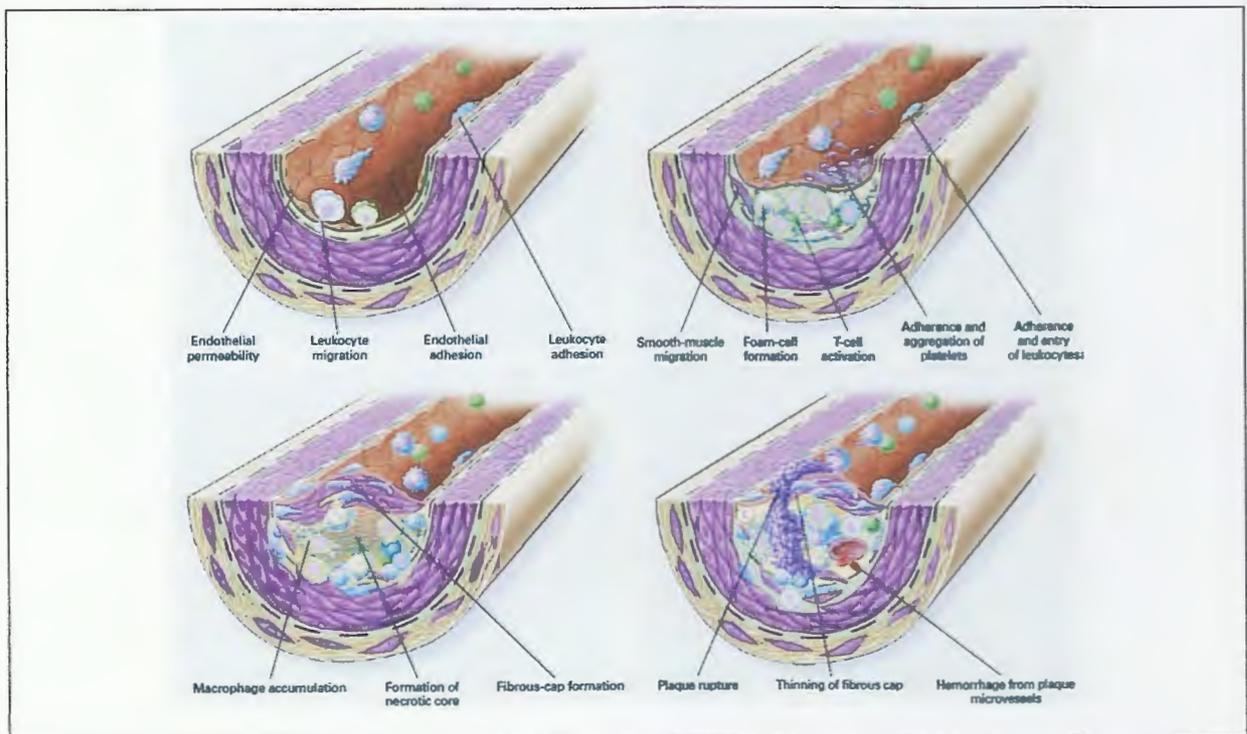


Fig. 3 : Les étapes du processus inflammatoire (Ross, 1999)

II. Les médiateurs de l'inflammation

Le taux de certaines molécules augmente de manière importante et non spécifique au cours du processus inflammatoire. Les amines vasoactives, comme l'histamine, la sérotonine, les kinines et particulièrement la bradykinine sont concernées par cette augmentation vue leur action qui favorise l'afflux de cellules sur le site inflammatoire.

Les médiateurs lipidiques comme la phospholipase A2 qui dégrade les phospholipides en acide arachidonique, la lipo-oxygénase qui produit des leucotriènes aux actions anti-inflammatoires ou les cyclo-oxygénases (Cox) qui métabolisent l'acide arachidonique sont aussi concernés par cette augmentation, en effet, la Cox-1 induit la synthèse de prostaglandines physiologiques qui régulent l'agrégation plaquettaire; la Cox-2 quant à elle favorise la synthèse

de prostaglandines de l'inflammation dans les sites lésés lors des différentes agressions cellulaires.

Les protéines produites par le foie dont la plus importante est la CRP ; initialement décrite dans la pneumonie à pneumocoque, porte son nom car elle réagit avec le C-polysaccharide de la paroi du pneumocoque. Elle appartient à la famille des pentraxines qui ont des interactions avec les constituants nucléaires et se lient aux cellules stressées ou abimées.

III. Pharmacologie anti-inflammatoire

Les anti- inflammatoires sont des médicaments symptomatiques capables de s'opposer au processus inflammatoire quelle qu'en soit la cause, ils agissent sur les signes locaux de l'inflammation : rougeur, chaleur, douleur et œdème. Ils sont classés en deux grandes familles :

- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui sont sans doute la classe médicamenteuse la plus utilisée. Ce sont tous des inhibiteurs des COX et par conséquent ils inhibent la formation des prostaglandines (Nantel et al., 1999). On cite le diclofénac, l'indométacine et le célécoxib.
- Les anti-inflammatoires stéroïdiens, couramment appelés « corticoïdes », sont des dérivés semi synthétiques des hormones corticosurréaliennes et, plus exactement, des glucocorticoïdes (Vane et Botting, 1995).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). Ils participent à plusieurs phénomènes liés au développement de la plante et à son interaction avec son environnement, ainsi ils peuvent assurer le rôle de signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), de moyen de résistance aux diverses agressions et participent à la tolérance des végétaux à des stress variés.

I. Principales classes des composés phénoliques

1. Les acides phénoliques simples

Parmi les principales classes de composés phénoliques, on trouve les acides phénoliques simples représentés par deux groupes principaux : les acides hydroxybenzoïques dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique et l'acide protocatechique qui possèdent une structure de base de type (C6-C1) et qui existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxycinnamiques sont aussi des acides phénoliques simples dérivent de l'acide cinnamique et partagent une structure de base de type (C6-C3) eux aussi existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques, les coumarines, l'acide caféique et l'acide férulique sont les chefs de fil.

2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes également appelés les bioflavonoïdes sont des composés phénoliques naturelles qui regroupent près de 3000 composés issus du métabolisme secondaire et qui partagent le même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (Fig.4). La structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (Merghem, 2009).

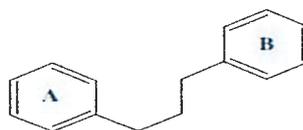


Fig. 4: Structure de base des flavonoïdes (Bruneton, 1993)

La répartition de ces composés est en relation avec la fonction physiologique de la plante et ses interactions avec son environnement. Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau des chloroplastes. Certaines molécules flavonoïdiques telles que les anthocyanes quittent les chloroplastes et s'accumulent dans les vacuoles (Merghem, 2009).

Les flavonoïdes ont été retrouvés dans toutes les familles et presque dans toutes les espèces des plantes supérieures et sont présents donc dans presque tous les fruits, légumes et plantes médicinales. Dans de nombreux cas, ils fonctionnent comme des pigments ou des copigments et donnent aux plantes leurs couleurs caractéristiques (Boik, 2001). Dans les agrumes, ils peuvent représenter jusqu'à 1% de matière fraîche. Les boissons comme le thé et le café contiennent également des quantités considérables de flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des composés actifs dans plusieurs plantes médicinales et les plantes en contenant sont largement utilisées en phytothérapie traditionnelle à travers le monde. (Boik, 2001 ; Manach et al., 2004)).

2.1. Classification

Les flavonoïdes peuvent être classés en six catégories principales dont les flavanones comme la tangerétine et la naringine, retrouvés principalement dans les fruits d'agrumes. Les flavanols également appelés flavan-3-ols qui comprennent les catéchines comme l'épigallocatechine gallate (EGCG), sont retrouvés principalement dans les oignons, les choux frisés, les pommes, les cerises, les baies et le thé et ils sont considérés toute comme les flavanones des flavonoïdes mineurs en raison de leur répartition naturelle limitée. Les flavones quant à eux possèdent une distribution beaucoup plus large, bien qu'il existe peu de flavones primaires tels que la lutéoline et l'apigénine, ceux-ci sont souvent combinés avec des sucres différents pour former des milliers de dérivés hétérosides. La quatrième classe de flavonoïde contient les isoflavones ou isoflavonoïdes, qui se trouvent la plupart du temps dans les légumineuses, comme le soja. La génistéine et daidzéine sont des isoflavones communs. Les flavonols se trouvent sous une variété d'hétérosides et sont produits dans la plupart des familles de plantes, les flavonols primaires comprennent la quercétine et le kaempférol. Les anthocyanidines et les proanthocyanidines sont des pigments rouge-bleu dans les plantes, présents principalement sous leur forme d'hétérosides, ils sont fortement concentrés dans les fruits rouges et bleus comme les baies. Les proanthocyanidines libèrent l'anthocyanidine dans des conditions d'acidité et de température élevées.

2.2. Activités pharmacologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont doués d'une activité pharmacologique importante et variable, ainsi certains flavonoïdes comme la quercétine et l'apigénine possèdent une bonne activité antivirale *in vitro* (Tapas, 2008), la quercétine possède aussi un effet antiallergique par inhibition de la libération de l'histamine. Cependant, l'activité pharmacologique la mieux caractérisée et la plus

importante des composés phénoliques en général et des flavonoïdes en particulier est l'activité anti-radicalaire et antioxydante.

Les flavonoïdes sont des forts donneurs d'électrons et de ce fait ils sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO•). Ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impairs sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R°. Les radicaux flavoxyles peuvent aussi interagir entre eux pour former des composés non réactifs. L'activité antioxydante des flavonoïdes est strictement liée à leur structure, et nécessite la présence de trois groupements principaux ; la structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B est importante pour l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé ; la double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité anti-radicalaire et enfin les groupements hydroxyles libres en C3 et C5 (Amić *et al.*, 2003). Ainsi, plusieurs flavonoïdes, telle que la quercétine, peuvent réduire les dégâts engendrés par le stress oxydatif dans des pathologies comme l'ischémie-reperfusion en agissant sur l'activité de NOS par le piégeage de l'oxyde nitrique qui semble jouer un rôle important dans l'effet thérapeutique des flavonoïdes. D'autres flavonoïdes comme la silibine et lutéoline possèdent un effet inhibiteur sur la xanthine oxydase ce qui réduit les dommages oxydatifs engendrés par la libération du radical superoxyde induite par cet enzyme.

Quelques flavonoïdes tels que les flavonols monomères et les biflavonoides possèdent un effet anti-inflammatoire en inhibant la cyclo-oxygénase et la 5-lipooxygénase impliquées dans le processus inflammatoire et la libération de l'acide arachidonique qui est le point du départ de la réponse inflammatoire générale, la quercétine est l'exemple de cette action. Une autre action anti-inflammatoire des flavonoïdes est l'inhibition de la biosynthèse des eicosanoïdes comme les prostaglandines impliquées dans différentes réponses immunitaires et qui sont les produits finaux des deux voies cités au-dessus. D'autres flavonoïdes sont aussi capables d'inhiber l'inflammation par inhibition de la dégranulation des neutrophiles (Nijveldt & al., 2001).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) en créant des composés complexes inactifs. Ces ions métalliques sont, malgré leurs rôles physiologiques, responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton. (Tiqwari, 2001).

I. Aspect botanique

1. Taxonomie

Connue sous l'appellation de *bounnafâa* ou *dérias/aderias* dans les pays du Maghreb c'est Ibn El-Baytar et Daoud El-Antaki qui ajoutent le terme *tafsia*, du grec *Thapsia* (Dioscorides) (Baba Aissa, 2000). L'espèce *Thapsia garagnica* L. est une plante dicotylédone du genre *Thapsia* de la famille des Apiacées (anciens Umbellifères) ordre des Apiales.

Tableau I : Systématique de la plante *T. garganica* L.

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnolophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>
Genre	<i>Thapsia</i> L.

2. Identification

Thapsia garaganica L. est une plante herbacée vivace, glabre dont la tige est florifère robuste, dressé et élevée, pouvant dépasser 150 cm de hauteur, flexueuse, présentant des ramifications distantes entre elles de couleur verte-grisâtre. La plante fleurit de Juillet à Août, ses fleurs sont à cinq pétales de forme arrondie et de couleur jaunâtre disposées en grandes ombelles. Les feuilles sont inférieures à segments cunéiformes, incisés et dentés. Les fruits sont des akènes.

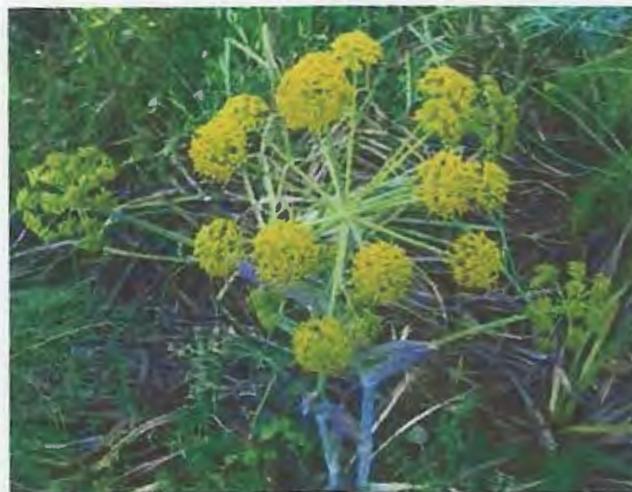


Fig. 5 : La plante *Thapsia garganica* L. dans son milieu naturel

3. Localisation géographique

Le genre *Thapsia* généralement et l'espèce *T. garganica* en particulier sont présents principalement dans les régions ouest du bassin méditerranéen et s'étendent jusqu'aux côtes atlantiques du Portugal et du Maroc, cette zone géographique est caractérisée par un climat méditerranéen semi-aride avec quelques enclaves subhumides (Antonio, 2003). En Algérie *T. garganica* est commune dans les champs et sur les bords des routes, dans toute la région nord du pays (Baba Aissa, 2000).

II. Ethnopharmacologie

L'effet irritant de l'extrait de la racine de *T. garganica* sur la peau a été décrit pour la première fois par Hippocrate 400 ans AJC, et les préparations à partir de ses racines ont été utilisées depuis en médecine traditionnelle (Christensen, 1978). D'après Baba Aissa (2000), cette plante est utilisée en Algérie contre les douleurs rhumatismales et les bronchites, sous forme de préparations aqueuses ou huileuses à application externe exclusive. Néanmoins, Le Floc'h (1983) a regroupé les différentes méthodes de préparation et d'utilisation de cette plante. Ainsi, en usage externe, les extraits de *T. garganica* sont réputés pour être des très bons révulsifs c'est-à-dire ils permettent de retenir le sang sur une partie du corps (le plus souvent, la peau) en provoquant une irritation locale. Cela était un temps utilisé pour faire cesser un état congestif ou inflammatoire, avant la découverte des antibiotiques et des anti-inflammatoires et c'est d'ailleurs l'application majeure de cette plante en thérapie traditionnelle. Plusieurs préparations pour cette application ont été décrites ; parmi ces préparations, les racines sont placées jusqu'à ramollissement dans la cendre chaude, l'écorce est ensuite enlevée et la partie décortiquée est utilisée pour frotter la partie malade. De son côté, l'extrait alcoolique obtenu par macération dans l'alcool de l'écorce des racines de *T. garganica* fournit une résine vésicante utilisée comme révulsive et antirhumatismale (Le Floc'h, 1983).

La plante est aussi utilisée pour le traitement des morsures et des piqûres ; des emplâtres préparés à base de la poudre des feuilles de *T. garganica*, de semoule, de miel et de beurre fondu sont appliqués sur les zones de morsures de serpents ou des piqûres de scorpions (Le Floc'h, 1983).

La toxicité relativement élevée de *Thapsia garganica* limite son utilisation thérapeutique par voie interne. En 1850, Prax a déjà signalé que la plante renferme un poison que Cauvet (1925) dans son traitant de chameau le décrit comme étant corrosif qui brûle l'estomac de l'animal et le tue et situe ce poison dans le suc rouge obtenu de sa partie aérienne. Mais malgré cette toxicité

les Marocains utilisaient une pâte préparée à partir des racines pour prendre du poids, pour cela les racines ont été bouillies dans du beurre ou de l'huile puis mêlées avec du miel et de la farine de l'orge ou du pois chiche, l'équivalent d'une poignée de ce mélange est à consommer sans boire après chaque repas. Doreau a rapporté que des préparations pour usage interne ont été utilisées pour calmer la toux, la bronchite et le rhumatisme (Le Floc'h, 1983).

III. Les activités biologiques de *T. garganica*

Outre la thapsigargine, métabolite majeur, est le plus étudié de la plante *T. garganica* peu de travaux ont été réalisés sur les autres métabolites dont les flavonoïdes et les composés phénoliques. Dans ce contexte, Rached a signalé dans une étude durant laquelle il a évalué la teneur en composés phénoliques et en flavonoïde ainsi que le pouvoir anti-radicalaire de plusieurs plantes médicinales algériennes, la présence d'un effet antioxydant *in vitro* des extraits bruts des racines et des feuilles de *Thapsia garganica* (Rached et al., 2010).

