

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

M.pha.07/12

جامعة جيجل

Faculté de 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



01
01



Mémoire de fin d'Etudes pour l'obtention du Diplôme de Master en **Biologie**

Option : Pharmacologie Expérimentale

Intitulé

**Evaluation de l'effet protecteur et antioxydant de l'extrait
méthanolique de la plante *Centaurea fragilis* contre la
toxicité hépatique induite par le paracétamol chez le rat**

Membres de jury :

Président : Dr IDOUI Tayeb

Examineur : Pr LAHOUEL Mesbah

Encadreur : Dr RECHRECHE Hocine



Présenté par :

YOUNSI Rima

FATOUSSI Sarah

DRAA Adila

Année Universitaire 2011/2012



Liste des abréviations

ASAT : aspartate aminotransferase

ALAT: alanine aminotransferase

CAT : catalase

CF : *Centeurea fragilis*

CG-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse

CYP 450 : cytochrome P450

DO : densité optique

DPPH : 2,2-dihényl-1-picrylhydrazyle

E.aq : Extrait aqueux

E. méth : Extrait méthanolique

FCR : réactant de folin-Ciocalteu

g : gramme

GSH : glutathion

GST : glutathion-s-transférase

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

MDA : acide malonyl dialdéhyde

Mg : milligrammes

nM/g : nanomoles par gramme

NAPQI : N-acetyl-p-benzoquinone-imine

O₂⁰⁻ : anion superoxyde

P : probabilité

REG: reticulum endoplasmique granuleux

ROS: reactive oxygen species

UI/g: unité international par gramme

µg : microgrammes

µl : microlitres



Sommaire

Introduction	2
Partie I. Revue Bibliographique	3
I.1. Le foie et ses pathologies	4
I.1.1. Généralités.....	4
I.1.2. Physiologie du foie.....	4
I.1.3. Principales atteintes hépatiques dues au stress oxydatif.....	5
I.2. Intoxication hépatique induite par le paracétamol.....	6
I.2.1. Métabolisme du paracétamol.....	7
I.2.2. Mécanisme d'hépatotoxicité du paracétamol	7
I.2.3. Les symptômes de l'intoxication.....	8
I.3. Stress oxydatif.....	8
I.3.1. Les sources des ROS	9
I.3.2. Système de défense antioxydant.....	9
I.3.3. Les cibles biologiques du stress oxydant	10
I.4. Quelques sources de substances antioxydantes.....	12
I.4.1. Les composés phénoliques (polyphénols).....	12
I.4.2. <i>Centaurea fragilis</i>	13
Partie II. Matériel et méthodes	17
II.1. Matériel	17
II.2. Préparation et caractérisation des extraits bruts de la plante <i>Centaurea fragilis</i>	17
II.3. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	17
II.4. Analyse de l'extrait aqueux et méthanolique par CG-MS	18
II.5. La mise en évidence de l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux et méthanolique par le test de DPPH.....	18
II.6. La recherche de l'effet protecteur et antioxydant de l'extrait méthanolique de la plante <i>Centaurea fragilis</i> contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol	19
II.6.1. Dosage sérique des biomarqueurs hépatiques	19
II.6.2. Dosage des paramètres du stress oxydatif au niveau hépatique.....	20
II.7. Traitement statistique.....	22
Partie III. Résultats et Discussion	24
III.1. Caractérisation des extraits aqueux et méthanoliques de <i>Centaurea fragilis</i>	24
III.2. L'effet protecteur de l'extrait méthanolique de <i>Centaurea fragilis</i> contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol.....	30
Conclusion	41
Références bibliographiques	43



Introduction

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes furent le principal recours de la médecine de nos grands parents. Malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies souvent mortelles, environ 80 % de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle basé sur l'utilisation des plantes et les savoirs empiriques de nos ancêtres (El Rhaffari et Zaid, 2004).

L'Algérie recèle un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes, on y trouve plus de 30000 espèces végétales. Parmi lesquelles on trouve, les plantes aromatiques et médicinales utilisées dans différents domaines ; industrie agroalimentaire, pharmaceutique, et phytothérapie (Duraffourd et al., 1997).

La recherche sur les substances naturelles est devenue un thème de recherche porteur. Les laboratoires pharmaceutiques élaborent régulièrement de nouveaux composés actifs, par l'identification et la caractérisation de certaines molécules naturelles (plantes) (González et al., 1997). En effet, les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines, ...) et peuvent, permettre selon des techniques chimiques (extraction, distillation, ...) l'isolation du principe actif pour l'utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais ils peuvent néanmoins être mortels ou toxique pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (Duraffourd et al., 1997).

Ces substances que constitue le principe actif des plantes médicinales appartiennent majoritairement aux métabolites secondaires tels que les huiles essentiels, les alcaloïdes, et les polyphénols. Ces derniers sont largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, ils possèdent potentiellement des activités biologique anti-inflammatoires, anti cancérigène et antioxydantes (Oszmianski et al., 2007) .

Centaurea fragilis, espèce endémique appartenant au genre *Centaurea*, de la famille des astéracées, répandue en Algérie et au Maroc. Elle se trouve dans les sahels, les plaines littorales, l'atlas tellien oranais d'Algérie et en particulier dans notre région « Jijel », ou elle est connue sous le nom de « Hchichat Saffaïer » (حشيشة صفاير), utilisée couramment par notre population sous forme de macérât des racines pour la prophylaxie des atteintes hépatiques (Jaunisse).

Cette plante n'a jamais fait l'objet d'étude jusqu'à présent. Dans ce contexte nous avons jugé utile d'explorer ses propriétés pharmacologiques ; notamment anti-oxydantes et/ou anti-inflammatoires, en reproduisant un modèle animal exprimant des altérations hépatiques, en évaluant les différents paramètres phytochimiques et biochimiques.



Revue bibliographique

I.1. Le foie et ses pathologies

I.1.1. Généralités

Le foie est un organe essentiel à la vie, il possède toutes les caractéristiques d'une glande exocrine d'une part, en étant responsable de la sécrétion de la bile, et d'une glande endocrine d'autre part grâce à sa disposition particulière de sa vascularisation (Dadoune *et al.*, 2007). Cet organe reçoit deux systèmes vasculaires afférents: la veine porte (75 % du sang afférent) qui apporte des substances provenant de l'estomac et des intestins, de la rate et du pancréas, qui seront transformées au cours de leurs passages dans le foie et l'artère hépatique (25 % du sang afférent) qui fournit l'oxygène nécessaire aux multiples activités hépatiques. La vascularisation efférente est représentée par la confluence des veines centrolobulaires en veines sushépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure (André *et al.*, 2004).

La glande hépatique comporte au moins six types cellulaires qui coopèrent : les hépatocytes, les cellules de kupffer, d'Ito, les cellules endothéliales des capillaires sinusoides et les cellules des canaux biliaires. Les hépatocytes sont des cellules spécifiques, elles sont très riches en organites intracellulaires tels que l'appareil de golgi, les mitochondries, les réticulums endoplasmiques lisses et granulaires dont l'ingestion de substances toxiques ou de certains médicaments augmente leur volume, cette richesse en organites cytoplasmiques témoigne d'une grande activité métabolique (Domart, 1989). L'espace virtuel entre les hépatocytes et les cellules endothéliales (espace de disse) contient les cellules de kupffer qui ont des fonctions des macrophages par un mécanisme de phagocytose des bactéries, virus, particules étrangères, et débris cellulaires (André *et al.*, 2004). Les cellules d'Ito se caractérisent par la présence de vacuoles lipidiques cytoplasmiques différenciées dans le stockage des lipides. Elles peuvent se différencier pour fabriquer du tissu conjonctif de remplissage dans certaines pathologies. De plus ; quand elles sont activées par un processus inflammatoire, elles fabriquent du tissu fibreux (fibrose) qui au niveau du foie est un indicateur de lésion (Martin *et al.*, 2008).

I.1.2. Physiologie du foie

Le foie est doué d'une extraordinaire polyvalence métabolique, il joue un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides. La fonction glycogénique du foie assure le maintien d'une glycémie normale; en captant et en entreposant le glucose sous forme de glycogène (glycogénèse), en dégradant le glycogène en glucose (glycogénolyse), au besoin, ainsi qu'en formant du glucose à partir de substances non glucidiques telles que les protides et les lipides (glyconéogenèse) (Frexinis *et al.*, 2003). De plus, il synthétise la majeure partie des protéines qui circulent dans le plasma, y compris l'albumine et les facteurs de coagulation tels que le fibrinogène et la prothrombine, ces mécanismes ont lieu dans le réticulum endoplasmique granuleux et dans l'appareil de Golgi (Frexinis *et al.*, 2003). D'autre part, le foie intervient dans le métabolisme des lipides ; il synthétise le cholestérol à partir des produits de dégradation des acides gras.

Le cholestérol est transformé en acides biliaires, déversé dans le plasma, ou bien excrété dans la bile (Ben abess *et al.*, 2002).

L'hépatocyte synthétise en plus des acides biliaires, essentiellement l'acide cholique à partir du cholestérol, et les conjuguent au niveau du REG à des acides aminés tels que la glycine et la taurine, pour former les acides glycocholiques et taurocholiques (Poupon *et al.*, 2004); cette néosynthèse concerne environ 10 % des acides biliaires, 90 % étant rapportés sous forme libre dans le sang de la veine porte et reconjugués dans l'hépatocyte pour retourner dans la bile (Frexinos *et al.*, 2003).

En outre, le foie permet la détoxification de nombreuses substances grâce à des mécanismes biologiques de conjugaison dans le REG (Lechat, 2005), les conjugaisons des produits toxiques se font soit avec l'acide glycuronique (glycuroconjugaison) soit avec des ions sulfates (sulfoconjugaison) (Polonovski, 1971); ainsi elle neutralise divers médicaments, mais certains d'entre eux sont bioactivés et deviennent plus toxiques. Cela rend le foie particulièrement vulnérable aux lésions d'origine médicamenteuses (Yves, 2002).

I.1.3. Principales atteintes hépatiques dues au stress oxydatif

Le foie est une cible fréquente des substances toxiques pour plusieurs raisons, tous d'abord la plupart des toxiques pénètrent dans l'organisme par le tube digestif, après absorption ils sont transportés par la veine porte vers le foie, ce dernier qui présente une forte concentration en sites de liaison et en enzymes de métabolisation des xénobiotiques (principalement les cytochromes P-450) rend la plupart de ces toxiques moins actifs et plus hydrosolubles, et ainsi plus facilement excrétables (Frank, 1992).

En effet l'accumulation des graisses sous forme de vacuoles de lipides à l'intérieur des hépatocytes est la cause principale de survenu de stéatose. Cette accumulation peut être la conséquence de plusieurs mécanismes : l'inhibition de la synthèse de la moitié protéique des lipoprotéines, diminution de l'oxydation des lipides par les mitochondries, inhibition de la synthèse des phospholipides, constituants essentiels des VLDL (Frank, 1992). Parfois les atteintes hépatiques peuvent prendre différents aspects surtout une choléstase liée à la diminution ou à l'arrêt de la sécrétion biliaire (Davern, 2007 ; Larrey, 2008), l'agent choléstatique semble agir par différents mécanismes; par inhibition des transporteurs qui participent à la formation de la bile ou bien par atteinte des jonctions serrées et diminution de la contractilité. En conséquence il en résulte une augmentation du taux sanguins des composés excrétés normalement dans la bile : bilirubine conjuguée, acides et sels biliaires, avec des selles pâles et blanchâtres, et un Ictère (Frank, 1992). De nombreux produits chimiques sont la cause de nécrose hépatique par leurs métabolites réactifs qui se lient avec les macromolécules de la cellule (les lipides, les protéines et les glucides). La nécrose peut être focale (centrolobulaire, médiane ou périphérique) ou généralisée et elle est impliquée dans la mort des hépatocytes par la rupture de la membrane plasmique (Jacques, 2006).

On peut, en effet, observer parfois des lésions inflammatoires prolongées des hépatocytes, elles sont caractérisées par la présence d'infiltrations de collagène dans la masse hépatique. Séparés par ses couches fibreuses, les amas d'hépatocytes apparaissent sous forme de nodules (Frank, 1992) : c'est la cirrhose. L'évolution peut être plus insidieuse avec apparition progressive de tumeurs qui sont soit bénignes, soit malignes. Les différents types de ses tumeurs dépendent de l'origine de la lésion, Les plus courantes: les hépatocarcinomes, angiosarcomes et l'adénome hépatocellulaire (Henri, 2007).

L'atteinte hépatique provoquée par les médicaments a un aspect polymorphe (Frank, 1992), avant de parler du mécanisme d'hépatotoxicité des médicaments, il est indispensable de connaître les principaux étapes du métabolisme des médicaments.

Pour avoir un effet thérapeutique, la majorité des médicaments, doivent être transformés en métabolites actifs grâce à une biotransformation hépatique (Dellale, 2006). Celle-ci se déroule en deux phases avant d'être éliminé par voie biliaire ou urinaire (Larrey, 2009). Il s'agit d'abord d'une oxydation au niveau du réticulum endoplasmique lisse par des complexes enzymatiques, les cytochromes P450 (CYP). De nombreux médicaments sont capables d'augmenter ou d'inhiber ce système enzymatique et de modifier par là l'activité de biotransformation. Cette induction aboutit le plus souvent à une inactivation du médicament mais parfois apparaissent des métabolites instables particulièrement réactifs. Par ailleurs, en cas d'insuffisance hépatocellulaire, l'activité des cytochromes P450 est fortement réduite. La deuxième phase est une conjugaison, qui aboutit à des composés éliminés dans la bile. La fixation des métabolites réactifs sur le glutathion est un système de défense très efficace permettant la neutralisation des métabolites instables (Frexinos *et al.*, 2003).