L'activité biologique de *T. garganica* est due principalement à la thapsigargine (TG), un sesquiterpène lactone, qui est un inhibiteur spécifique de la pompe Calcium ATPase du réticulum endoplasmique et sarcoplasmique. Vu le rôle du Ca^{+2} intracellulaire dans le contrôle et la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, la thapsigargine est utilisée comme outil pharmacologique (Xu et al., 2004).

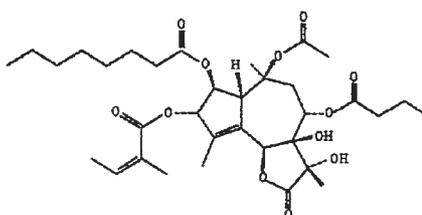


Fig. 6 : Structure chimique de la thapsigargine (Thastrup et al., 1990)

L'interaction de TG avec les isoformes de la pompe SERCA est rapide et essentiellement irréversible (Denmeade et al., 2003) et conduit à une augmentation rapide du taux du Ca^{2+} intracellulaire suite à son libération excessive à partir du réticulum endoplasmique (ER). (Lytton et al., 1991). La thapsigargine est également utilisée comme modèle expérimental de l'apoptose par ce mécanisme basé sur la perturbation des taux du Ca^{2+} libre intracellulaire et par l'épuisement du stock du Ca^{2+} du RE (Denmeade et al. 2003). En outre la thapsigargine est utilisée dans le traitement des cancers en raison de son effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire concernant aussi bien les cellules quiescentes que les cellules en prolifération (Furuya et al. 1994).

Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal et contribution à l'étude phytochimique

L'étude est effectuée sur des échantillons de racines et de la partie aérienne de la plante *T. garganica* L. récoltés dans la région de Jijel et identifiés par M. Sebti M. à l'université de Jijel. La partie aérienne (feuilles et fleurs) ramenée sèche est conservée à l'abri de la chaleur avant son utilisation alors que les échantillons de racines sont nettoyés, découpés en petits morceaux et mis à sécher dans l'étuve à 40°C pendant cinq jours. Devenues sèches, les racines sont broyées en poudre à l'aide d'un moulin à café. Le broyât va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction *Soxhlet*.

1. Préparation de l'extrait brut de *Thapsia garganiga*

1.1. À partir des racines

L'extrait brut de *T. garganica* est obtenu par une extraction *Soxhlet* (Lakshman et al., 2006) à partir de 20 g de poudre dans l'éthanol 70 % en utilisant un appareil *Soxhlet* (Gerhardt, Germany) (Fig. 7) en 3 cycles jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche. La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide d'un Rotavapor (Heidolph) à 40°C. Le résidu sec constituant l'extrait brut éthanolique de *T. garganica* est repris en partie dans l'eau distillée pour servir à des affrontements avec plusieurs solvants afin d'extraire le maximum de produits bioactifs.

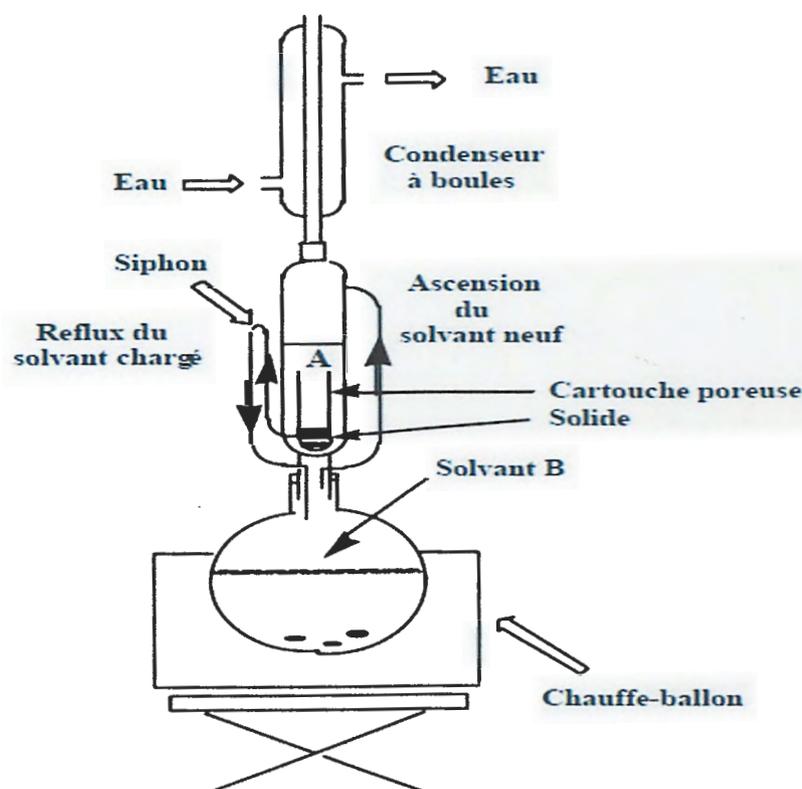


Fig. 7: Schéma de l'extracteur Soxhlet (Lakshman et al., 2006)

1.2. À partir de la partie aérienne

Pour obtenir l'extrait brut de *T. garganica* à partir des feuilles et fleurs, le matériel végétal subit trois macérations successives (24 heures chacune) dans l'éthanol 70 % sous agitation magnétique à température ambiante puis filtration sur papier Whatman.

Le filtrat est évaporé à 40°C grâce à un Rotavapor. Le résidu sec constituant l'extrait brut éthanolique de *T. garganica* est repris en partie dans l'eau distillée pour servir aux affrontements avec plusieurs solvants afin d'extraire les substances bioactives.

2. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques parmi eux les flavonoïdes contenus dans les racines et dans la partie aérienne de *T. garganica* est réalisée selon le protocole décrit par Brunetton (1993).

La méthode est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans différents solvants et effectuée sur la phase aqueuse préalablement filtrée sur papier Whatman. Le filtrat est débarrassé des cires et des graisses par lavage avec l'éther de pétrole (V/V) pour donner une phase aqueuse. Cette dernière subit trois affrontements successifs (voir Fig. 8) :

- Affrontement par l'éther diéthylique : la phase aqueuse est mélangée avec l'éther diéthylique et laissée décanter pendant quinze minutes dans une ampoule à décantation après agitation énergique, deux phases sont obtenus : une phase organique en haut contenant les flavonoïdes aglycones et une phase aqueuse en bas qui subit encore deux affrontements par le même solvant pour extraire le maximum de substances bioactives.
- Affrontement par l'acétate d'éthyle : sur la phase aqueuse restante de l'affrontement précédent, on a répété les mêmes opérations avec l'acétate d'éthyle afin de récupérer dans la phase organique les flavonoïdes monoglycosides.
- Affrontement par le n-butanol ; solvant préférentiel des flavonoïdes di et triglycosides : la phase aqueuse obtenue après affrontement par l'acétate d'éthyle est mélangée avec le n-butanol. Deux phases sont apparues ; une phase organique en haut et une phase aqueuse en bas. Cette dernière subit deux autres affrontements toujours par le n-butanol pour extraire le maximum de flavonoïdes di et triglycosides. La phase aqueuse finale contient les flavonoïdes plus polaires.

Les huit fractions obtenues sont évaporées à sec dans le Rotavapor à 40°C. Les extraits secs sont pesés et récupérés dans l'éthanol pur afin de faire le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et la préparation des différentes dilutions.

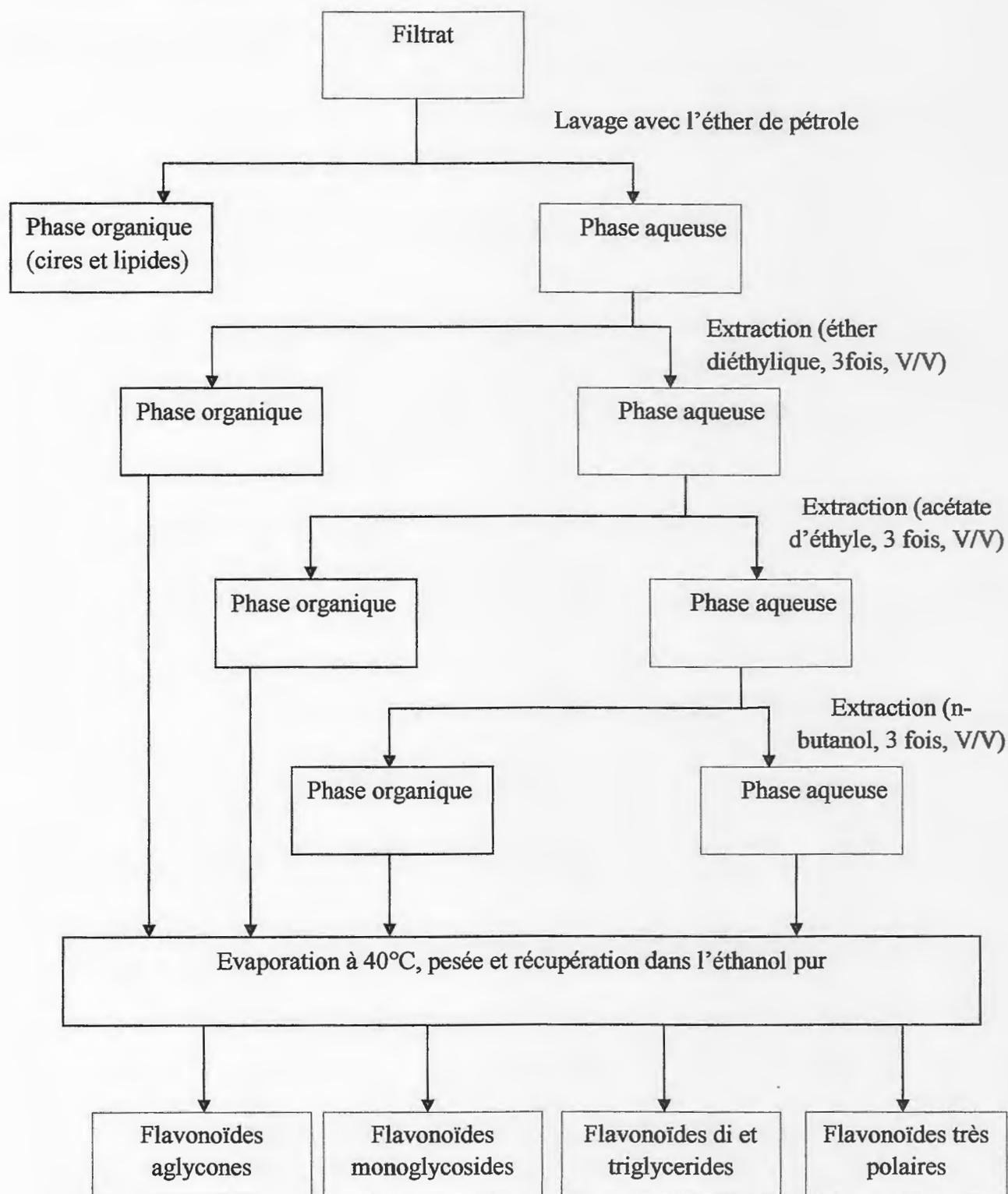


Fig. 8: Schéma de fractionnement des flavonoïdes

3. Dosage des polyphénols totaux

L'évaluation du contenu en composés phénoliques des racines et de la partie aérienne de *T. garganica* est réalisée selon une méthode analytique biochimique qui utilise le réactif de *Folin-Ciocalteu* (Boizot, 2006).

En milieu basique, le réactif de *Folin-Ciocalteu* oxyde les groupements oxydables des composés phénoliques présents dans les extraits. Les produits de réduction de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans les extraits éthanoliques.

On réalise une gamme étalon séparément en milieu alcoolique (éthanol pur) avec l'acide gallique (6 points de concentrations de 6 à 200 µg/ml).

Pour réaliser le dosage, 500 µl de réactif de *Folin-Ciocalteu* (dilué 10 fois dans l'eau distillée) sont ajoutés à 100 µl d'extrait ou de point de gamme et incubés cinq minutes avant l'ajout de 400 µl de Na₂CO₃ (75 g/l). Les mélanges réactionnels sont agités et incubés 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est lue à 735 nm au spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu) et tous les essais se font en duplicata.

La concentration en phénols est calculée par le biais de la gamme étalon et les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche extraite.

4. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes des racines et de la partie aérienne de *T. garganica* est réalisée selon la méthode du trichlorure d'Aluminium (Bahorun et al., 1996).

Pour cela, des solutions mères de concentration de 10 mg/ml de chaque extrait éthanolique sont préparées dans le méthanol 80 %. D'autre part, une gamme étalon (de 1,25 à 40 µg/ml) avec la quercétine est préparée en milieu alcoolique (méthanol 80 %) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait.

Pour réaliser le test, 1 ml d'AlCl₃ à 2 % (2 g d'AlCl₃ dans 100 ml du méthanol absolu) est ajouté à 1 ml de chaque extrait ou de point de gamme et incubé dix minutes à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance est lue à 430 nm à la fin de l'incubation et tous les essais se font en duplicata. Les résultats sont déduits à partir de la courbe d'étalonnage de quercétine et sont exprimés en mg d'équivalent de quercétine par g de matière sèche extraite.

II. Etude de l'activité anti-radicalaire de *T. garganica in vitro*

La méthode du DPPH° est largement utilisée pour tester la capacité des composés d'agir en tant qu'éboueurs des radicaux libres ou donneurs d'hydrogène. Le 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) est un radical libre stable qui lorsqu'il réagit avec un antioxydant il se réduit et il change de couleur du violet vers le jaune (Ancerewicz et al., 1998).

Pour réaliser ce test, la cuve de mesure contient : 1,5 ml de la solution éthanolique du DPPH° (100 µM) et 15 µl de l'extrait à tester aux différentes concentrations préparées dans l'éthanol. La mesure de la densité optique s'effectue chaque 30 secondes pendant cinq minutes à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le même test est effectué sur la vitamine C en utilisant plusieurs concentrations préparées aussi dans l'éthanol pur.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction en prenant le 100% du contrôle (DPPH° seul) selon la relation suivante :

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

Avec

- A_C : Absorbance du contrôle
- A_E : Absorbance de l'essai après 5min.



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

1. Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne de *T. garganica* sur le stress hépatique induit par la doxorubicine

L'étude est réalisée sur des rats Wistar Albinos provenant de l'institut de Pasteur d'Alger (Algérie). Les animaux, pesant environ 168 g, ont l'accès libre à la nourriture et à l'eau. Ils sont élevés dans des cages de trois rats chacune dans une animalerie maintenue à une température ambiante.

1.1. Traitement des animaux

Cette étude a pour but d'évaluer l'activité antioxydante d'un extrait des flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne de *T. garganica* administré par voie intrapéritonéale contre un stress hépatique induit par la doxorubicine administrée aussi par voie intrapéritonéale.

Pour cela, les animaux sont répartis en quatre lots (trois rats par lot) comme suit :

- Lot 1 : rats témoins recevant un véhicule constitué d'une solution hydroalcoolique à 1% d'éthanol chaque 24 heures pendant six jours.
- Lot 2 : rats recevant l'extrait de flavonoïdes monoglycosides à la dose de 10 mg/Kg dilué dans une solution hydroalcoolique à 1% d'éthanol chaque 24 heures pendant six jours.
- Lot 3 : rats recevant le véhicule constitué d'une solution hydroalcoolique à 1% d'éthanol chaque 24 heures pendant six jours. Le sixième jour, la doxorubicine est administrée à une dose de 15 mg/Kg une après l'administration du véhicule.
- Lots 4 : rats recevant l'extrait de flavonoïdes monoglycosides à la dose de 10 mg/Kg dilué dans une solution hydroalcoolique à 1% d'éthanol chaque 24 heures pendant six jours. Le sixième jour, une dose de 15 mg/Kg de doxorubicine est administrée une heure après l'administration de l'extrait.

1.2. Sacrifice des animaux et prélèvement de foie

À la fin des délais d'administration, les animaux sont sacrifiés, le foie est prélevé et fractionné en vue d'extraction d'enzymes (SOD, CAT, GST), dosage des protéines et aussi des substrats (GSH et MDA).

1.3. Evaluation du stress oxydatif dans la cellule hépatique

A. Extraction de la fraction cytosolique

Pour préparer la fraction cytosolique, on a suivi la méthode décrite par Iqbal et al. (2003). Pour cela, 1.5 g de foies sont coupés et homogénéisés avec 3 ml du tampon phosphate KH_2PO_4 (0,1M ; pH = 7,4) contenant du KCl à 1,17% à l'aide du broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15 min à 4°C pour séparer les débris nucléaires et le surnageant récupéré est centrifugé encore une fois à 9600 rpm pendant 30 min à 4°C. C'est le surnageant final ainsi obtenu qui va servir à l'évaluation de l'activité des enzymes antioxydantes.

B. Mesure de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase SOD

La SOD est l'une des enzymes les plus importantes dans la défense contre le stress oxydatif ; elle assure l'élimination de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. L'activité de la SOD est déterminée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971).

➤ Principe

L'évaluation de l'activité de la SOD nécessite un milieu réactionnel qui contient une molécule photosensible (la riboflavine) et une autre capable d'être réduite par l'anion superoxyde (bleu de nitrotétrazolium). L'éclairage intense de ce milieu réactionnel induit l'oxydation de la riboflavine qui cède un électron au dioxygène pour former l'anion superoxyde interagissant avec le NBT (incolore) pour former le formazan (bleu) absorbant à 560 nm. L'activité de la SOD limite la formation de ce bleu de formazan.



➤ Méthode du dosage

Le mélange réactionnel contient : 2 ml du milieu réactionnel (solution NaCN 10^{-2} M, solution NBT $1,76 \times 10^{-4}$ M, solution EDTA 66×10^{-3} M, solution riboflavine 2×10^{-6} M et une solution de la méthionine 10^{-2} M comme donneur d'électron) et 5 μ l de la fraction cytosolique. Ce mélange est irradié avec une lampe de 15 Watt pendant 10 min. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 560 nm et l'activité de la SOD est évaluée en % d'inhibition par rapport à un contrôle dépourvu de SOD.

➤ Calcul

L'activité de la SOD est donnée en unité.mg⁻¹ de protéines, une unité correspondant à la capacité d'inhiber 50 % de la réduction du NBT (et donc la formation du formazan).

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_C - A_E / A_C) \times 100$$

$$\text{SOD U/mg} = \% \text{ d'inhibition} \times 6,35$$

C. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase

La catalase réagit efficacement avec H_2O_2 pour donner de l'eau et de l'oxygène. L'activité de la catalase cytosolique est déterminée selon la méthode de Clairbone (1985).

➤ Principe

Le principe repose sur la mesure de la disparition de l' H_2O_2 à 25°C en présence de la source enzymatique dans la fraction cytosolique.

➤ Méthode du dosage

On mesure la baisse de l'absorbance à 240 nm sur un volume de 1,975 ml contenant 1 ml du tampon phosphate (0,1 M ; pH = 7,2), 0,950 ml H_2O_2 (0,019 M) et 0,025 ml de la fraction cytosolique chaque 30 secondes pendant une minute. Le blanc est préparé dans les mêmes conditions sans source enzymatique.

➤ Calcul

L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéines

$$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg de protéines} = [(\text{pente} \times \epsilon) \times 1000 \times V_r] / (C \times V_s)$$

Sachant que :

- Pente : $d\text{Absb}_{240}/\text{min}$: différence d'absorbance par minute
- ϵ : coefficient d'extinction de H_2O_2 ($36\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
- V_r : volume de la réaction (ml)
- C : concentration en protéines de l'échantillon (mg/ml)
- V_s : volume de la fraction ajoutée (ml)

Ou :

La cinétique de la catalase n'obéissant pas au modèle Michaelien, nous n'utilisons pas la loi de Beer-Lamber. En effet, la constante de vitesse est définie telle que :

$$K = 2,3/\Delta t \times \log \text{DOzéro} / \text{DOt}$$

Les résultats sont exprimés en unité (U ou K)/ mg de protéines totales

D. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase cytosolique GST

La GST est une enzyme multifonctionnelle, elle catalyse la conjugaison du glutathion à de nombreux substrats. L'activité enzymatique de la GST hépatique est estimée par une méthode photométrique selon Habig et al. (1974).

➤ Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la formation d'un complexe entre le glutathion et un substrat artificiel de la GST, le 1-chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB), qui peut être visualisée par l'augmentation de la densité optique à 340 nm et à 25°C.

➤ Méthode du dosage

Pour cela, 100 µl de CDNB 20 mM sont additionnés à 1,7 ml du tampon phosphate KH_2PO_4 (0,1 M ; pH = 6,5) et incubés à 37°C pendant 10 min. après incubation, on a ajouté 100 µl du glutathion 20 mM. Enfin, 100 µl du cytosol dilué au 1/100^{ème} sont ajoutés à la cuve de mesure au temps zéro. L'absorbance est suivie pendant 5 min avec une minute d'intervalle contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le tampon.

➤ Calcul

L'activité enzymatique de la GST est exprimée en nmoles du complexe formé/min/mg de protéines.

Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzymes catalysant la formation de 1 µmole de complexe par minute. [Constante d'extinction molaire du complexe formé $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

L'activité spécifique est définie comme étant l'unité d'activité enzymatique par mg de protéines mesurées par la méthode de Bradford.

$$\text{GST activité } (\mu\text{moles/min}) = \frac{\Delta \text{ absb } 340 / \text{min test} \times V_t}{V_{ez}} \times \frac{1}{9,6} \times \frac{1}{F} \quad \text{Sachant que :}$$

- $\Delta \text{ absb } 340 / \text{min test}$: différence de l'absorbance
- V_t : volume total de cuvette par ml
- V_{ez} : volume de fraction cytosolique ajouté par ml
- F : facteur de dilution

E. Dosage du glutathion hépatique

Le glutathion est un tripeptide. Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau cellulaire où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la plus utilisée (Ellman, 1959).

➤ Principe

La réaction consiste à couper la molécule de DTNB par le GSH ce qui libère l'acide thionitro-benzoïque (TNB). Ce dernier présente, à pH 8-9 alcalin, une absorbance à 412 nm.

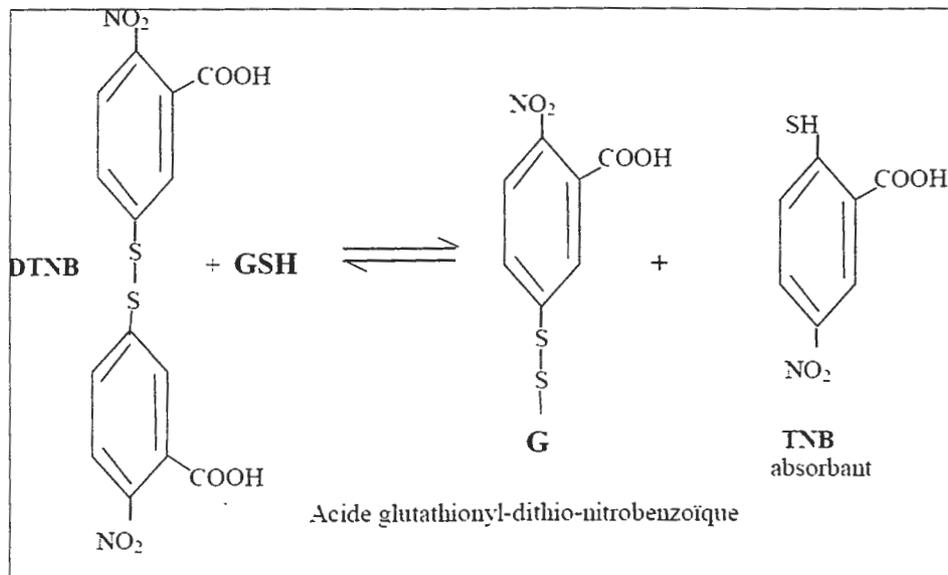


Fig. 9 : Réaction d'Ellman

➤ Méthode du dosage

Un gramme de foie congelé est homogénéisé dans trois volumes de TCA 5% (précipitation des protéines) dans un homogénéiseur de DOUNCE. L'homogénat est centrifugé à 2000 rpm pendant 15 min. puis 50 µl de surnageant sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate Na₂HPO₄ (0,1 M ; pH = 8). A 3 ml de ce mélange, 20 µl de DTNB 0,01 M sont additionnés ; une couleur jaune se développe 15 min après incubation. La lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé avec le TCA 20%.

➤ Calcul

Les concentrations du GSH sont déterminées à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions et sont exprimées en mmoles de glutathion /g de foie.

F. Dosage du Malondialdéhyde cytosolique MDA

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

➤ Principe

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

➤ Méthode du dosage

Un gramme de foie congelé est coupé et homogénéisé avec trois volumes du KCl 1,15 M à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. Puis 0,5 ml du TCA 20% et 1 ml du TBA 0,67% sont ajoutés à 0,5 ml de l'homogénat et chauffés à 100°C pendant 15 min. Le mélange est refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol et centrifugé à 3000 rpm pendant 15 min. La densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm.

➤ Calcul

La conversion de l'absorbance, mesurée à 530 nm, en équivalents de malonaldéhyde (mg/kg d'échantillon) est obtenue en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du complexe MDA TBA : $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Buedge et coll., 1978).

Le mode de calcul est le suivant :

$$\text{mg équivalent MDA/Kg} = (A_{530} \times V_{\text{KCl}} \times 2 \times M \times 10^{-2}) / (1,56 \times m)$$

Avec

- V_{KCl} : volume du solvant d'extraction (3 ml)
- m : masse de l'échantillon analysée (g)
- M : masse moléculaire du malonaldéhyde = $72 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

G. Dosage des protéines totales

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

➤ Méthode du dosage

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

➤ Calcul

Les résultats sont déterminés à partir d'une droite d'étalonnage de protéines standards obtenue avec l'albumine sérique bovine (BSA) [0,06- 1 mg/ml] et sont exprimés en mg/ml.

2. Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut de *T. garganica*

Cette étude a pour but d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut obtenu à partir des racines de *T. garganica* sur l'œdème inflammatoire aigu de la patte de rat induit par la carragénine (Winter et al. , 1962) et de comparer cette activité à celle d'un anti-inflammatoire de référence ; le Diclofenac (Nsonde et al. , 2010).

Les expériences ont été réalisées chez des rats Wistar Albinos provenant de l'institut Pasteur d'Alger (Algérie), de poids compris entre 80 et 150g.

2.1. Traitement des animaux

Les animaux ont été répartis au hasard en trois lots homogènes (n = 5) et mis à jeun 12 heures avant l'expérimentation. Avant l'induction de l'œdème, on mesure pour chaque rat la taille initiale (en millimètre) de la patte arrière droite à l'aide d'un pied à coulisse.

Ensuite, les trois lots ont reçu par voie intrapéritoniale les différents traitements :

- Lot 1 : les rats témoins reçoivent 200µl d'eau physiologique une heure avant l'injection de la **solution** de carragénine.
- Lot 2 : rats recevant 200µl du Diclofénac injectable à une dose de 5mg/kg une heure avant l'induction de l'œdème.

- Lot 3 : rats recevant 200µl de l'extrait brut de *T. garganica* à une dose de 5mg/kg toujours une heure avant l'injection de la carragénine.

Une heure après traitement, tous les rats reçoivent 100µl de la solution de carragénine 1% (dans l'eau physiologique) sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite. L'évolution de l'œdème est déterminée à 1h, 2h, 3h et 4h.

2.2.Calcul

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire, on a mesuré le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème des pattes traitées par rapport au lot témoin en utilisant la formule suivante (Sy et al. , 2008).

$$\% \text{ INH} = \frac{\% \text{ AUG témoin} - \% \text{ AUG traité}}{\% \text{ AUG témoin}}$$

Le pourcentage d'augmentation de la taille de la patte (% AUG) enflammée est calculé comme suit :

$$\% \text{ AUG} = \frac{\text{taille de la patte au temps } t - \text{taille initiale}}{\text{taille initiale}}$$

3. Evaluation statistique

Les résultats des différentes évaluations effectuées *in vivo* sont donnés sous forme de moyenne ± écart type. Ils ont été traités à l'aide du logiciel Excel 2010 et sont évalués par un test t de *Student* (seuil de signification de 5%).

Résultats et Discussion

I. Etude phytochimique

L'étude phytochimique de la plante *T. garganica* a été rapportée sur d'abord, la préparation des extraits bruts à partir des racines et de la partie aérienne, puis sur l'extraction des flavonoïdes basée sur leurs degrés de solubilité dans différents solvants, suivi par des dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

1. Extraction des composés phénoliques

Le rendement de l'extraction *Soxhlet* (extrait brut des racines) est de 25,85 %. L'extraction des flavonoïdes des racines de *T. garganica* par la méthode des affrontements montre des taux de rendement différents d'une fraction à une autre ; le meilleur rendement est observé dans l'extrait aqueux avec 30,37 %, suivi de la fraction acétate d'éthyle qui représente les flavonoïdes monoglycosides avec un rendement de 12,41%, les fractions n-Butanol et éther diéthylique quant à eux montrent un rendement beaucoup plus faible de l'ordre de 3,99 % et 2,21 % respectivement (tableau II).

L'extraction par macération de la partie aérienne de *T. garganica* montre un rendement de 19,25 %. La séparation des flavonoïdes de cette partie montre que l'extrait aqueux a le rendement le plus élevé avec 26,44 %, suivi de la fraction n-butanol avec 7,55 % puis les fractions éther diéthylique et acétate d'éthyle avec des rendements beaucoup moins élevés de l'ordre de 2,42 % et 1,66 % respectivement (tableau II).

Tableau II : Rendement d'extraction des composés phénoliques à partir des racines et de la partie aérienne de *T. garganica*

Extrait	Rendement %	Rendement %
Brut	25,85	19,25
Ether diéthylique	2,21	2,42
Acétate d'éthyle	12,41	1,66
n - butanol	3,99	7,55
Eau	30,37	26,44

Le rendement obtenu dans l'extraction *Soxhlet* prouve l'efficacité de cette méthode dont le principe est simple et facile à mettre en œuvre et qui permet de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première d'où vient son efficacité élevée. La macération dans l'alcool utilisée pour la partie aérienne a aussi donné un bon rendement (19,25 %).

La séparation des flavonoïdes contenus dans les extraits bruts dont le but de mieux caractériser la composition en molécules bioactives de ces extraits montre une variation d'une fraction à une autre. Ainsi le meilleur rendement est obtenu avec l'extrait aqueux des racines (30,37 %) et de la partie aérienne (26,44 %) supposés être riches en flavonoïdes très hydrosolubles. Le rendement des autres fractions est moins important.

2. Dosage des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux des racines de *T. garganica* par la méthode utilisant le réactif de *Folin-Ciocalteu* et l'acide gallique comme référence montre une bonne reproductivité, l'absorbance est étroitement corrélée avec la concentration de l'acide gallique avec un coefficient de corrélation de la gamme étalon $r = 0,99$. Les résultats du dosage montrent que la fraction éther diéthylique et la fraction n-butanol contiennent le taux le plus élevé en polyphénols avec des concentrations de 146,52 et 127,41 mg d'équivalent d'acide gallique /g de matière sèche extraite respectivement, suivies de l'extrait brut éthanolique puis la fraction acétate d'éthyle (57,41 et 38,93 mg équivalent d'acide gallique/g de matière sèche extraite respectivement). La fraction aqueuse possède la concentration la plus faible qui est de l'ordre de 13,20 mg équivalent d'acide gallique /g de matière sèche extraite (tableau III).

Le dosage des flavonoïdes contenus dans les racines de *T. garganica* par la méthode utilisant l' AlCl_3 comme réactif et la quercétine comme standard montre une bonne corrélation entre l'absorbance et les concentrations de la quercétine de la gamme, $r = 0,99$. La fraction n-butanol censée contenir les flavonoïdes di et triglycoside présente la meilleure teneur en flavonoïdes avec une concentration de 0,58 mg d'équivalent de quercétine /g de matière sèche extraite, suivie de l'extrait éthanolique brut avec 0,50 mg équivalent de quercétine/g de matière sèche extraite. Cette teneur est de l'ordre de 0,46 mg équivalent de quercétine/g de matière sèche extraite. Les fractions éther diéthylique et acétate d'éthyle possède la même quantité de flavonoïdes avec 0,37 mg équivalent de quercétine/g de matière sèche extraite (tableau III).

Les dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes de la partie aérienne de *T. garganica* réalisés par les mêmes méthodes qu'avec les racines et en utilisant les mêmes courbes d'étalonnage montrent que la fraction acétate d'éthyle contient la meilleure teneur en polyphénols avec une concentration de 439,89 mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière sèche, suivie de l'extrait brut avec 125,77 mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière sèche extraite et la fraction éther diéthylique avec 119,87 mg d'équivalent d'acide gallique / de matière sèche extraite. La fraction n-butanol présente aussi un bon taux avec 111,69 mg

d'équivalent d'acide gallique/g de matière sèche extraite enfin l'extrait aqueux avec peu de polyphénols (31,25mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière sèche extraite (tableau III).

Tableau III : Evaluation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes des racines et de la partie aérienne de *T. garganica*

Extrait	Racines		Partie aérienne	
	Polyphénols (mg équivalent d'acide gallique/g de matière sèche extraite)	Flavonoïdes (mg équivalent de quercétine/g de matière sèche extraite)	Polyphénols (mg équivalent d'acide gallique/g de matière sèche extraite)	Flavonoïdes (mg équivalent de quercétine/g de matière sèche extraite)
Brut	57,41	0,5	125,77	0,77
Ether diéthylique	146,52	0,37	119,87	0,42
Acétate d'éthyle	38,93	0,37	439,89	2,40
Butanol	127,41	0,58	111,69	0,78
Eau	13,20	0,46	31,25	0,49

La teneur en flavonoïdes de la partie aérienne est la plus élevée dans la fraction acétate d'éthyle avec 2,40 mg d'équivalent de quercétine /g de matière sèche extraite, suivie par la fraction n-butanol et l'extrait brut mais avec des concentrations beaucoup plus faible de l'ordre de 0,78 et 0,77 mg d'équivalent quercétine/g de matière sèche extraite respectivement puis enfin la fraction aqueuse et la fraction éther diéthylique avec des concentrations de 0,49 et 0,42 mg d'équivalent quercétine/g de matière sèche extraite respectivement (tableau III).