Dans les circonstances normales, la toxicité potentielle du métabolite réactif est limitée par la conjugaison avec le glutathion, cette fixation permet son inactivation. Lorsqu'il existe une hyperproduction de métabolites réactifs, sous l'effet d'une induction enzymatique ou une déplétion du glutathion, les défenses vont être dépassées entraînant alors une nécrose, ou en déclenchant des réactions immunologiques (Geubel, 2002). Deux cas différents peuvent alors se présenter ; dans le premier cas le métabolite réactif entraîne une immunisation, l'hépatite est rare, imprévisible et non reproductible chez l'animal et sans rapport avec la dose (Fromenty, 2010). Dans le deuxième cas le métabolite réactif est lui-même directement toxique, l'hépatite est prévisible, liée à la dose et reproductible chez l'animal. Elle apparaît quand, après fixation du métabolite réactif sur le glutathion disponible, les concentrations hépatiques de ce protecteur physiologique s'effondrent. Le métabolite réactif va alors se fixer massivement sur les macromolécules intracellulaires (protéines, lipides et acides nucléiques) (Mégarbane, 2007).

I.2. Intoxication hépatique induite par le paracétamol

Plus de 1100 médicaments ont été référencés comme potentiellement hépatotoxiques ; le paracétamol est le médicament le plus souvent mis en cause en cas de survenue d'hépatite (Frexinos *et al.*, 2003).

Le paracétamol, aussi appelé acétaminophène ; est un antalgique, antipyrétique efficace pour soulager la douleur légère ou modérée (Dargan *et al.*, 2002). Cependant, que ce soit une surdose accidentelle ou délibérée elle peut provoquer une hépatotoxicité, celle-ci est actuellement la cause la plus importante pour les dommages hépatiques aigus et la mort (Bjornsson *et al.*, 2006). Son effet thérapeutique est l'inhibition de la cyclo-oxygénase (COX-2) et des prostaglandines-h-synthétase 1 et 2 dans les cellules endothéliales et les neurones (Bizovi et Smilkstein, 2002 ; Gonzalez, 2007).

I.2.1. Métabolisme du paracétamol

Le paracétamol est activement métabolisé au niveau du foie sous l'influence du système enzymatique microsomial (Hammond *et al.*, 1981). Les deux voies hépatiques majeures du catabolisme de paracétamol sont: la glycuco-conjugaison qui représente de 50% à deux tiers du métabolisme du paracétamol, et la sulfo-conjugaison (sulfatation) qui représente 20-40% du métabolisme du paracétamol (Aronoff *et al.*, 2006).

Ces deux voies conduisent à des métabolites inactifs, non toxiques qui sont éliminés par voie urinaire en 24 heures, ces derniers possèdent une demi-vie plasmatique de 4 à 5 heures et de 8 à 10 heures. Une autre forme mineure (<5 %), catalysée par le cytochrome P-450 (essentiellement la CYP2E1, 1A2, 3A4 et 2D6) (Dong, 2000), conduit à la formation d'un métabolite réactif instable, le N-acétyl-p-benzoquinone-imine (NAPQI) qui est rapidement détoxifié par le glutathion réduit et éliminé dans les urines après conjugaison à la cystéine et à l'acide mercapturique (Poletti, 1996 ; Graham and Scott, 2005). En cas de surdosage massif cette réaction devient importante et induit une déplétion en glutathion à l'origine d'un stress oxydatif pouvant entraîner une nécrose centrolobulaire hépatique. La toxicité hépatique impliquerait également une production de peroxy-nitrites à l'origine d'un stress nitrosant (Knight, 2003).

I.2.2. Mécanisme d'hépatotoxicité du paracétamol

Le paracétamol est hépatotoxique en fonction de la dose (Lee, 2003). Il n'est pas toxique par lui-même, la lésion cellulaire est le fait de son métabolite instable (NAPQI) qui normalement n'est présent qu'en quantité minime, est rapidement conjugué par le glutathion et ainsi détoxiqué. Si la métabolisation oxydative augmente la réserve de glutathion diminue avec une baisse de 70 à 80 %, le métabolite réactif peut devenir hépatotoxique. L'étape initiale et irréversible de la lésion cellulaire est la liaison covalente de la NAPQI aux protéines cellulaires (adductions) avec pour conséquence la modification de leur structures et de leur fonctions (Katrine, 2010).

La condition de la progression de la toxicité est la succession des événements suivants: dysfonction cellulaire avec perturbation de l'homéostasie du calcium, perte d'ATP, œdème cellulaire, production de radicaux réactifs (ROS) et dénitrotyrosine avec peroxydation lipidique, puis survient une perméabilité accrue des mitochondries aux petits ions et molécules (mitochondrial perméabilité transition) qui entraîne une nécrose et une hépatite cytolitique (Prescott, 1977). La cascade de l'inflammation est parallèlement ouverte, de grandes quantités de cytokines pro- (par exemple TNF-alpha) et anti-inflammatoires sont

sécrétées et les mécanismes de phagocytose sont stimulés. Ces cytokines activent le recrutement des cellules de l'inflammation et induisent une augmentation du stress oxydatif (Blazka, 1996).

I.2.3. Les symptômes de l'intoxication

On peut diviser l'évolution de l'intoxication en quatre phases ; dans les premières 24 heures qui suivent l'overdose, la symptomatologie commence avec de légers maux d'origine digestive, comme la perte d'appétit, des nausées, des vomissements, une pâleur, et des douleurs dans la partie supérieure de l'abdomen.

Après les 24 h, on peut détecter les indices d'une lésion hépatique grâce à un bilan enzymatique ; on observe une forte élévation des amino-transférases ASAT, ALAT, traduisant une nécrose des cellules hépatiques, une diminution de facteurs de coagulation, ce qui augmente le temps de prothrombine, et une augmentation de bilirubinémie.

Vers le 3^e et 4^e jour, on décrit un ictère, une acidose métabolique, une hypoglycémie, des hémorragies et une encéphalopathie hépatique.

Après le 5^e jour, les fonctions hépatiques sont soit rétablies soit il y a eu apparition de nécroses hépatiques et dans les cas graves, des convulsions, des défaillances cardiovasculaires, une dépression respiratoire puis la mort dans un tableau de coma hépatique peuvent survenir (Reichel et al, 2004).

I. 3. Stress oxydatif

Dans l'organisme, la production des radicaux libres est contrôlée par les systèmes de défenses. En conditions normales, on assiste à un équilibre de la balance antioxydants/prooxydants (Favier, 2003), une fois cet équilibre est affecté par une augmentation de la production d'oxydants ou par une altération du système antioxydant, on assiste alors ce qu'on appelle « stress oxydatif » (Lahouel, 2004 ; Boutabet, 2007).

Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire ; ils peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant d'une manière irréversible les principaux constituants des cellules de l'organisme (Anisio, 2005).

En outre, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l'organisme. Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène (radicaux libres primaires) tel que : l'anion superoxyde (O_2°), radical hydroxyle (OH°), monoxyde d'azote (NO°), radical peroxyde (ROO°), radical alkoxyde (RO°) (Yoshikawa *et al.*, 2000). Mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs (Myara, 2002) et même toxiques tel que l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le nitroperoxyde (ONOOH), le peroxydinitrite (ONOO $^-$), et le hypochlorite ($^{\circ}OCl$) (Mercan, 2010).

I.3.1. Les sources des ROS

Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux ROS par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leurs métabolismes normales et parfois en réponse à un stimuli spécifique. La source principale de ce radical est la chaîne de transport d'électrons mitochondrial (Bartosz, 2003 ; Chiarugi et Fiaschi, 2007). La NADPH oxydase, la lipoxygénase, le cytochrome P450, et la xanthine oxydase, enzymes se trouvent particulièrement dans le foie (Madi, 2010). Les ions métalliques présents dans l'organisme (fer, cuivre...) peuvent coopérer avec des espèces moins réactives pour produire des radicaux hydroxyles (Servais 2002 ; Boutabet 2007).

D'autre part, les ROS sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, la consommation du tabac, d'alcool, la contamination par les métaux-toxiques et l'utilisation des herbicides (Pincemail *et al*, 2002 ; Sorg, 2004 ; Kocchilin, 2006) ou encore, l'utilisation des médicaments dont leurs structures peuvent jouer le rôle d'accepteur et donneur d'électron, l'exposition prolongée au soleil, et l'effort intense. Toutes ces situations provoquent une surproduction des ROS dans l'organisme (Fuorocci, 2006).

I.3.2. Système de défense antioxydant

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ROS est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher leur oxydation (Berger, 2006), les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et non enzymatiques (Packer *et al.*, 1997 ; Mates *et al.*, 1999 ; Powers et Lennon, 1999 ; Droge ,2002)

Les systèmes enzymatiques ; il s'agit principalement de trois enzymes, le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

les superoxydes dismutases(SOD) : Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, ce dernier, étant beaucoup moins réactif (Moumen *et al.*, 1997), il existe plusieurs isoenzymes de SOD, qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leurs contenus métalliques, leurs structures quaternaires et leurs localisations cellulaires (Zelko *et al.*, 2002) ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) forme cytosolique, SOD à manganèse forme mitochondriale (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001 ; Sturtz *et al.*, 2001).

La glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR) sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries, la glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 , lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Mates *et al.*, 1999 ; Powers et Lennon, 1999). La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électron.

La catalase est présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques (Sorg, 2004). C'est une enzyme tétraédrique, dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH, elle agit en synergie avec la SOD ; elle catabolise les peroxydes d'hydrogène en molécules d'eau et en oxygène moléculaire (Matés *et al.*, 1999).

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart des composants du système non enzymatique sont soit endogènes synthétisés par l'organisme soit exogènes et doivent être apportés par l'alimentation (Ozsoy *et al.*, 2009), ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances synthétisées par les cellules parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, et l'acide lipoïque (Favier, 2003). La bilirubine capable de piéger les radicaux peroxy et l'oxygène singulet, protège ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^+ permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (Martínez-Cayuela, 1995).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant les électrons non appariés, les transformant ainsi en molécules stables (Pincemail *et al.*, 2002 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006). La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (Pincemail *et al.*, 2002). Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols, les huiles essentielles (Bruneton, 2009) et les flavonoïdes apportés également par l'alimentation (Pietta, 2000 ; Cotelle, 2001), jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I.3.3. Les cibles biologiques du stress oxydant

Les ROS interagissent avec toute une série de substrats biologiques, dont les cibles les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell et Whiteman 2004; Valko *et al.*, 2006) conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme.

Les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée des ROS en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. Ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et subcellulaires ainsi que les lipoprotéines. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs (Hong *et al.*, 2004). Les produits d'oxydation ainsi formés peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi, et surtout, se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires : perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires, libération du matériel à partir du compartiment subcellulaire (Beckman et Ames, 1998 ; Lehucher-Michel, 2001). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbituriques (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) représentant les produits les plus toxiques et ils sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Cadet *et al.*, 2002).

Les acides aminés des protéines sont aussi susceptibles d'être oxydés soit sous l'action des radicaux libres oxygénés, soit en présence de métaux de transition (Stadtman, 1990 ; 1993). Cette oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles ou carbonyles sur la protéine (Martinez-Cayuella, 1995; Lehucher-Michel *et al.*, 2001; Levine, 2002; Valko *et al.*, 2007). Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation des protéines, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation des liaisons croisées entre deux protéines (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2001). Ces modifications peuvent conduire à la perte de leurs propriétés biologiques. Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Jung *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les acides nucléiques, les dommages médiés par le stress oxydant sont de cinq types ; l'oxydation des bases, la formation des sites abasiques, d'adduits intracaténaux, des cassures des brins et des pontages ADN- protéine (Cadet *et al.*, 2002). En effet la guanine est la cible privilégiée de nombreux oxydants tels que l' OH^\bullet et le peroxydant (Cadet, 1999). La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OH-dG) qui est normalement éliminé par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres. Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Favier, 2003 ; Valko *et al.*, 2006).

L'accumulation des ROS a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles. En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail *et al.*, 2002) : l'athérosclérose, les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives, le diabète et le cancer (Sorg, 2004).

I.4. Quelques sources de substances antioxydantes

I.4.1. Les composés phénoliques (polyphénols)

Les polyphénols sont des substances hydrosolubles issus du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués, ils possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxyle (COOH)...) (Bahorun, 1997), ils peuvent aller de molécules simples comme les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés, comme les tanins (Hagerman, 1989 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Dans cette famille de molécules phénoliques, se trouvent de nombreuses substances, qui sont classés selon leurs structures en plusieurs classes ; les flavonoïdes, les tanins, les lignanes, les stilbènes, les coumarines et les acides phénoliques (Maarouf, 2000; Hopkins, 2003; Georgé *et al.*, 2005), dont on cite :

Premièrement, les acides phénoliques qui ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et se divisent en deux catégories : les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque (exemple: acide gallique) (Haslam, 1994) et les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (exemple: acide caféique) (Haslam, 1994 ; Bruneton, 2009).