Comparés aux résultats de la bibliographie concernant la plante *Thapsia garganica*, la teneur des extraits brut en composés phénoliques et en flavonoïdes est différente où la teneur en composés phénoliques a été plus importante dans les racines par rapport aux feuilles. En revanche, la teneur en flavonoïdes dans les feuilles était meilleur que dans les racines ce qui est en parfaite corrélation avec nos résultats (Rached et al., 2010). Cette différence est due principalement à la méthode d'extraction et aux solvants utilisés mais aussi à la différence de la partie utilisée dans l'étude puisque notre partie aérienne contient les feuilles et les fleurs alors que dans la bibliographie seules les feuilles ont été utilisées. L'origine géographique de la plante peut aussi influencer le contenu en flavonoïdes et composées phénoliques ; puisque la plante

utilisée dans cette étude est récoltée dans la région de Jijel alors que celle rapportée dans la littérature a été obtenue de la région de l'ouest algérien.

Le dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes dans les fractions issues de l'affrontement est l'un des apports de notre travail. Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que la quantité des polyphénols dans la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne (43%) et dans la fraction éther diéthylique des racines (14%) est importante en comparaison avec les autres extraits, les fractions aqueuses en sont pauvres (3% et 1%). Par contre la quantification des flavonoïdes n'a pas révélé une grande teneur en flavonoïdes. En effet, la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne supposée contenir les flavonoïdes monoglycosides présente le meilleur taux de flavonoïdes qui est de l'ordre de 2,40 mg équivalent quercétine/g de matière sèche extraite.

II. Evaluation de l'activité anti-radicalaire de *T. garganica in vitro*

Pour évaluer le pouvoir antioxydant de *T. garganica*, nous avons mesuré la capacité de ces extraits à piéger les radicaux libres *in vitro* en utilisant la méthode au DPPH° où le pourcentage de réduction de ce radical libre stable par les différents extraits de la plante a été déterminé.

Dans les figures 10, 11,12 nous avons représenté les résultats exprimés en pourcentage de réduction du DPPH° par la vitamine C, notre antioxydant de référence, et par trois extraits de la plante à différentes concentrations ; l'extrait brut des racines, l'extrait brut de la partie aérienne et l'extrait des flavonoïdes monoglycosides de la plante (ou fraction acétate d'éthyle). Les résultats des sept autres extraits issus des affrontements sont en annexe (Annexe).

En analysant les résultats obtenus avec l'extrait des flavonoïdes monoglycosides (fig. 10), nous constatons que la vitamine C présente comme attendu la meilleure réduction du DPPH° avec un taux de réduction de 90,95 % à une concentration de 3,12 mg/ml seulement, pour la même concentration l'extrait des flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne (fraction acétate d'éthyle) possède un effet anti-radicalaire important avec un pourcentage de réduction de 59,66 % qui dépasse le pourcentage de réduction de l'extrait brut des feuilles à la concentration de 25 mg/ml (34,10 %) et de l'extrait brut des racines à la concentration de 100 mg/ml (51,12 %). Cependant, la meilleure réduction mesurée est celle de l'extrait brut de la partie aérienne à la concentration de 100 mg/ml qui est de 77,04 % qui dépasse légèrement celle de l'extrait des flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne à 50 mg/ml et qui réduit le DPPH° de 76,38 %.

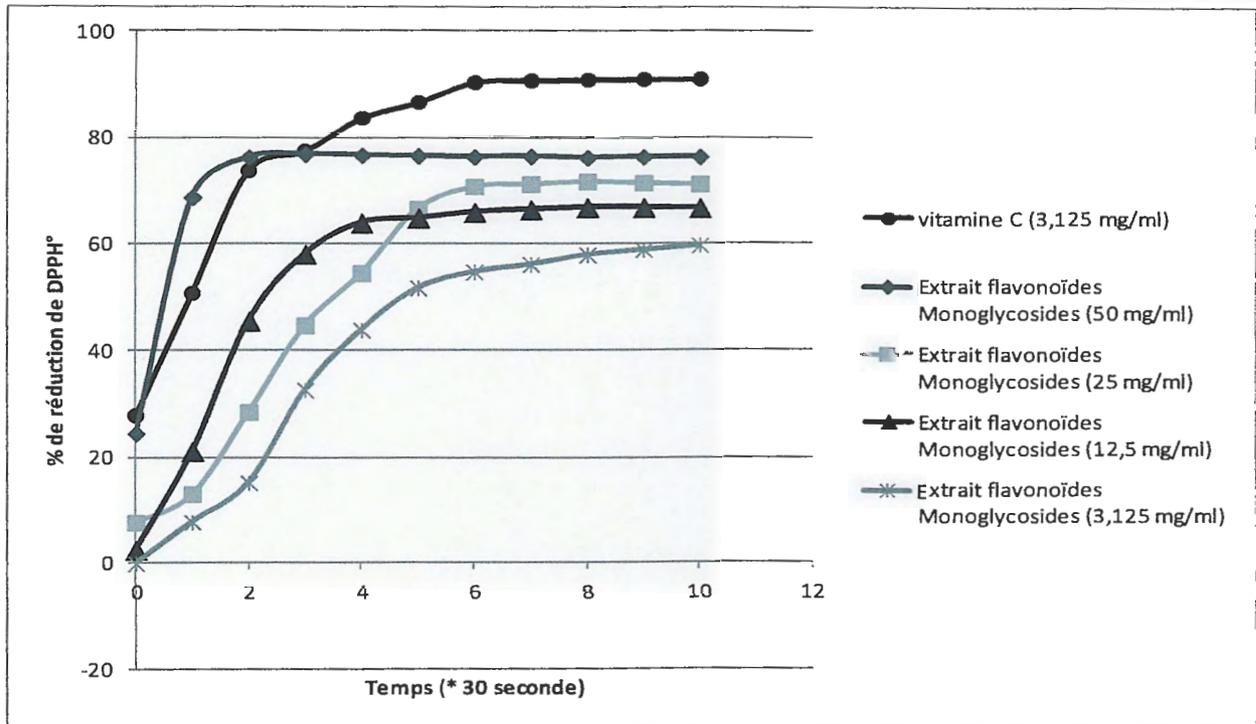


Fig. 10 : Effet scavenger *in vitro* de l'extrait des flavonoïdes monoglycosides de *T. garganica* à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.

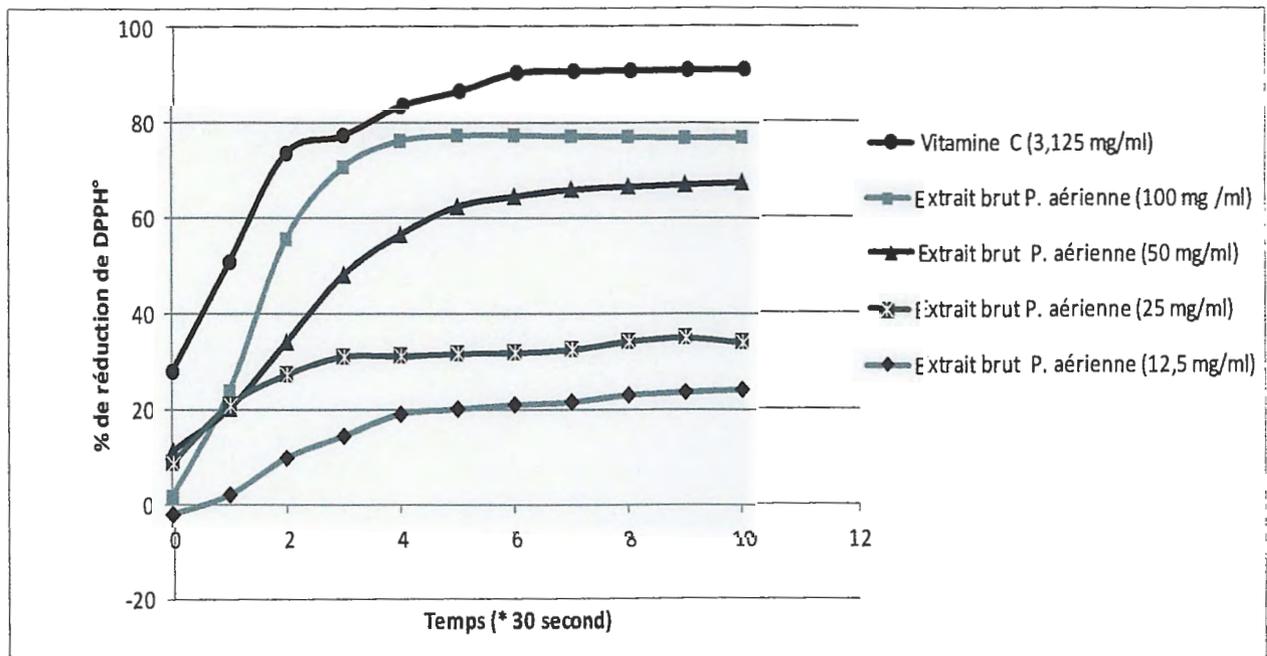


Fig. 11: Effet scavenger *in vitro* de l'extrait brut de la partie aérienne de *T. garganica* à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.

Comparant ces résultats, on peut bien constater que l'extrait des flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne de *T. garganica* possède le meilleur pouvoir anti-radicalaire par rapport aux autres extraits de la plante suivi par l'extrait brut de la partie aérienne alors que l'extrait brut des

racines ne présente pas une activité importante. Nous constatons également que cet effet scavenger des différents extraits de la plante est fortement lié à la concentration et il augmente en fonction de la concentration jusqu'à un seuil maximal où il se stabilise.

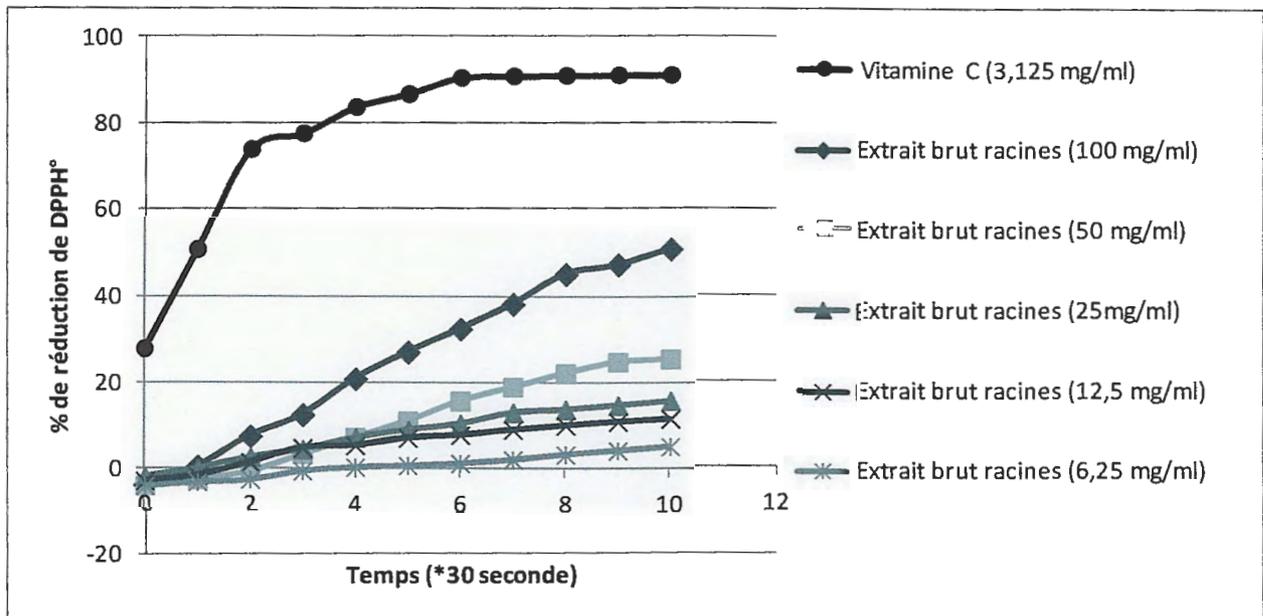


Fig. 12 : Effet scavenger *in vitro* de l'extrait brut des racines de *T. garganica* à différentes concentrations sur le radical DPPH° par rapport à la vitamine C.

Les résultats de la détermination du pouvoir anti-radicalaire de toutes les fractions obtenues par la méthode au DPPH° révèlent que la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne possède un pouvoir réducteur important comparé aux autres fractions. Cet effet éboueur des radicaux libres était donc concentration dépendant ; à une concentration de 50 mg/ml, cet extrait réduit le DPPH° de 76%, ce qui nous laisse penser que cette action anti-radicalaire importante par rapport aux autres extraits étant en corrélation avec la teneur en polyphénols et en flavonoïdes.

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

1. Effets des flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne de *T. garganica* sur le stress hépatique induit par la doxorubicine

Les résultats sont donnés en moyenne \pm Ecart type. Test de *Student* :

- * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: groupes comparés au groupe témoin ;
- # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0,001$: groupe comparés au groupe recevant la doxorubicine seule.

1.1 Activité de la superoxyde dismutase et de la catalase hépatiques

Les résultats de l'effet des flavonoïdes monoglycosides sur l'activité enzymatique de la SOD sont représentés dans le tableau IV et la figure 13.

Tableau IV :Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides

	Traitement des animaux			
	Témoin	Extrait de flavonoïdes seul	Doxorubicine seule	Extrait de flavonoïdes + doxorubicine
Protéines mg/ml	5,81 ± 0,054	5,75 ± 0,005	5,79 ± 0,060	5,59 ± 0,36
Activité de SOD U/mg de protéines	83,97 ± 5,49	84,32 ± 13,80	68,91 ± 7,32	80,36 ± 16,06

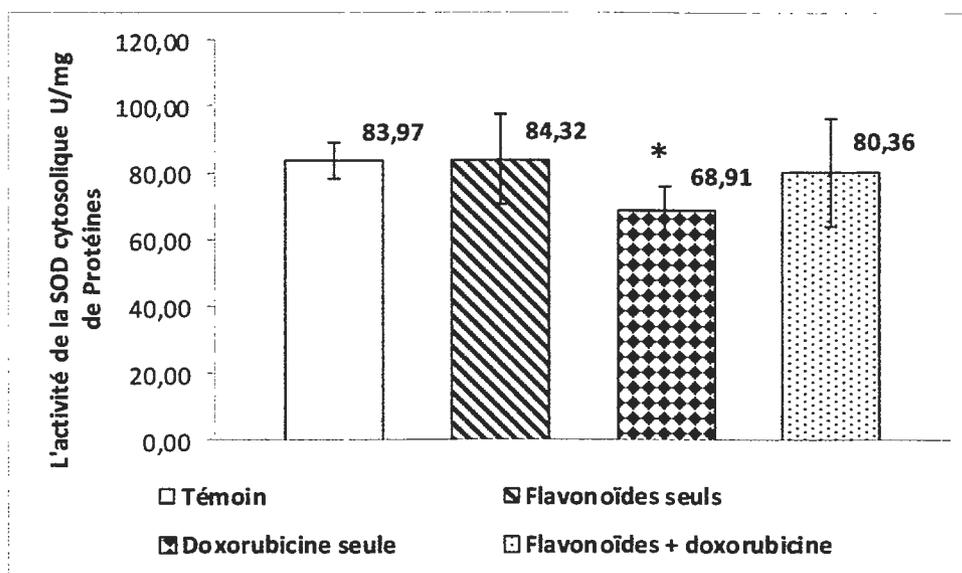


Fig. 13 :Effet des flavonoïdes sur l'activité de la SOD dans le foie.

L'activité de la SOD cytosolique hépatique a diminué d'une façon significative ($p < 0,05$) chez les rats recevant la doxorubicine seule ($68,91 \pm 7,32$ U/mg de protéines) par rapport à celle mesurée chez les rats témoins ($83,97 \pm 5,49$ U/mg de protéines).

Par ailleurs, cette activité est conservée à son niveau normal chez les rats recevant l'extrait de flavonoïdes seul et ceux recevant la doxorubicine en association avec l'extrait de flavonoïdes. Leurs valeurs respectives $84,32 \pm 13,80$ U/mg de protéines et $80,36 \pm 16,06$ U/mg de protéines par rapport à celle obtenue avec le groupe témoin ne montrent aucune signification.

Les résultats de l'effet des flavonoïdes monoglycosides sur l'activité enzymatique de la CAT sont rapportés dans le tableau V et la figure 14.