De plus, les flavonoïdes qui occupent une place prépondérante dans le groupe des phénols (Ihuillier, 2007). Les flavonoïdes identifiées jusqu'à maintenant sont de 4000 composés; ces pigments sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles aussi sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (Hadi, 2004). Ces molécules ont un poids moléculaire faible, constituées de 15 atomes de carbones arrangés comme suit : C6-C3-C6, elles sont composées de deux noyaux aromatiques A et B, liés par un pont de 3 carbones souvent sous forme d'un hétérocycle (Nagendran, 2006). Les substitutions variées au sein de l'hétérocycle C donnent les différentes sous classes des flavonoides : Flavonols (quercétine, kaempférol...), Flavones (apigénine, lutéoline...), Flavanones (naringine...), isoflavones (génistéine...), anthocyanidines (alpha tocophérol, malvidine..) (Sarni et Cheymer, 2006).

Les flavones, et les flavonols sont les plus connus grâce à leur pouvoir antioxydant élevé, et les plus divers sur le plan structural. Les substitutions touchant les noyaux A ou B qui peuvent parvenir dans chaque classe des flavonoides sont : une oxydation, alkylation, glycosylation, acylation, et sulfation.

Le 3^{ème} groupe important des composés phénoliques, les tanins qui ont un poids moléculaire relativement élevé, ils possèdent deux sous groupes; les tanins hydrolysables et les tannins condensés. Les premiers sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose. Les derniers sont des polymères de polyhydroxyflavan 3-ol monomères (aussi connu proanthocyanidine) (Sarni et Cheymer, 2006).

I.4.1.1. Propriétés biologiques des polyphénols

La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants (Pietta, 2002 ; Frei et Higdon, 2003) et plus particulièrement les acides

phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant, ces composants peuvent intervenir en captant directement les radicaux libres, ou inhibant les enzymes responsables de la génération des ROS ou en captant les cations métalliques (Oszmianski *et al.*, 2007).

Des recherches récentes ont démontré aussi que les flavonoïdes, notamment les flavonols, possèdent des propriétés anti-inflammatoires, ils peuvent prévenir la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est déclencheur chimique de l'inflammation (Lahlah, 2008), d'autres études affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes, plus particulièrement la lutéoline, l'apigénine, catéchine sur la cyclo-oxygénase enzyme synthétiques des molécules impliquées fortement dans le processus inflammatoire (Gérotti, 2006).

De plus, la consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaires (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Yamanaka, 1996) évitant ainsi l'athérosclérose. Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères (Rein *et al.*, 2000).

Les polyphénols montrent d'autres activités biologiques : anticancéreuses, antiathérogènes, analgésiques, antibactériennes, antivirales (Babar *et al.*, 2007), antiallergènes vasodilatatrices (Falleh *et al.*, 2008).

I.4.2. *Centaurea fragilis*

C'est une plante annuelle buissonnante, longuement sarmenteuse, fragile et glabrescente caractérisées par des feuilles plus au moins grasses, pinnatilobées à lobes sinués et profonds, amplement auriculées. Le Capitule est petit (1-1,5 cm de largeur sur 2 de long). Les akènes sont assez grosses, jaunâtres ou brunâtres, un peu pubescents à aigrette minuscule (faisant 1/2 à 1/10^e du corps de l'akène). Les appendices des bractées comportant en général cinq épines faibles et de couleur très foncée par rapport au corps de la bractée. Elle vie a coté des dunes, des rochers et des broussailles (Quézel et Santa, 1963). Leur systématique est représentée dans le tableau 1.

Tableau 1. Classification de *Centaurea fragilis* (Guignard et Dupont, 2004)

Règne	Végétale
Embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astrales
Famille	Astéracée
Sous-famille	Tubuliflores
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèce	<i>Centaurea fragilis</i>

Le genre *Centaurea* fait partie de la famille des astéracées qui compte environ 700 espèces. En Algérie, il est représenté par 45 espèces dont 7 au sud (Mitaine-Offer *et al.*, 2003). Les centaurees sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternes (Dittrich, 1977 ; Wagenitz et Hellwig, 1996 ; Bancheva et Greilhuber, 2006). Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitules tubulés multiflores homomorphes ou dimorphes, celles de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Leurs couleurs varient le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes (Quezel et Santa, 1963). Comme il est montré dans la figure 1.



Figure 1. Image de la plante *centaurea fragilis*. L'image de *Centaurea fragilis* prise à partir de son environnement naturel, en mois d'avril 2012 dans la région d'Ouled Bounnar wilaya de Jijel.

Ces fleurs entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées et inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Les bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses, leur observation est essentielle pour déterminer les espèces (André et Ferrez, 2003). Le réceptacle plan ou sub-plan est garni de soies abondantes, les fruits sont des akènes longues ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque (Quezel et Santa, 1963).

I.4.2.1. Composition chimique et activités biologiques

Les espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités stimulantes, toniques (Kupchan et Bauerschmidt, 1971), antidiabétiques (Gottlieb et Mors, 1980) diurétiques (Roberta et Schaffer, 1953) et antirhumatismales (Kusano *et al.*, 1973). Des tests de recherche d'activité biologique des extraits chloroformes des espèces

algériennes *C. musimomum*, *C. furfuracea*, *C. granata* et *C. maroccana* ont montré des activités cytotoxiques et antiparasitaires (Flamini *et al.*, 2001).

Les études chimiques des espèces du genre *Centaurea* ont montré leurs richesses en, sesquiterpènes (Kadriya *et al.*, 2003), stéroïdes (Ahmed, 1971), alcaloïdes (Kurmaz, 1962), lactones sesquiterpènes (Bohlman, 1973 ; Chritensen, 1991) et en composés phénoliques notamment les flavonoïdes (Kamanzi, 1982 ; Akkal, 1997). Ces derniers sont largement présents dans le règne végétal et représentent une catégorie très importante aux propriétés biologiques multiples.

Le tableau (2) résume la composition chimique et les propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Centaurea*.