Tableau V: Variation de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique hépatique chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides

	Traitement des animaux			
	Témoin	Extrait de flavonoïdes seul	Doxorubicine seule	Extrait de flavonoïdes + doxorubicine
Protéines mg/ml	5,81 ± 0,054	5,75 ± 0,005	5,79 ± 0,060	5,59 ± 0,36
Activité de CAT moles H ₂ O ₂ /min/mg de Prot.	1,419 ± 0,175	1,373 ± 0,262	1,721 ± 0,340	1,493 ± 0,430

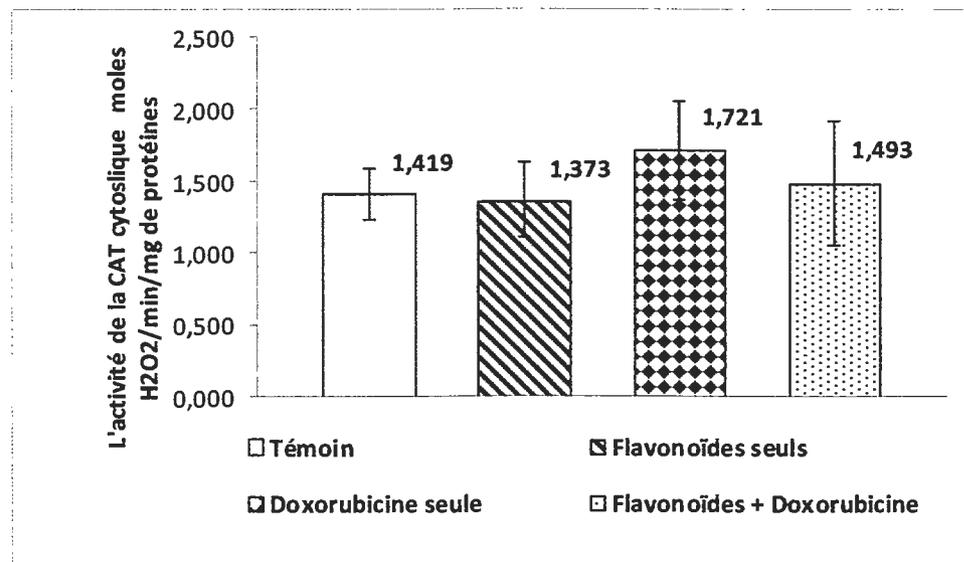


Fig. 14 :Effet des flavonoïdes sur l'activité de la CAT dans le foie

L'administration de la doxorubicine seule a provoqué une légère augmentation de l'activité cytosolique hépatique de la catalase (1,721 ± 0,340 moles H₂O₂/min/mg de protéines) par rapport à celle mesurée chez les rats témoins (1,419 ± 0,175 moles H₂O₂/min/mg de protéines).

En outre, l'activité enzymatique de la CAT est considérée stable chez les rats recevant l'extrait de flavonoïdes seul ou en association avec la doxorubicine (1,373 ± 0,262 et 1,493 ± 0,430 moles H₂O₂/min/mg de protéines respectivement) en comparaison avec le groupe témoin.

Les ROS, sont analysés indirectement par l'évaluation des enzymes antioxydantes. La SOD, par une réaction de dismutation, transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui sera capté par la catalase. En fait, une réduction significative ($p < 0.05$) de l'activité de la SOD

cytosolique est observée chez les rats recevant la doxorubicine. Ce résultat peut expliquer une production intensive de l'anion superoxyde que la SOD n'a pas pu dismuter complètement et donc le transformer en H₂O₂, ce qui explique l'augmentation de l'activité de la catalase qui arrive à éliminer les quantités minimales du peroxyde d'hydrogène généré. Par contre le prétraitement des animaux par l'extrait de flavonoïdes atténue complètement ces effets puisque les activités enzymatiques de la SOD et de la CAT reviennent à la normale.

Les résultats obtenus confirment, d'une part, le mécanisme de toxicité de la doxorubicine basé principalement sur la production accrue de l'anion superoxyde au cours du cycle redox entre la forme quinone et semi-quinone de la doxorubicine (Jungsuwadee et al., 2012), et d'autre part, expliquent la propriété antioxydante des flavonoïdes démontrée dans plusieurs travaux.

1.2. Activité de la glutathion-S- transférase hépatique et variation des concentrations hépatiques en glutathion

Les résultats de l'effet des flavonoïdes monoglycosides sur l'activité enzymatique de la GST sont représentés dans le tableau VI et la figure 15.

Tableau VI : Variation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides

	Traitement des animaux			
	Témoin	Extrait de flavonoïdes seul	Doxorubicine seule	Extrait de flavonoïdes + doxorubicine
Protéines mg/ml	5,81 ± 0,054	5,75 ± 0,005	5,79 ± 0,060	5,59 ± 0,36
Activité GST µmole/min/mg de Prot.	0,730 ± 0,131	0,868 ± 0,290	1,389 ± 0,117	1,575 ± 0,156

L'activité enzymatique de la GST hépatique montre une augmentation significative ($p < 0,05$) chez les rats recevant la doxorubicine seule et en association avec l'extrait des flavonoïdes monoglycosides ($1,389 \pm 0,117$ et $1,575 \pm 0,156$ µmole/min/mg de protéines respectivement) par rapport aux rats du lot témoin ($0,730 \pm 0,131$ µmole/min/mg de protéines).

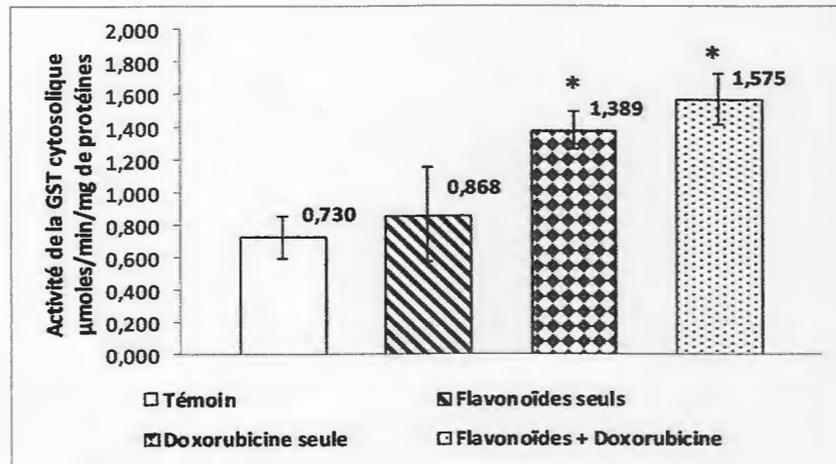


Fig. 15 : Effet des flavonoïdes sur l'activité de la GST dans le foie

Par contre la variation de l'activité chez les rats recevant l'extrait de flavonoïdes seul ($0,868 \pm 0,290$ μmole/min/mg de protéines) est non significative en comparaison avec le groupe témoin.

Les résultats de l'effet des flavonoïdes monoglycosides sur la variation des concentrations hépatique en GSH sont présentés dans le tableau VII et la fig.16.

Tableau VII :Variation des concentrations hépatique en glutathion chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides.

	Traitement des animaux			
	Témoin	Extrait de flavonoïdes seul	Doxorubicine seule	Extrait de flavonoïdes + doxorubicine
[GSH] mMole/g	$0,776 \pm 0,023$	$0,907 \pm 0,253$	$0,741 \pm 0,127$	$1,215 \pm 0,257$

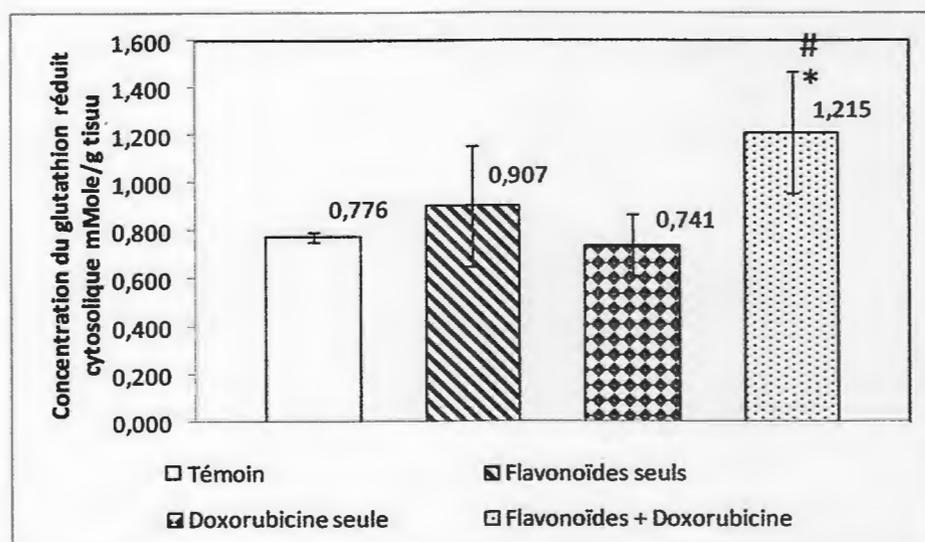


Fig. 16 :Effet des flavonoïdes sur le niveau cytosolique de GSH dans le foie

La concentration hépatique en GSH a diminué chez les rats recevant la doxorubicine seule ($0,741 \pm 0,127$ mMole/g de tissu) par rapport aux rats témoins ($0,776 \pm 0,023$ mMole/g de tissu). Cette diminution n'est pas significative.

Par contre, cette concentration augmente d'une façon significative ($p < 0,05$) chez les rats recevant la doxorubicine en association avec l'extrait de flavonoïdes monoglycosides ($1,215 \pm 0,257$ mMole/g de tissu) en comparaison avec celle mesurée chez les rats témoins. Cette valeur montre aussi une augmentation significative ($p < 0,05$) par rapport aux rats traités par la doxorubicine.

Une légère augmentation est aussi observée dans la concentration du GSH chez les rats recevant l'extrait de flavonoïdes seuls ($0,907 \pm 0,253$ mMole/g de tissu) comparée toujours aux rats témoins.

Etant donné que le glutathion est le principal antioxydant propre de la cellule, une mesure du taux de sa forme réduite GSH peut renseigner sur le statut antioxydant. Les résultats ont révélé une diminution du GSH hépatique chez les animaux traités par la doxorubicine accompagnée d'une augmentation significative de l'activité de la GST. Cela témoigne la production des ROS par la doxorubicine et l'intervention de la GST, enzyme de détoxification, pour les éliminer en consommant le glutathion (Zima et al., 2001).

En revanche, nous avons enregistré une augmentation significative du taux du glutathion chez les rats recevant le traitement combiné de l'extrait de flavonoïdes et la DOX par rapport à ceux traités par la DOX seule et aussi par rapport aux animaux témoins. De même, l'activité de la GST a augmenté d'une façon significative ($p < 0,05$) par rapport aux témoins. Nos résultats confirment le rôle antioxydant des flavonoïdes qui sont capables de piéger les radicaux libres (Nijveldt et al., 2001). Les flavonoïdes semblent agir par activation du *turn-over* du glutathion et des enzymes particulièrement les glutathion-s-transférases permettant l'élimination des métabolites réactifs de la doxorubicine (Lahouel et al., 2004).

1.3. Variations des concentrations en malonyldialdéhyde (MDA)

L'évaluation des lésions dues au stress oxydatif au niveau des lipides est réalisée en mesurant le taux d'un des produits terminaux de leur oxydation par les radicaux libres ; le MDA. Le tableau VIII et la figure 17 illustrent l'effet des flavonoïdes monoglycosides sur la variation du MDA cytosolique dans les cellules hépatiques.

Tableau VIII : Variation du taux du MDA cytosolique chez des rats recevant la doxorubicine seule ou en association avec un extrait de flavonoïdes monoglycosides.

	Traitement des animaux			
	Témoin	Extrait de flavonoïdes	DOX. seule	Extrait de flavonoïdes + DOX
Concentration mg équivalent MDA/tissu	1,133 ± 0,252	1,252 ± 0,244	2,001 ± 0,417	1,457 ± 0,022

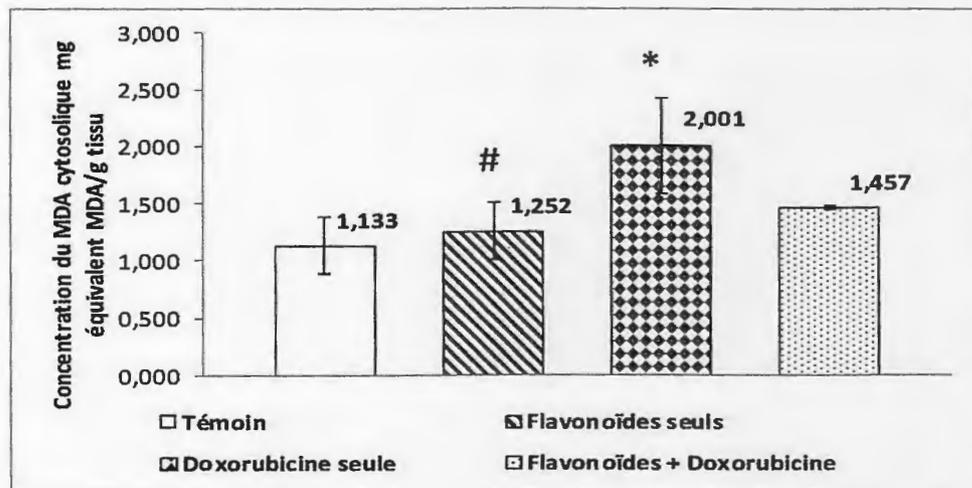


Fig. 17 : Effet des flavonoïdes sur la production du MDA dans les cellules hépatiques

Les rats recevant la doxorubicine montrent une augmentation significative ($p < 0,05$) en MDA cytosolique ($2,001 \pm 0,417$ mg équivalent MDA/ g de tissu) par rapport aux rats témoins ($1,133 \pm 0,252$ mg équivalent MDA/ g de tissu). Par contre, cette augmentation est non significative chez les rats recevant la doxorubicine en association avec l'extrait de flavonoïdes ($1,457 \pm 0,022$ mg équivalent MDA/ g de tissu) par rapport au lot témoin. La concentration du MDA est conservée chez les rats recevant l'extrait de flavonoïdes seuls ($1,252 \pm 0,244$ mg équivalent MDA/ g de tissu) par rapport toujours aux rats témoins.

Les résultats de notre étude consacrée à l'effet préventif des flavonoïdes contre le stress oxydatif induit par la doxorubicine sont similaires à ceux de la littérature. En effet, l'augmentation significative des taux de MDA chez le groupe recevant la doxorubicine seule traduisant une augmentation de la peroxydation lipidique et par conséquent des dommages tissulaires par la formation excessive des radicaux libres. Par contre, la concentration du MDA hépatique a diminué dans les groupes recevant l'extrait de flavonoïdes. Ceci prouve l'effet préventif des flavonoïdes sur la toxicité hépatique par diminution de la peroxydation lipidique.

2. Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut de *T. garganica*

Nous avons recherché l'effet anti-inflammatoire potentiel de l'extrait brut des racines de *Thapsia garganica* dans un modèle *in-vivo* utilisant la carragénine comme molécule pro-inflammatoire. Ce modèle est le plus étudié pour tester l'activité anti-inflammatoire *in-vivo* de n'importe quelle molécule (Gerhard, 2002) et cette activité est souvent représentée sous forme de pourcentage d'augmentation de la taille de l'œdème et en pourcentage d'inhibition de l'œdème, ce dernier traduit l'activité anti-inflammatoire proprement dite. Un anti-inflammatoire de référence est utilisé dans ce genre d'étude comme témoin positif pour comparer l'effet de la molécule étudiée et pour pouvoir conclure sur l'importance ou non de cet éventuel effet. Dans ce travail, nous avons choisi le diclofénac injectable à une dose de 5 mg/kg en se basant sur les données de littérature scientifique (Nsonde et al., 2010).

L'analyse du pourcentage d'augmentation de la taille de la patte induite par la carragénine par rapport à la taille initiale avant injection de la carragénine permet d'évaluer l'ampleur de l'œdème installé (tableau IX) et donne une idée sur l'efficacité de la mise en place de l'inflammation et donc du modèle expérimentale en général. Dans notre étude les pourcentages d'augmentation de la taille de la patte chez les rats témoins non traités montre bien l'installation d'un œdème important qui atteint un volume maximal 2h après l'injection de la carragénine avec un pourcentage de 63,80 % d'augmentation de la taille de la patte par rapport à la taille initiale, la taille de l'œdème reste élevée pendant la durée de l'étude (4 heures) même si elle diminue légèrement vers 4 heures, ces résultats sont identiques à ceux de la littérature (Sy et al. , 2008). L'œdème s'est installé chez les rats recevant le diclofénac (5 mg/kg) mais avec une taille moins importante que le témoin, la différence du pourcentage d'augmentation de la taille de la patte et donc de l'œdème a été significative ($p < 0.05$) dans trois sur les quatre mesures réalisées et les résultats de la deuxième heure (14,09 %) ont été hautement significatifs ($p < 0,01$) avec un pourcentage d'augmentation de 37,01 %.

Tableau IX: Effet de l'extrait brut de *T. garganica* et du Diclofénac sur l'œdème inflammatoire de la patte de rat induit par la carragénine

Temps Traitement	Pourcentage d'augmentation de la taille de la patte induite par la carragénine			
	1h	2h	3h	4h
Témoin négatif	51,31 ± 8,70	63,80 ± 8,24	53,30 ± 12,62	41,23 ± 5,01
Diclofénac 5mg/kg	29,31 ± 14,5 *	37,01 ± 10,25 **	36,14 ± 14,00	25,49 ± 10,71 *
Extrait brut de <i>T.</i> <i>garganica</i> 5mg/kg	28,01 ± 10,00 **	14,09 ± 8,39 *** ##	10,35 ± 12,79 ** #	1,96 ± 5,54 *** ##

(*) : comparaison avec le lot témoin non traité. * : significatif ; ** : hautement significatif ; *** : très hautement significatif.

(#) : Comparaison avec le lot témoin positif traité par le diclofénac. # : Significatif ; ## : hautement significatif ; ### : très hautement significatif.

Chez les lots traités par l'extrait brut des racines de *Thapsia garganica* à une dose de 5 mg/kg, l'œdème installé a été beaucoup moins important que le témoin non traité et que le lot recevant le diclofénac, la taille de l'œdème a continué de diminuer en fonction du temps. La différence de l'augmentation de la taille de la patte comparée aux témoins non traité a été de hautement significative à très hautement significative pendant la durée de l'étude (sur les quatre heures) avec une augmentation maximale de 28,01 % après une heure et minimale de 1,96 % après quatre heures. Cette diminution a été aussi significative à hautement significative à partir de la deuxième heure comparée aux témoins positifs recevant le diclofénac (5 mg/kg).

✓ L'inhibition de l'œdème

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème représente la différence du pourcentage d'augmentation de la taille de la patte chez les rats traités par l'extrait et l'anti-inflammatoire de référence calculée par rapport au pourcentage d'augmentation de la taille de la patte chez les témoins non traités. Ce pourcentage d'inhibition représente le pouvoir anti-inflammatoire proprement dit des traitements utilisés (tableau X).

La diminution de la taille de la patte chez le Lot recevant le diclofénac (5 mg/kg) a été accompagnée par une augmentation du pourcentage d'inhibition de l'œdème qui atteint une inhibition de 49,10 % après 4 heures, calculé par rapport aux témoins, ces résultats sont similaire aux résultats de la littérature où le Diclofénac est utilisé à la même dose. Cette inhibition de l'œdème est due à l'action anti-inflammatoire puissante du diclofénac, connu pour être une

référence dans sa classe médicamenteuse et dont le mécanisme d'action est l'inhibition puissante de la COX-2 (Van Hecken et al., 2000).

Tableau X : Pourcentage d'inhibition de l'œdème après un traitement ou non avec l'extrait brut des racines de *T. garganica* ou un anti-inflammatoire de référence le Diclofénac.

Temps	Pourcentage d'inhibition de l'œdème			
	1h	2h	3h	4h
Traitement				
Diclofénac 5mg/kg	38,64 ± 7,05	41,97 ± 16,07	43,24 ± 10,29	49,10 ± 10,14
Extrait brut de <i>T. garganica</i> 5mg/kg	45,39 ± 19,5	77,91 ± 13,15 **	90,02 ± 18,13 **	95,24 ± 13,15 **

(*) : Comparaison avec lot témoin positif traité par le Diclofénac. * : significatif ; ** : hautement significatif ; *** : très hautement significatif.

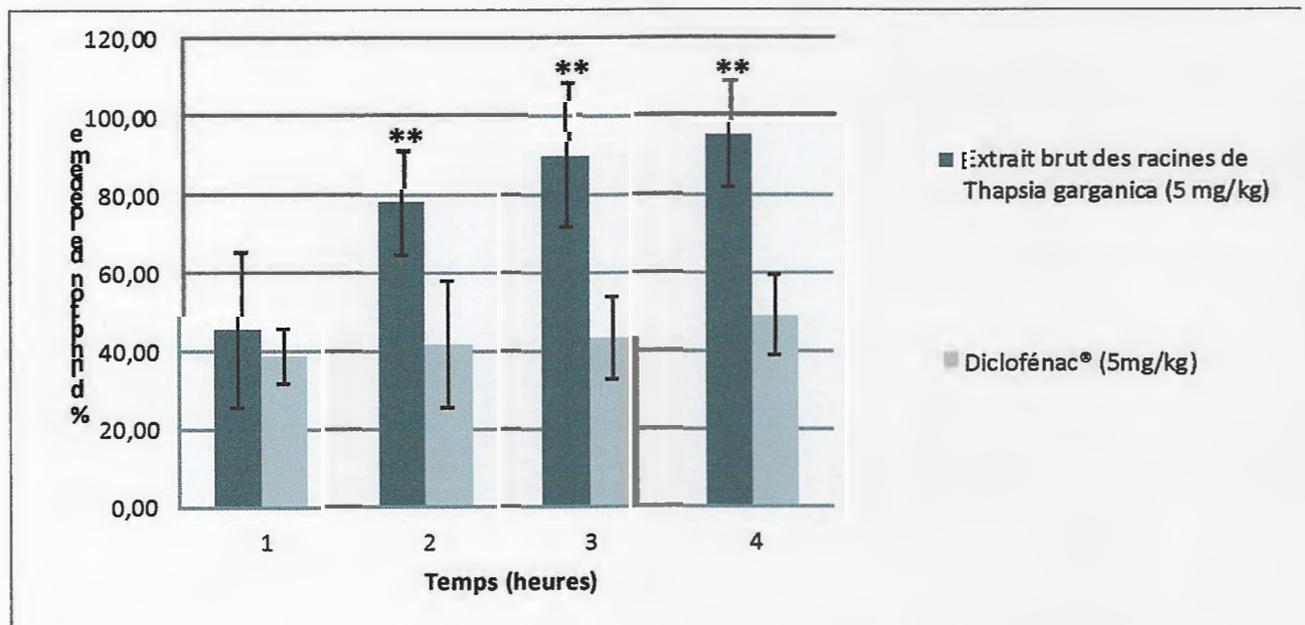


Fig. 18 : Pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème après un traitement ou non avec l'extrait brut des racines de *T. garganica* ou le diclofénac.

(*) : Comparaison avec lot témoin positif traité par le Diclofénac. * : significatif ; ** : hautement significatif ; *** : très hautement significatif.

La diminution du pourcentage d'augmentation de la taille de la patte chez le lot recevant l'extrait a été aussi accompagnée par une augmentation considérable du pourcentage d'inhibition de l'œdème en fonction du temps qui atteint une inhibition maximale de 95,24 % après quatre

heures. Cette augmentation des pourcentages d'inhibition a été hautement significative ($p < 0,01$) à partir de deux heures comparée avec le témoin positif (Fig. 18).

Ces résultats ne laissent aucun doute sur la présence d'une puissante activité anti-inflammatoire due à l'extrait brut des racines testé, cette activité est supérieure à celle du diclofénac à la même dose ou même à une dose plus faible sachant que la dose de 5 mg/kg représente le principe actif du diclofénac alors qu'elle représente l'extrait brut entier pour les lots recevant ce dernier. On peut conclure sur l'existence d'un métabolite ou même plusieurs dans l'extrait brut des racines de *Thapsia garaganica* qui possède une activité anti-inflammatoire très puissante à des doses très faibles. Il convient de préciser ici qu'à des doses plus fortes l'extrait testé devient très toxique où on a obtenu 80 % et 100 % de létalité chez des lots homogènes de rats 30 minutes à une heure après un traitement avec des doses de 200 mg/kg et 400 mg/kg respectivement. Une autre étude réalisée sur ce même extrait (non publiée dans ce travail) a montré un blocage puissant de la chaîne respiratoire ce qui explique la mort des animaux. Cette toxicité semble être similaire à celle du diclofénac et d'autres inhibiteurs de la COX-2 dont la cardiotoxicité a été prouvée (Cannon, 2006), ce qui nous laisse penser à un mécanisme d'action qui implique l'inhibition des COX-2 par l'extrait testé même si une telle conclusion est prématurée et nécessite des études d'identification de la molécule en cause et de son action sur l'activité et l'expression des COX. Une autre hypothèse issue de la littérature concerne la toxicité de la thapsigargine, un sesquiterpène issu des racines de *Thapsia garganica* dont il est le métabolite le plus étudié de la plante et dont l'effet pro-apoptotique via l'inhibition de la pompe calcium ATPase du réticulum sarco et endoplasmique est devenu un moyen expérimentale pour provoquer l'apoptose (Thastrup et al., 1990 ; Muthukkumar et al., 1995). Il convient de signaler aussi que le rendement de la plante est très faible pour cette molécule, mais des traces en nanomolaire peuvent avoir une toxicité.

L'extrait montre des résultats prometteurs sur l'inhibition de l'inflammation, mais des études plus approfondies sont nécessaires pour identifier et séparer le ou les métabolites responsables de cette activité et pour déterminer son index thérapeutique où il aura le meilleur effet thérapeutique et le minimum tolérable d'effets secondaires, il est nécessaire aussi d'étudier la pharmacocinétique de ce/ces métabolite(s); absorption, distribution transformation/métabolisme, et élimination chez l'animale puis espérer une application clinique.

Conclusion

Les résultats de la présente étude confirment la présence des composés actifs à potentiel pharmacologique important dans la plante *Thapsia garganica* L. de la région de Jijel.

En effet, les extractions et les dosages des polyphénols et des flavonoïdes ont montré une richesse de la plante en polyphénols préférentiellement avec des taux de flavonoïdes remarquables pour certaines fractions dont les flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne en particulier. La majorité de ces composés phénoliques ont montré une activité anti-radicalaire importante comparée à la vitamine C, cette activité semble avoir une relation avec le taux des flavonoïdes et des polyphénols dans les différentes fractions y compris les extraits bruts.

Dans la deuxième partie inédite du travail, l'évaluation de l'activité antioxydante *in vivo* de l'extrait des flavonoïdes monoglycosides de la partie aérienne qui a montré la meilleure activité *in vitro*, a révélé la présence d'un effet antioxydant intéressant traduit par la diminution de la toxicité induite par la doxorubicine et le rétablissement du profile antioxydant des cellules hépatiques.

La dernière partie de notre travail a été la plus porteuse en matière de résultats où l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire *in vivo* sur un modèle à la carragénine a montré une action anti-inflammatoire très importante et des taux d'inhibition de l'œdème inflammatoire supérieurs à ceux d'un anti-inflammatoire de référence le « diclofénac » à la même dose.

Les résultats de notre travail apportent l'évidence du potentiel thérapeutique important des métabolites non ou peu étudiés de la plante *Thapsia garganica* et ce travail n'est qu'une première étape d'un autre travail énorme qui peut aboutir au développement d'un nouveau médicament anti-inflammatoire d'origine naturelle et pourquoi pas un antioxydant aussi.

Néanmoins, la purification et l'identification des principes actifs responsables des activités anti-inflammatoire et antioxydante ainsi que l'étude des mécanismes moléculaires de leur mode d'action s'avèrent nécessaires afin de mieux caractériser leurs propriétés biologique et pharmacologique et envisager une application clinique.

Références bibliographiques

A

Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. & Trinajstić N. Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA* (2003); **76** (1): 55-61.

Ancerewicz J., Migliavacca E., Carrupt PA., Testa B., Brée F., Zini R., Tillement JP., Labidalle S., Guyot D., Chauvet-Monges AM., Crevat A. & Le Ridant A. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med* (1998); **25** (1):113-20.

Antonio JP. & Arregui LP. Studies on *Thapsia* (Apiaceae) from north-western Africa: a forgotten and a new species. *Bot. J of the Linnean Society* (2003); **143** (4): 433-442.

Arcamone FA. Sabarubicin. *J TOP CUR CHEM* (2008); 283: 171-189. In: « Anthracycline Chemistry and Biology II: Mode of Action, Clinical Aspects and new drugs, Volume 2.

B

Baba Aissa F. Encyclopedie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb. Ed. Librairie moderne ROUIBA (2000).

Bagchi D., Bagchi M., Hassouna EA, Kelly J. & Stohs SJ. (1995). *Toxicology* 95: 1.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Vasseur J., Gazin JC., Pinkas M., Luyckx M. & Gazin M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch/ drug Res* (1996); 1:6.

Beauchamp C. & Fridovich I. Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem* (1971); **44**: 276-287.

Boik J. Naturel compound in cancer therapy. Oregon Medical Press (2001)

Boizot N., Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra* (2006); numéro spéciale : 79-82

Bradford MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Anal Biochem* (1976); **72**, 248-254.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *La Voisier TEC & DOC* (1993), Paris. 2ème édition. P: 268-277.

Buedge JA. & Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In *Biomembranes (Part C: Biological Oxidation)*, Methods in Enzymology, Fleisher S.F. & Packer L. (Eds.). *London Academic Press* (1978); **52** : 302-309.

Burden DA. & Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* (1998), **1400**:139-154.

C

Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat AG., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem* (2002), **383** (6) : 93 - 100.

Cannon CP., Curtis SP., FitzGerald GA., Krum H., Kaur A, Bolognese JA., Reicin AS., Bombardier C., Weinblatt ME., van der Heijde D., Erdmann E. & Laine L. MEDAL Steering Committee. Cardiovascular outcomes with etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison. *Lancet* (2006); 368 (9549):1771-81.

Català A. Lipid peroxidation [en ligne]. *Sci Topics* (2011). Disponible sur: « http://www.scitopics.com/LIPID_PEROXIDATION.html ». Consulté le 8. 4. 2012.

Català A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and physics of lipids* (2009); **157**: 1-11.

Christensen S. B., Rasmussen U., & Sandberg F. *Acta. Pharm. Suec.*(1978) ; **15** :133.

Clairborne A. Catalase activity, In: Greenwald R.A. (Ed), *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton (1985); FL, pp. 283-284.

Comhair SA. & Suzy AA. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol* (2002), 283: L246-L256.

D

Delattre J. Radicaux libres et stress oxydant. ed. : TECDOC. *Londres-paris –new york*. (2005); p : 620.

Denmeade SR, Jakobsen CM, Janssen S, Khan SR, Garrett ES, Lilja H, Christensen SB, Isaacs JT. Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* (2003), 95(13):990-1000.

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

Durackova Z. Some current insight into oxidative Stress. *Physiol Res* (2010); 59: 459-469.

E

Ellman G. L. Plasma antioxidants». *Arch. Biochem & Biophys.* (1959); 82: 70-77

F

Favier, A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique (2003), 108-115.

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

Furuya Y., Lundmo P., Short AD., Gill DL. & Isaacs JT. The role of calcium, pH, and cell proliferation in the programmed (apoptotic) death of androgen-independent prostatic cancer cells induced by thapsigargin. *Cancer Res* (1994), 54 (23): 6167-75.

G

Gerhard Voget H. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2002); 759-762.

H

Habig WH., Pabst MJ. & Jakoby WB. Glutathione S-Transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J OP Bromo-cn- CHEMY* (1974); 249 (22): 7130-7139.

Halliwell B. & Chirico S. Lipid peroxydation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* (1993); 57 (Suppl): 715-724.

Halliwell B. & Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods enzymol* (1990); 186: 1-85.

Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now. *Free Radic-bio-med* (2002); 33: 774-797.

I

Iqbal M., Som D.S., Yasumasa O., Masayoshi F. & Shigero O. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolising enzymes in male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmaco & toxico* (2003); 92: 33-38.

J

Jungsuwadee P., Vore M. & Clair D. Chemotherapy-induced oxidative stress in nontargeted normal tissues. *In: Oxidative stress in cancer biology and therapy* (2012).

L

Lahouel M., Boulkour S., Segueni N. & Fillastre JP. 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 Bio* (2004); (52): 314-322.

Lakshman K., Shivaprasad H., Jaiprakash & Mohan. Anti-inflammatory and antipyretic activities of *Hemidesmus indicus* root extract. *Afr. J. Trad. CAM*, (2006); 3 (1): 90 - 94.

Larson, RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* (1988); 27: 969-978.

Le Floc'h E. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne. Imprimerie Officielle De La République Tunisienne (1983), p188-190.

Lytton J., Westlin M. & Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* (1991), **266** (26):17067-71

M

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C, and Jimenez I. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* (2004); **79**: 727-47

Matés J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxico* (2000); **153**: 83-104.

Merghem R. Elément de biochimie végétale. Bahaeddine Edition (2009); 105-132.

Muthukkumar S., Nair P., Sells SF., Maddiwar NG., Jacob RJ. & Rangnekar VM. Role of EGR-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in the melanoma cell line A375-C6. *Mol Cell Biol* (1995); **15** (11): 6262-72.

N

Nantel F., Denis D., Gordon R. , Northey A., Cirino M., Metters KM. & Chan C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology* (1999) **128**, 853-859

Nijveldt RJ., van Nood E., van Hoorn DE., Boelens PG., van Norren K. & van Leeuwen PA. Flavonoids a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* (2001); **74** (4): 418-25.

Noctor G. & Foyer CH. Ascorbate and Glutathion: Keeping Active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (1998); **49**: 249-279.

O

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

P

Pereira G.C. & Oliveira P.J. Pharmacological strategies to counteract doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of mitochondria. *J theortical & experim Pharmaco* (2008); **1** (2): 39-53.