Tableau 2. Composition chimique et activité biologique de quelques espèces du genre *Centaurea*

Texan	Composition chimique	Référence	Activités biologique	Référence
<i>C. solstitialis</i>	Sesquiterpènes laconiques : Chlorohyssopifolin A B-chlorojanerin 13-acetyle solstitialin A	Özçelik <i>et al.</i> , (2009)	antiulcérrogène antivirale antimicrobiens antinociceptive antipyrétique	Yesilada <i>et al.</i> , (2004)
<i>C. grisebachii</i> <i>ssp</i> <i>grisebachii</i>	10 sesquiterpènes lactoniques, le sesquiterpène majeur est l'eudesmanolide 4-epi-maladacitenolide 5 flavonoïdes, 2 lignant de types dibenzylbutyrolactone 1 nor-isoprénoïde et 1 stéroïdes	Djeddi <i>et al.</i> , (2007)	Antifongique digestive apéritive	Tesevic <i>et al.</i> , (2007)
<i>C. cyanus</i>	Flavonoïdes, chicine, un amer, anthocyanosides et composés acétyliques.	Iserin, (2001)	Anti-diarrhéique Antipyrétique Cardiotonique Anti-inflammatoire immunologique	Asadipour <i>et al.</i> , (2005)
<i>C. calcitrapa</i>	6 flavonoïdes, un sesquiterpène lactone : cnicine ; 3 flavonoïdes aglycones	Karamenderes <i>et al.</i> , (2007)	Antipyrétique	Yayli <i>et al.</i> , (2004)



Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

Les différents produits chimiques utilisés au cours des expériences réalisées dans notre travail ont été fournis par SIENTILABO.

Le matériel végétal est constitué des racines de la plante *Centaurea fragilis* récoltée au mois d'avril 2012 dans la région d'Ouled Bounnar (wilaya de Jijel).

Les expériences ont été faites sur des rats femelles *Wistar albinos* provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, pesant entre 70 – 210 g. Les animaux ont été répartis en groupes dans des cages standards, à température ambiante avec libre accès à l'eau et à la nourriture (croquette).

II.2. Préparation et caractérisation des extraits bruts de la plante *Centaurea fragilis*

Après élimination des parties mortes et lavage, les racines ont été découpées en petites rondelles et laissées sécher à l'abri de la lumière pendant une semaine dans un endroit sec et bien aéré, les racines sèches ainsi obtenues ont été broyées à l'aide d'un moulin à café pour obtenir une poudre fine qui va servir à l'extraction (Shine *et al.*, 2009). Le broyat obtenu a été soumis à des extractions à froid en utilisant deux solvants, l'eau distillée et le méthanol 80 %, selon la méthode de Mathew *et al.*, (2011) .

Une macération aqueuse a été effectuée sur 40 g de poudre avec 444 ml d'eau distillée, le mélange a été soumis à une agitation continue pendant 72 heures à l'aide d'un agitateur magnétique. Le macérât est filtré chaque jour à l'aide d'un papier Wathman avec renouvellement du solvant. Les filtrats sont soumis à une évaporation à basse pression à 45°C puis lyophilisés.

Concernant l'extraction méthanolique, 40 g de poudre a été extrait avec 444 ml du méthanol 80 % et placés sous agitation continue pendant 72 heures. Après filtrations sur papier Wathman, les filtrats ont été évaporés sous vide à sec en utilisant le rota vapeur à une température de 45°C.

II.3. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin Ciocalteu selon la méthode citée par (Othman *et al.* , 2007). Cette technique est basée sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline, c'est une réaction d'oxydoréduction au cours de laquelle, la fonction OH des phénols est oxydée pendant que le FCR est réduit (Vuorela *et al.*, 2005) . Le réactif de folin-Ciocalteu de couleur jaune vire au bleu en solution après la réaction avec les composés phénoliques totaux.

Dans chaque tube à essai ont été ajoutés 200 µl de l'échantillon à doser et 1.5 ml de réactif de folin-Ciocalteu (diluée à 1/10^{ème}). Après 5 minutes, 1.5 ml de carbonate de sodium (7 %) est ajouté. Après agitation, les différentes solutions ont été laissées au repos, à l'abri de la lumière pendant 2 heures. La lecture est faite à 750 nm contre un blanc constitué d'un mélange de 1ml de FCR et 1 ml de carbonate de sodium, on utilise comme référence une gamme étalon préparée à partir d'une solution mère de l'acide gallique à 100

$\mu\text{g/ml}$, avec différentes concentrations, trois essais ont été réalisés pour chaque extrait et la teneur moyenne en polyphénols totaux a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par g d'extrait brut.

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans nos extraits a été réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Djeridane *et al.*, 2006).

Le principe de ce dosage repose sur la propriété de ces composés à chélater les ions aluminium. La couleur jaune obtenue est le résultat de formation du complexe entre AlCl_3 et les flavonoïdes, cette couleur est traduite par le fait que l'Al a perdu deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électron (Gayon, 1968), dont l'intensité de la couleur varie en fonction de la concentration des flavonoïdes de chaque extrait de la plante.

Un volume de 1 ml de chaque extrait a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2 %). Les différentes solutions ont été laissées au repos, à l'abri de la lumière pendant 30 min. La lecture a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre à 430 nm contre un blanc constitué d'un mélange de 1 ml d'eau distillée et 1 ml d' AlCl_3 à 2 %. La concentration en flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=a x+b$) réalisé par un standard étalon la quercétine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon, trois essais ont été réalisés pour chaque extrait, les résultats sont exprimés en mg équivalent de la quercétine par g d'extrait brut.

II.4. Analyse de l'extrait aqueux et méthanolique par CG-MS

Une analyse qualitative par CG-MS des deux extraits méthanolique et aqueux de *Centaurea fragilis* a été faite ; les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Shumadzu (2010).

Le principe de cette méthode consiste à fragmenter l'échantillon à analyser entre deux phases, l'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément répartis sous forme de pellicules minces sur un solide inerte de grande surface spécifique. Tandis que, l'autre phase est un gaz mobile qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire.

1 μl des deux extraits a été injecté dans l'appareil avec un détecteur et un gaz vecteur de l'hélium, et soumis à une température progressive de 100 à 310° C selon Bankova *et al.* (2007).

II.5. La mise en évidence de l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux et méthanolique par le test de DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des deux extraits, nous avons opté pour la méthode de DPPH (2,2diphényl picryl-hydrayl), (radical libre relativement stable), selon le protocole décrit par Markowicz-Bastos *et al.* (2007). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se traduit en diphényl picryl-hydrazine de couleur jaune mesurable à 517 nm (Maataoui *et al.*, 2006).

15 μL des solutions d'extraits ou standards (vitamine C) sont ajoutés à 1.5 ml DPPH (100 μM), le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport

au contrôle contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon}}) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Où ;

% : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

Abs_{contrôle} : Absorbance de contrôle ;

Abs_{échantillon} : Absorbance de l'échantillon ;

II.6. La recherche de l'effet protecteur et antioxydant de l'extrait méthanolique de la plante *Centaurea fragilis* contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol

Pour étudier l'effet protecteur de la plante *Centaurea fragilis*, on a utilisé le modèle de paracétamol pour l'induction de l'hépatotoxicité on utilisant la méthode décrite par Lahouel *et al.* (2004). Les animaux ont été répartis en cinq groupes de quatre animaux :

Le 1^{er} lot, témoin non traité reçoit par gavage de l'eau distillée ;

Le 2^{ème} lot, traité par le paracétamol, reçoit par gavage une dose de paracétamol en solution à 200 mg/kg) (2/3 DL 50) ; pendant trois jours ;

Le 3^{ème} lot, traité par la plante, reçoit par gavage une dose d'extrait méthanolique de la plante *Centaurea fragilis* à 200 mg/kg, pendant sept jours ;

Le 4^{ème} lot, (préventif) reçoit deux doses par gavage, la première de l'extrait méthanolique de la plante *Centaurea fragilis* à la dose de 200 mg/kg, pendant 7 jours, suivie du paracétamol ;

Le 5^{ème} lot, (curatif) reçoit deux doses, une du paracétamol à la dose de 200 mg/kg pendant 3 jours, suivie d'une dose de 200 mg/kg de l'extrait méthanolique de la plante *Centaurea fragilis* pendant 7 jours.