Priyadarsini K I. Molecular mechanisms involving free radical reactions of antioxidants and Radioprotectors. *Founder's Day Special.* (2005). Issue: 1-6.

R

Rached W., Benamar H., Bennaceur M. & Marouf A. Screening of the antioxidant potential of some algérien indigenous plants. *J bio Scie* (2010); **10** (4): 316-324.

Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *New England Journal of Medecine* (1999); **340**: 115-126.

S

Salvayre, R., Auge, N. & Nègre-Salvayre, A. Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.F., Toussaint, M.P., Jacob, L., Lagrost, J., Chapman, Eds. Masson: Paris, (2003), **14**, 269-290.

Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR & Cuts SM. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* (2006); **66**: 4863-4871.

Sy Gy., Wélé A., Ndiaye M., Diatta W., Barbosa FS., Dièye AM., Touré MT., Bassène E., Faye B. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*Annona reticulata* (annonacées) sur l'œdème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines* (2008) ; **15** : 23 – 25.

T

Tapas AR., Sakarkar DM. & Kakde RB. Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research* (2008); **7** (3) : 1089-1099.

Thastrup O, Cullen PJ., Drøbak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1990), **87**(7):2466-70.

Tiqwari, A. K. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science.* (2001), **81** (9): 1179-1181.

U

Urquiaga I. & Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.* (2000), **33** (2) : 55-64.

V

Van Hecken A, Schwartz JI, Depré M, De Lepeleire I, Dallob A, Tanaka W, Wynants K, Buntinx A, Arnout J, Wong PH, Ebel DL, Gertz BJ & De Schepper PJ. Comparative inhibitory activity of Rofecoxib, Meloxicam, Diclofenac, Ibuprofen, and Naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* (2000); **40** (10):1109-20.

Vane, J.R. & Botting, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Infamm. Res* (1995); **44** (1): 10.

Volm, M., Kastel, M., Mattern, J., & Efferth, T. Expression of resistance factors (Pglycoprotein, glutathione S-transferase-pi, and topoisomerase II) and their interrelationship to proto-oncogene products in renal cell carcinomas. *Cancer.* (1993); **71**(12): 3981-7.

W

Winter CA. , Risley EA. & Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* (1962); **111**: 544-7,.

Wolff SP., Bascal ZA., Hunt JV. Autoxidative glycosylation: free radicals and glycation theory. *Prog Clin Biol Res* (1989); **304**: 259-75.

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

X

Xu C, Ma H, Inesi G, Al-Shawi MK, Toyoshima C. Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the Ca²⁺ ATPase SERCA. *Biol Chem*. (2004), 279 (17) : 17973-9

Z

Zima T., Tesar V., Sherwood R., Sood A., Au LC, Peter J. Richardson & Victor R. Acute Dosage With Dexrazoxane, but not Doxorubicin, Is Associated With Increased Rates of Hepatic Protein Synthesis in vivo. *Toxicol Pathol* (2001); **29**: 591

Résumés

المخلص

الغرض من هذا العمل كان تحضير المستخلص الخام كمرحلة أولى ومن ثم فصل المركبات الفينولية و الفلافونويدية من نبتة *Thapsia garganica L.* قطفت من منطقة جيجل. قد أظهر قياس تركيز البوليفينول والفلافونويد بواسطة تقنيات تعتمد على كواشف فولين و $AlCl_3$ على التوالي مستويات عالية من مادة البوليفينول و مرتفعة نسبيا من الفلافونويد في بعض المستخلصات. و كشف اختبار الجدر الحر DPPH نشاط مثبط كبير للجذور الحرة عند كثير من مستخلصات النبتة خصوصا المستخلص الخام للجزء الهوائي من النبتة و مستخلص الفلافونويدات أحادية السكر و قد أظهرت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لهذا الأخير نتائج مثيرة للاهتمام عند الفئران حيث يخفّض الأكسدة التي يسببها دواء دوكسوروبيسين في كبد الحيوانات و مستوى تأكسد الدهون، كما أنّ هذا المستخلص ساعد على استعادة مستويات نشاط الأنظمة الحيوية المضادة للأكسدة إلى قيم قريبة من وضعها الطبيعي. أخيرا كشفت دراسة النشاط المضاد للالتهابات تأثير المستخلص الخام لجذور النبتة على نموذج اختباري من الجرذان باستعمال مادة الكاراجينان، حيث كان نشاط المستخلص المضاد للالتهابات قوي جدا مع قدرة كبيرة على تثبيط الالتهابية، وهي أعلى من قدرة تثبيط دواء ديكلوفيناك المضاد للالتهابات، وهذه النتائج مشجعة جدا لتطبيق سريري محتمل .

كلمات مفتاحية: الفلافونويدات *Thapsia garganica L.* مضاد للأكسدة، مضاد للالتهابات

Résumé

Le but de ce travail était de préparer les extraits bruts dans un premier temps puis séparer par la méthode des affrontements le contenu phénolique et flavonoïdique de la plante *Thapsia garganica L.* de la région de Jijel. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes par des techniques utilisant les réactifs de *Folin* et *AlCl₃* respectivement ont montré des taux élevés en polyphénols et relativement élevés en flavonoïdes dans certaines fractions. Le test au DPPH° a révélé une activité anti-radicalaire importante pour plusieurs fractions mais surtout pour l'extrait brut de la partie aérienne et l'extrait des flavonoïdes monoglycosides, ce dernier a montré des résultats intéressants pour l'étude de l'activité antioxydante *in vivo* où il a réduit le stress oxydant induit par la doxorubicine dans le foie des animaux et a diminué la lipoperoxydation, il a aussi rétabli les activités enzymatiques et non enzymatiques des systèmes antioxydants (SOD, CAT, GST, GSH) vers des valeurs proches de la normale. Enfin l'étude de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait brut des racines sur un modèle à la carragénine révèle une activité anti-inflammatoire très puissante avec un pouvoir d'inhibition de l'œdème inflammatoire comparable à celui du diclofénac l'anti-inflammatoire de référence, ces résultats sont très encourageants pour une éventuelle application clinique.

Mots clés : anti-inflammatoire, antioxydant, *Thapsia garganica L.*, flavonoïdes.

Abstract

The purpose of this work was to prepare crude extracts of the plant *Thapsia garganica* L. from the region of Jijel, and then to separate by the method of confrontation of the phenolic and flavonoid contents. The determination of total polyphenols and flavonoids by the techniques using reagents of *Folin* and $AlCl_3$ respectively showed high levels of polyphenols and flavonoids which were relatively high in some fractions. The DPPH ° test revealed a significant antiradical activity for many fractions but especially for the crude extract of aerial parts and the monoglycosid flavonoids extract. This last has shown interesting results for the study of antioxidant activity *in vivo* where it decreases oxidative stress induced by doxorubicin in animal livers and reduces lipid peroxidation, it has also restored activity levels of enzymatic and non enzymatic antioxidant systems (SOD, catalase, GST, GSH) to values close to normal. Finally the anti-inflammatory effect study of the roots crude extract on an inflammatory animal model with carrageenan revealed a very powerful anti-inflammatory activity with an ability to inhibit the inflammatory oedema comparative to Diclofenac used as anti-inflammatory reference, these results are very encouraging for possible clinical application.

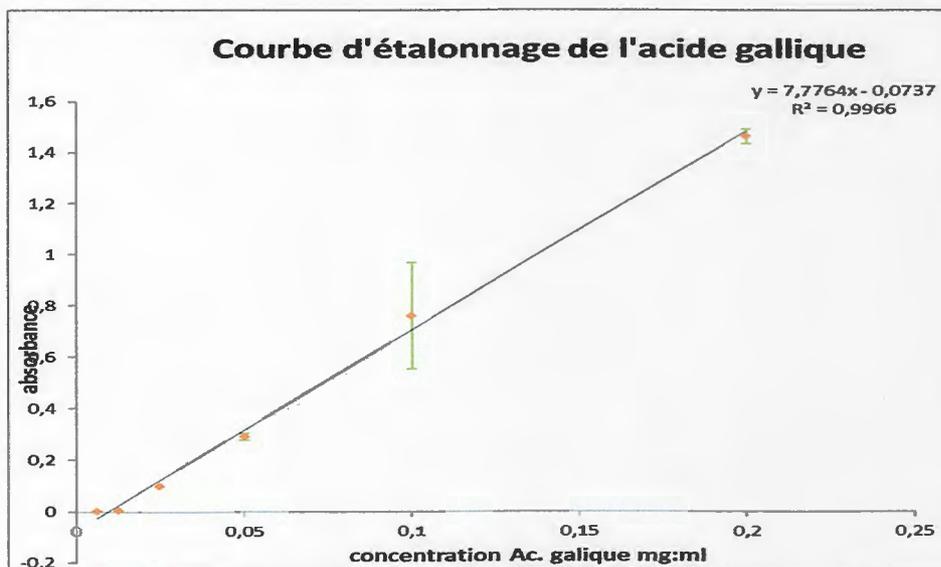
Key words: anti-inflammatory, antioxidant, *Thapsia garganica* L. , flavonoids.

Annexes

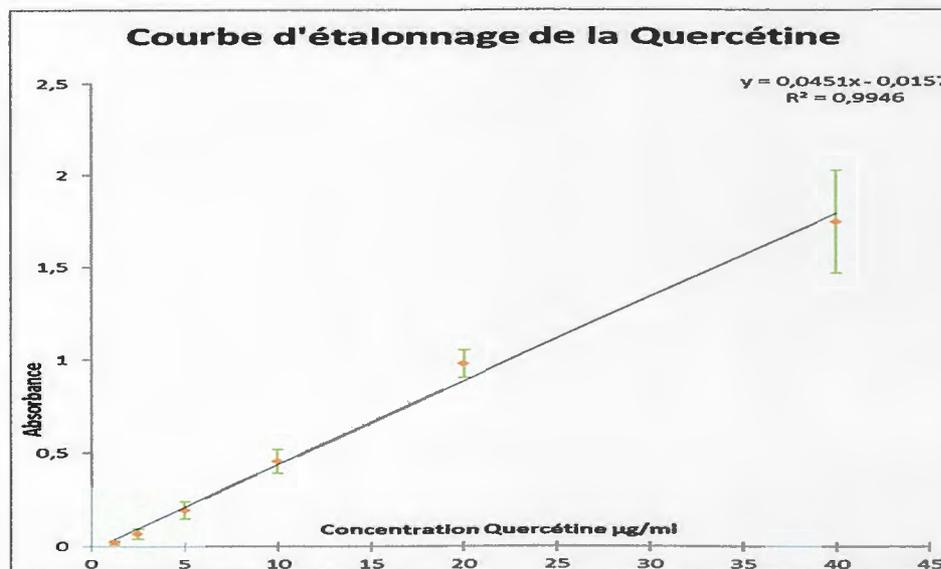
Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau : Concentration en acide gallique pour la réalisation de la gamme d'étalonnage

[Ac gal](mg/ml)	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0062
DO1	1,482	0,615	0,284	0,098	0,004	0,001
DO2	1,442	0,906	0,302	0,1	0,003	0,002

**Annexe 2** : Courbe d'étalonnage de la quercétineTableau : concentration en quercétine $\mu\text{g/ml}$ pour la réalisation de la gamme d'étalonnage

[quer] ($\mu\text{g/ml}$)	40	20	10	5	2,5	1,25
DO1	1,941	1,031	0,497	0,225	0,089	0,03
DO2	1,548	0,927	0,41	0,161	0,05	0,014



Annexe 3 : Courbe d'étalonnage du glutathion

Tableau : Concentration pour la réalisation de la gamme d'étalonnage du GSH

[GSH]mM	0	0,31	0,62	1,25	2,5	5	10
DO1	0,063	0,072	0,09	0,124	0,228	0,395	0,713
DO2	0,063	0,072	0,095	0,135	0,234	0,382	0,717

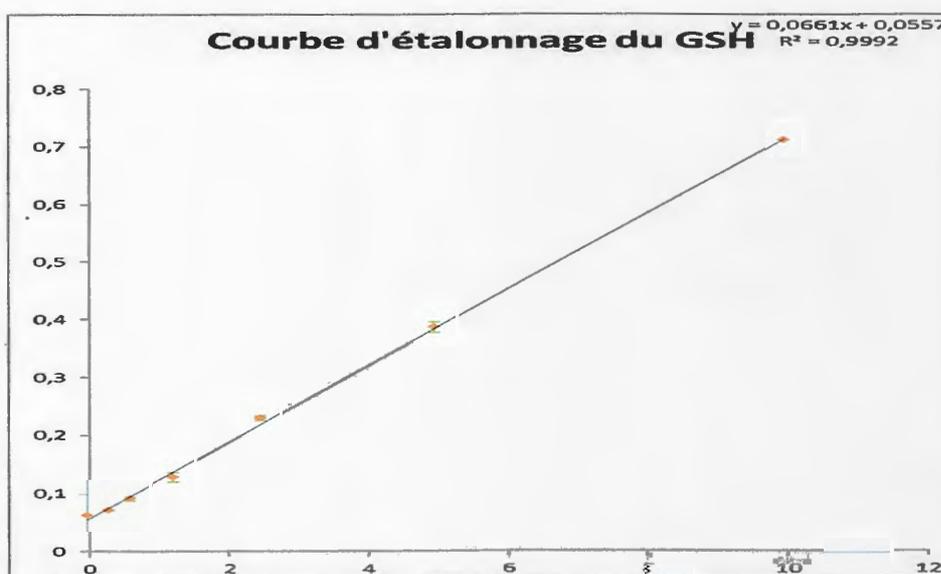
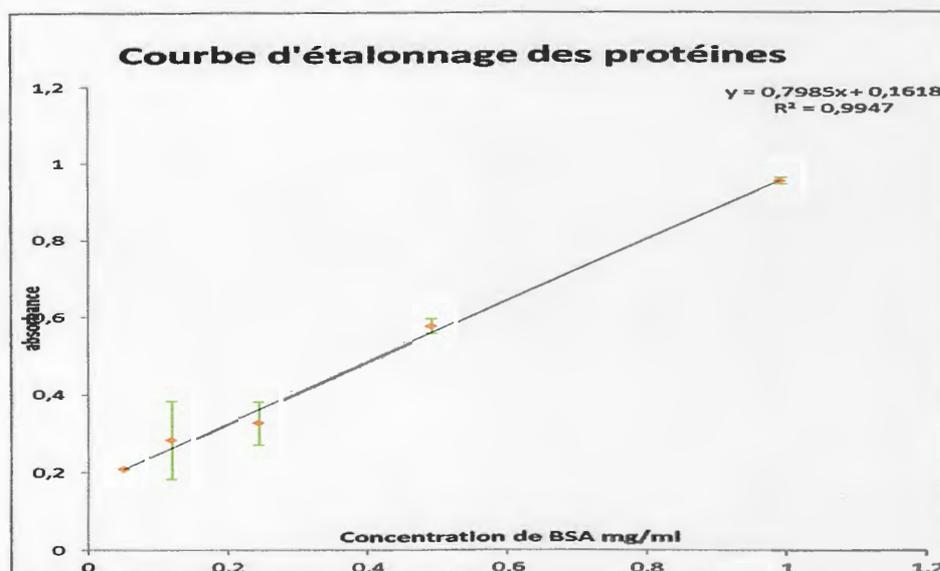
**Annexe 4** : Courbe d'étalonnage des protéines

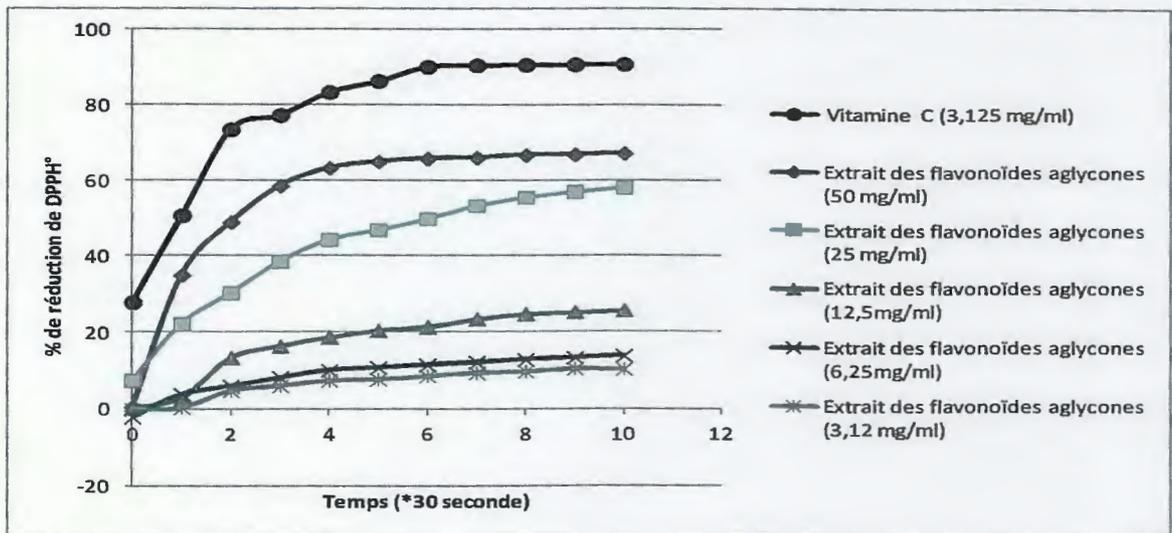
Tableau : concentrations pour la réalisation de la gamme d'étalonnage de la BSA

[BSA]mg/ml	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1
DO1	1,065	0,139	0,244	0,339	0,583	0,975
DO2	1,065	0,28	0,322	0,313	0,571	0,942

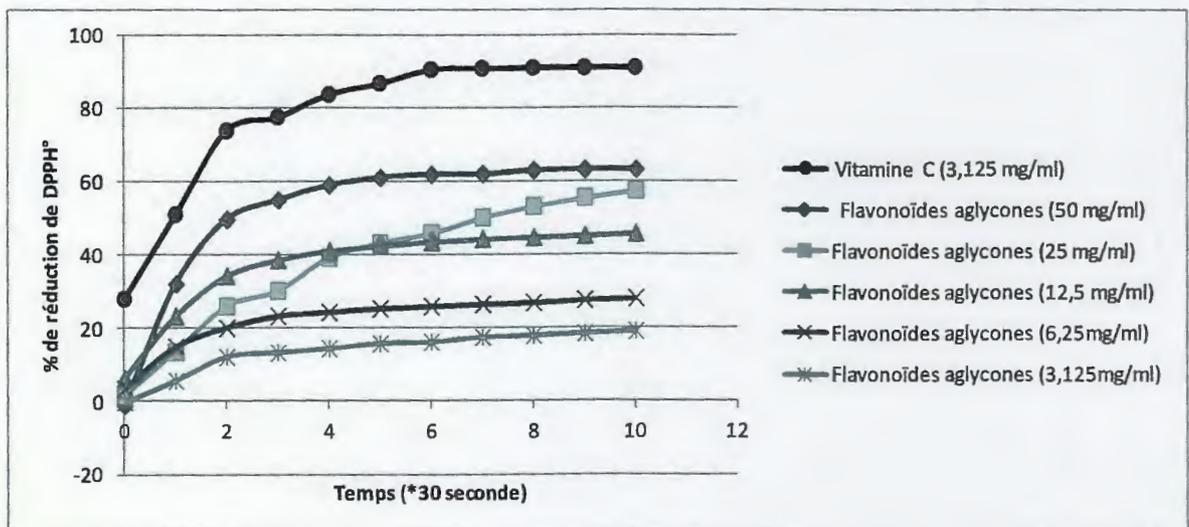


Annexe

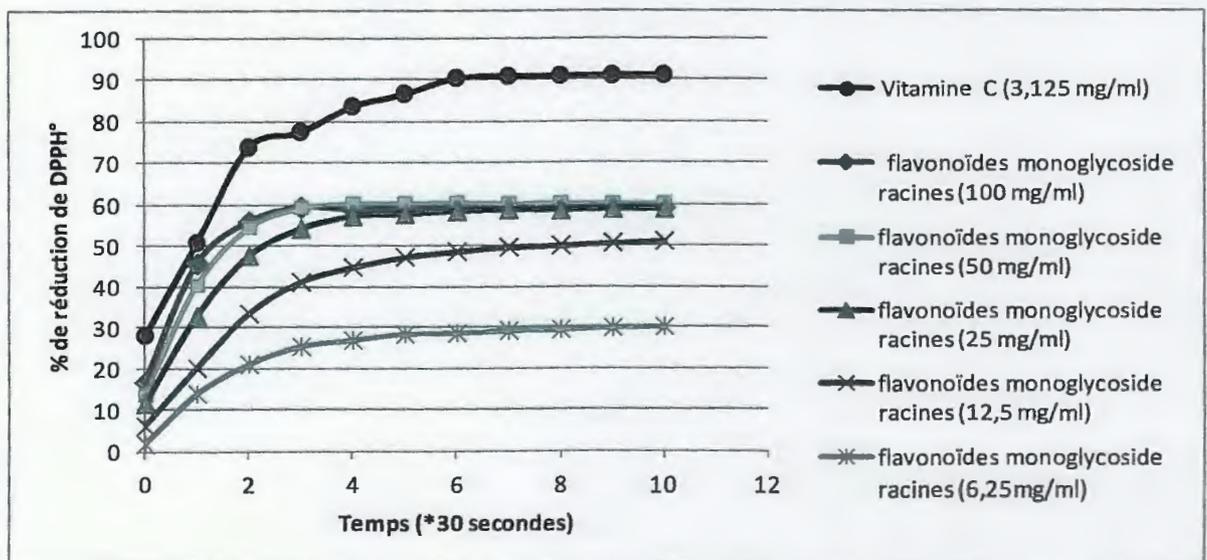
Annexe 5 : Résultat DPPH de l'extrait des flavonoïdes aglycones des racines



Annexe 6 : Résultat DPPH de l'extrait des flavonoïdes aglycones de la partie aérienne

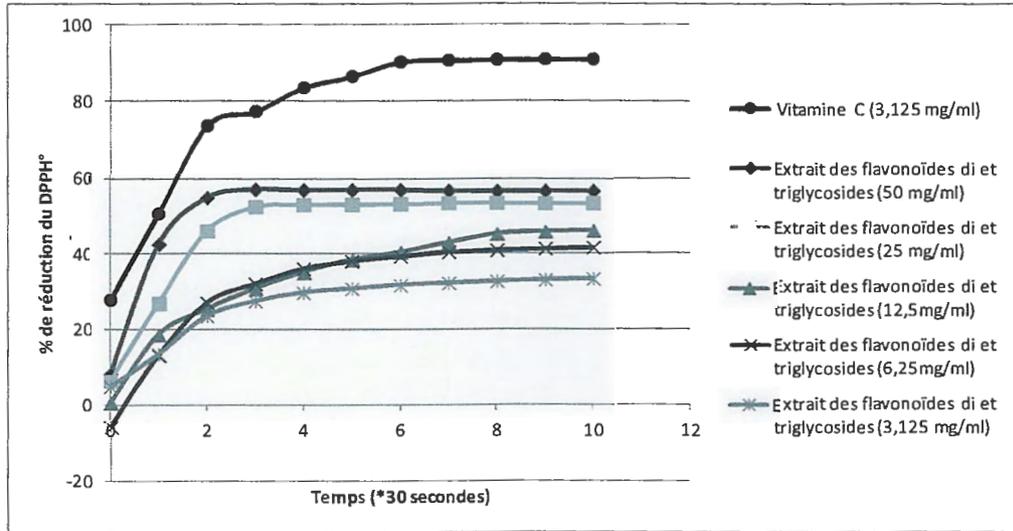


Annexe 7 : Résultat DPPH de l'extrait des flavonoïdes monoglycosides des racines

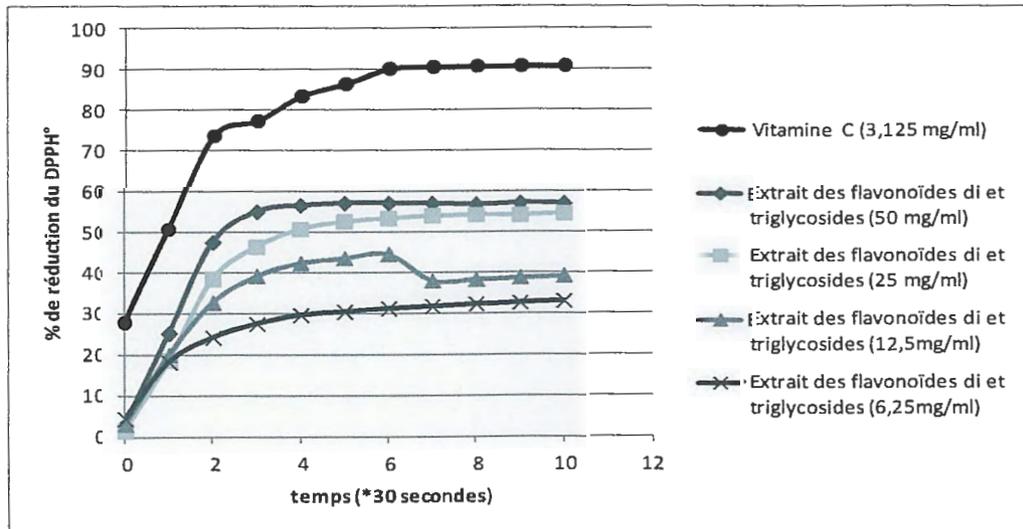


Annexe

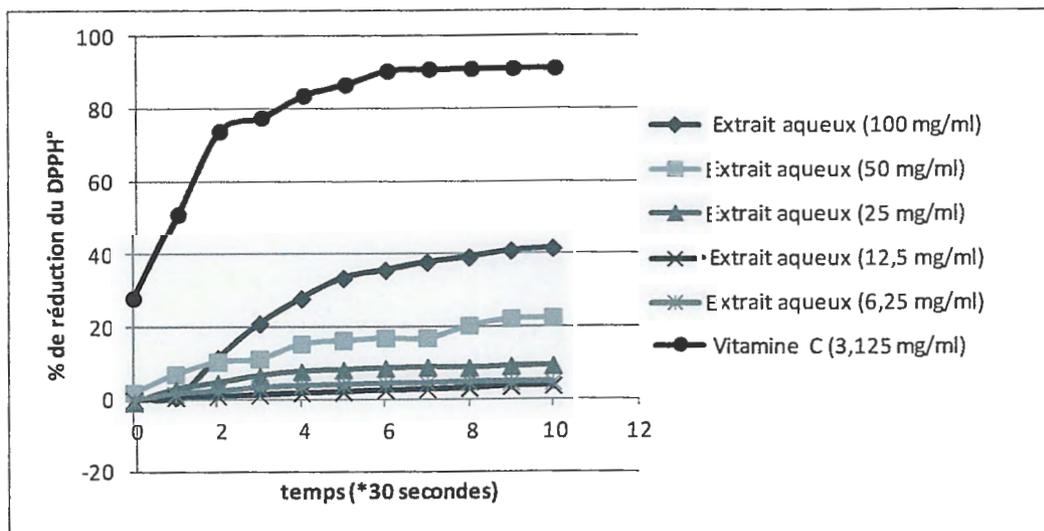
Annexe 8 : Résultat DPPH de l'extrait des flavonoïdes di et triglycosides des racines



Annexe 9 : Résultat DPPH de l'extrait des flavonoïdes di et triglycosides de la Partie aérienne

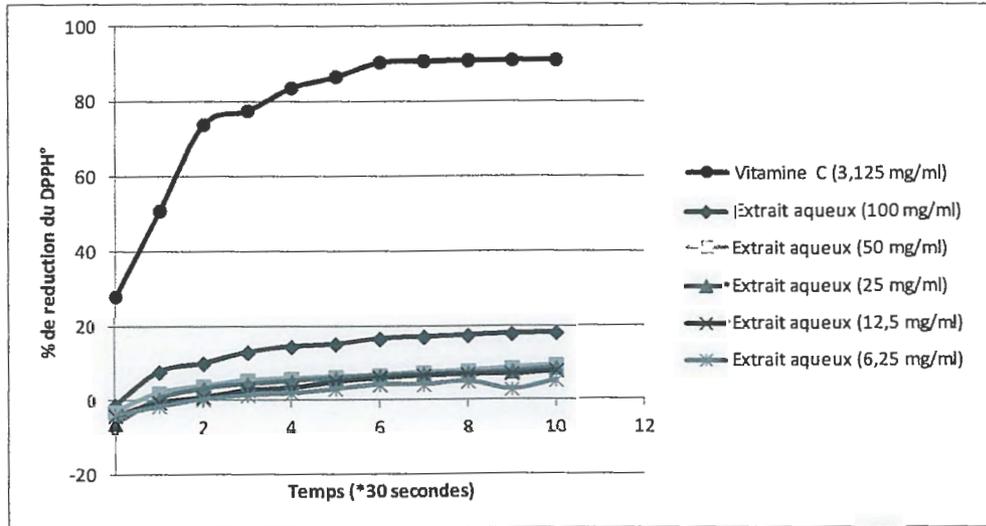


Annexe 10 : Résultat DPPH de l'extrait aqueux des racines



Annexe

Annexe 11 : Résultat DPPH de l'extrait aqueux de la partie aérienne



Présenté par : ATTOUM Faris
CHABOUNIA Fatima
LAHOUEL Badreddine

Promoteur : Mme BENGUEDOUAR Lamia

Date de soutenance : 01 / 07 / 2012

Thème

Contribution à l'étude phytochimique et évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits de la plante *Thapsia garganica L.* sur des modèles expérimentaux chez le rat Wistar

الملخص: الغرض من هذا العمل كان تحضير المستخلص الخام كمرحلة أولى ومن ثم فصل المركبات الفينولية و الفلافونويدية من نبتة *Thapsia garganica L.* فطفت من منطقة جيجل. قد أظهر قياس تركيز البوليفينول و الفلافونويد بواسطة تقنيات تعتمد على كواشف فولين و $AlCl_3$ على التوالي مستويات عالية من مادة البوليفينول و مرتفعة نسبيا من الفلافونويد في بعض المستخلصات. و كشف اختبار الجذر الحر DPPH نشاط مثبط كبير للجذور الحرة عند كثير من مستخلصات النبتة خصوصا المستخلص الخام للجزء الهوائي من النبتة و مستخلص الفلافونويدات أحادية السكر و قد أظهرت دراسة النشاط المضاد للأكسدة لهذا الأخير نتائج مثيرة للاهتمام عند الفئران حيث يخفض الأكسدة التي يسببها دواء دوكسوروبيسين في كبد الحيوانات و مستوى تأكسد الدهون، كما أن هذا المستخلص ساعد على استعادة مستويات نشاط الأنظمة الحيوية المضادة للأكسدة إلى قيم قريبة من وضعها الطبيعي. أخيرا كشفت دراسة النشاط المضاد للالتهابات تأثير المستخلص الخام لجذور النبتة على نموذج اختباري من الجرذان باستعمال مادة الكاراجينان، حيث كان نشاط المستخلص المضاد للالتهابات قوي جدا مع قدرة كبيرة على تثبيط الوذمة الالتهابية، وهي أعلى من قدرة تثبيط دواء ديكلوفيناك المضاد للالتهابات، وهذه النتائج مشجعة جدا لتطبيق سريري محتمل.

كلمات مفتاحية : مضاد للالتهابات، مضاد للأكسدة، نبتة *Thapsia garganica L.*، الفلافونويدات

Résumé : Le but de ce travail était de préparer les extraits bruts dans un premier temps puis séparer par la méthode des affrontements le contenu phénolique et flavonoïdique de la plante *Thapsia garganica L.* de la région de Jijel. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes par des techniques utilisant les réactifs de *Folin* et $AlCl_3$ respectivement ont montré des taux élevés en polyphénols et relativement élevés en flavonoïdes dans certaines fractions. Le test au DPPH° a révélé une activité anti-radicalaire importante pour plusieurs fractions mais surtout pour l'extrait brut de la partie aérienne et l'extrait des flavonoïdes monoglycosides, ce dernier a montré des résultats intéressants pour l'étude de l'activité antioxydante *in vivo* où il a réduit le stress oxydant induit par la doxorubicine dans le foie des animaux et a diminué la lipoperoxydation, il a aussi rétabli les activités enzymatiques et non enzymatiques des systèmes antioxydants (SOD, CAT, GST, GSH) vers des valeurs proches de la normale. Enfin l'étude de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait brut des racines sur un modèle à la carragénine révèle une activité anti-inflammatoire très puissante avec un pouvoir d'inhibition de l'œdème inflammatoire comparable à celui du diclofénac l'anti-inflammatoire de référence, ces résultats sont très encourageants pour une éventuelle application clinique.

Mots clés : anti-inflammatoire, antioxydant, *Thapsia garganica L.*, flavonoïdes.

Abstract: The purpose of this work was to prepare crude extracts of the plant *Thapsia garganica L.* from the region of Jijel, and then to separate by the method of confrontation of the phenolic and flavonoid contents. The determination of total polyphenols and flavonoids by the techniques using reagents of *Folin* and $AlCl_3$ respectively showed high levels of polyphenols and flavonoids which were relatively high in some fractions. The DPPH° test revealed a significant antiradical activity for many fractions but especially for the crude extract of aerial parts and the monoglycosid flavonoids extract. This last has shown interesting results for the study of antioxidant activity *in vivo* where it decreases oxidative stress induced by doxorubicin in animal livers and reduces lipid peroxidation, it has also restored activity levels of enzymatic and non enzymatic antioxidants systems (SOD, CAT, GST, GSH) to values close to normal. Finally the anti-inflammatory effect study of the roots crude extract on an inflammatory animal model with carrageenan revealed a very powerful anti-inflammatory activity with an ability to inhibit the inflammatory oedema comparative to Diclofenac used as anti-inflammatory reference, these results are very encouraging for possible clinical application.

Key words: anti-inflammatory, antioxidant, *Thapsia garganica L.*, flavonoids.