Au 11^{ème} jour, 24 heures à la fin du traitement, le prélèvement sanguin est réalisé par ponction au niveau du sinus rétro-orbital de l'œil, le sang est collecté dans des tubes secs puis centrifugé à 3000 rpm à 4° C pendant 10 min pour récupérer le sérum. Par la suite, les animaux ont été sacrifiés sous anesthésie en utilisant l'éther. Le foie de chaque rat a été prélevé à l'aide d'un ciseau, lavé avec de l'eau physiologique et divisé en plusieurs fractions qui servent aux dosages biochimiques, puis conservé.

L'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol nécessite l'analyse de plusieurs paramètres sériques et tissulaires.

II.6.1. Dosage sérique des biomarqueurs hépatiques

L'évaluation de la variation du taux des paramètres sériques a été réalisée à l'aide d'un automate (PHD Diam S 2300+) en utilisant des kits (Biomaghreb pour le dosage de la PAL, Spinreact pour les dosages (ASAT, ALAT), Biuret pour le dosage des protéines. Ces

dosages ont été réalisés au laboratoire central de l'hôpital Mohamed Sadik Ben Yahia (Jijel).

II.6.2. Dosage des paramètres du stress oxydatif au niveau hépatique

Pour évaluer l'effet antioxydant de *Centaurea fragilis* au niveau hépatique, une analyse biochimique des paramètres du stress a été réalisée en évaluant les taux de la peroxydation lipidique, les variations des activités enzymatiques (GST, CAT) et non enzymatiques (GSH).

L'évaluation des activités de GST, CAT et GSH nécessite la réalisation d'un dosage des protéines en utilisant la méthode de Bradford (1976). Cette méthode mesure la concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le bleu de comassie G 250 qui se lie avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant la concentration en protéines dans l'échantillon.

100 µl de la fraction cytosolique du foie diluée à 1/5^{ème} avec de l'eau distillée sont ajoutés à 4 ml du réactif de Bradford (BBC). Après agitation au vortex, le mélange est incubé 5 min à température ambiante. La lecture des absorbances est effectuée à 595 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV -Visible, la concentration en protéine de l'échantillon nécessite l'élaboration d'une gamme d'étalonnage de protéine standard réalisée dans les mêmes conditions avec des échantillons d'albumine sérique bovine (BSA) de concentration connus.

II.6.2.1 Dosage des taux cytosoliques hépatiques du MDA et du GSH

Le taux du MDA est évalué par la méthode de d'Okhawa *et al.* (1979), pour ce dosage nous avons utilisé 1g du foie additionné à 3 volumes de solution Kcl (1.15 M), puis broyé par un homogénéisateur de DOUNCE. A 0.5 ml de l'homogénat, nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100 C° pendant 15 min, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 min à 3000 rpm/min, la densité optique à 530 nm est déterminée dans le surnageant. Le taux de MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions que les échantillons avec de 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane. Les résultats sont est exprimés en nmole/g de foie.

Le dosage du GSH est basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5' -Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm. Pour cela, 1 g de foie est coupé et homogénéisé avec 3 volumes de TCA 5 % à l'aide d'un broyeur de DOUNCE puis centrifugé à 2000 rpm. Ensuite, 50 µl de surnageant sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate 0.1 M pH 8. A 3 ml du mélange de dilution, 20 µl de DTNB 0.01 M sont additionnés. Après 15 min d'incubation la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Le taux de GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimés en mmoles/g de foie.

II.6.2.2. Mesure de l'activité de la catalase et de la GST

Avant l'évaluation de l'activité enzymatique de la CAT et la GST, une fraction enzymatique est préparée selon la méthode d'Iqbal et al. (2003) ; 2 g de foie sont coupés et homogénéisés dans 3 volumes de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) contenant du KCl (1.17 %) par un homogénéisateur de Dounce. L'homogénat est centrifugé à 2000 rpm durant 15 min à 4°C et le surnageant obtenu est centrifugé à 9600 rpm durant 30 min à 4°C et le surnageant final représente la source utilisée pour l'évaluation de l'activité des enzymes (CAT, GST).

L'activité de la catalase a été déterminée, en adoptant la méthode de Clairborne (1985). Le principe est basé sur la disparition de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de la source enzymatique à 25 °C. Pour cela, un mélange est constitué de 1 ml du tampon phosphate (0.1 M pH 7.2), 950 µl de H₂O₂ fraîchement préparé 0.019 M, et de 25 µl de la source enzymatique. La lecture de la densité optique est effectuée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'activité enzymatique est exprimée en UI/g de protéine selon la relation suivante :

$$\text{UI/g} = (2.3033/\Delta t) \times (\log A_1/A_2) / \text{g de protéine.}$$

A₁ : absorbance au temps 0 ;

A₂ : Absorbance après 1 mn ;

Δt : Intervalle de temps en mn.

Parallèlement, l'activité de la GST a été évaluée selon la méthode de Habig *et al.* (1974). Un mélange de 850 µl de tampon phosphate 0.1 M pH 6.5 et de 50 µl du chlorodinitrobenzène (CDNB) 20 mM a été préparé et incubé à 37 °C pendant 10 min. La réaction est déclenchée par l'addition à ce mélange de 50 µl d'une solution de glutathion 20 mM et 50 µl de la fraction cytosolique. Un contrôle est préparé dans les mêmes conditions avec le tampon phosphate KH₂PO₄ (0.1 M pH 6.5). L'absorbance est mesurée à 340 nm chaque minute pendant 5 min. Les résultats de l'analyse sont calculés selon la formule ci-dessous, ils sont exprimés en UI/g de protéines.

$$\text{Enzyme (UI/ml)} = [(\Delta \text{DO}_{\text{échantillon}} / \Delta t) * (1/V_t(\text{fd}))] / 9,6(V_e)$$

ΔDO_{échantillon} : Absorbance de l'échantillon à 340nm ;

Δt : Intervalle de temps en mn ;

V_t : volume totale (en millilitres) de l'essai ;

fd: facteur de dilution ;

9,6 : coefficient d'extinction millimolaire du glu-1-chloro-2,4- dinitrobenzène conjugué à 340nm ;

V_e : volume (en millilitre) de l'enzyme utilisé.

II.7. Traitement statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes \pm écart-types. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le test t de Student. La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

$p > 0,05$ = la différence n'est pas significative (ns) ;

$0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative (*) ;

$0,01 > p > 0,001$ = la différence est hautement significative (**);

$p < 0,001$ = la différence est très hautement significative (***) ;

ns = représente un résultat non significatif.





Résultats et discussion

III.1. Caractérisation des extraits aqueux et méthanoliques de *Centaurea fragilis*

Les extraits méthanoliques et aqueux obtenus respectivement après évaporation à sec sous vide et après lyophilisation ont été pesés. Le rendement de ces extraits a été obtenu en calculant le rapport entre la quantité de l'extrait brut obtenu et la quantité initiale de la matière végétale sèche de 40 g. Les détails des résultats d'extraction des deux fractions aqueuse et méthanolique sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3. Résultats de l'extraction aqueuse et méthanolique de *Centaurea fragilis*

Plante	Partie utilisé	Extrait	Rendement	Aspect	Couleur
<i>Centaurea fragilis</i>	Racines	Aqueux	2,55%	Friable	Beige
		Méthanolique	9,67%	Pâteux	Marron caramel

Nous avons obtenu 1,02 g d'extrait aqueux et 3,87 g d'extrait méthanolique donc l'extraction méthanolique donne le rendement le plus élevé.

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leurs modifications chimiques. L'eau, les mélanges aqueux de l'éthanol, du méthanol et de l'acétone sont généralement utilisés pour l'extraction (Turkmen *et al.*, 2007). La solubilité des composés phénoliques est en fonction de leurs degrés de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé. Le méthanol a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (Falleh *et al.*, 2008), car il est le plus efficace et donne généralement le meilleur rendement d'extraction par rapport aux autres solvants (Castanedo-Ovando *et al.*, 2009).

L'extraction solide-liquide utilisée et l'état physique de la plante réduite en poudre, à permis au solvant méthanol 80 % de franchir la barrière de l'interface solide-liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide (matière végétale) et ressortir le soluté (Matière organique) du solide (Ferhat, 2009). La plupart des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion.

Au cours de l'extraction qui se fait principalement sur la solubilisation des métabolites en augmentant la vitesse de solubilisation par l'agitation continue qui garantit l'homogénéité du mélange. Lorsque la concentration des métabolites à l'intérieur des cellules s'équilibre avec celle de l'extérieur, la diffusion des molécules s'arrête d'où l'utilité de changer le solvant de temps en temps jusqu'à l'épuisement de la majorité des substances de la matière végétale.



Le genre *Centaurea* est connu par sa richesse en polyphénols et flavonoïdes (Erel *et al.*, 2011). L'étude quantitative de ces métabolites dans les extraits aqueux et méthanolique de *Centaurea fragilis* a été réalisée par des dosages spectrophotométriques.

Selon les résultats illustrés ci-dessous (figure 2), on remarque que l'espèce de *Centaurea fragilis* est riche en phénols totaux, les teneurs obtenues sont : 8,91 mg EAG/g d'extrait sec aqueux et 25,5 mg EAG/g d'extrait sec méthanolique. On remarque que l'extrait méthanolique contient la teneur la plus élevée en polyphénols.

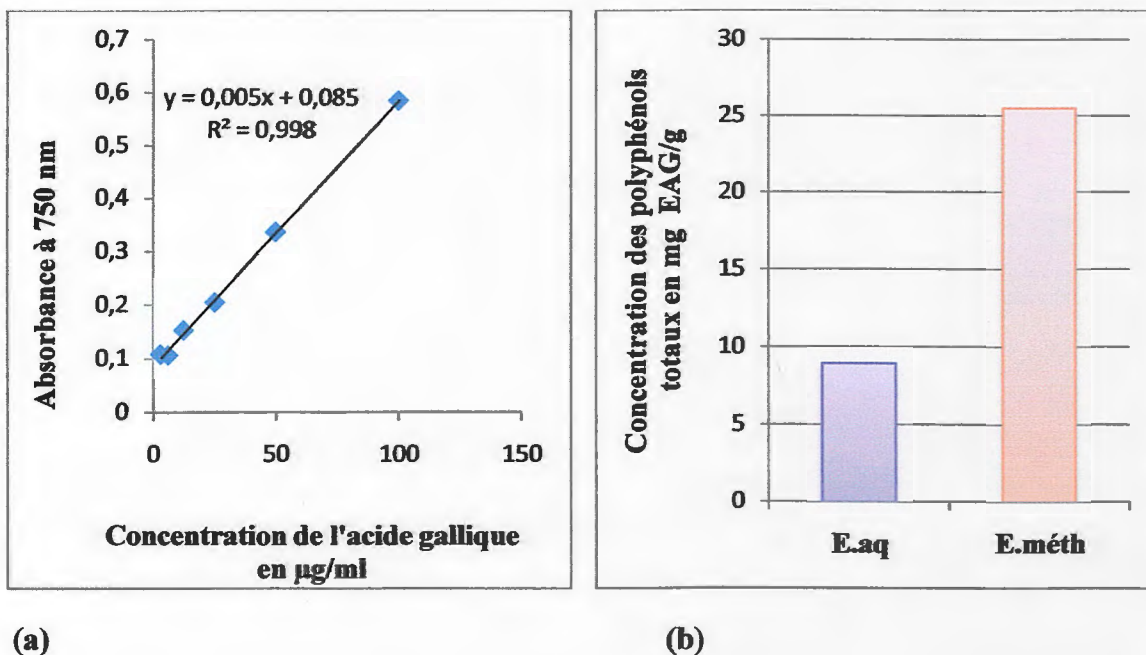


Figure 2. Estimation des concentrations des extraits aqueux et méthanoliques de la plante *Centaurea fragilis* en polyphénols. (a) : courbe d'étalonnage pour la quantification des polyphénols. L'absorbance à 750 nm a été mesurée pour les différentes concentrations de l'acide gallique. (b) : teneurs en polyphénols en mg EAG/g des extraits aqueux et méthanoliques de *Centaurea fragilis*. E.aq : extrait aqueux, E. méth : extrait méthanolique, EAG : équivalent d'acide gallique.

En effet, la teneur des phénols totaux des plantes n'est pas stable et varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre. Elle dépend d'un certains nombres de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (condition climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Podsedeck, 2007 ; Falleh *et al.*, 2008). Le solvant d'extraction a aussi un effet sur la concentration des composés phénoliques dans les extraits (Perez *et al.*, 2007).

En générale, il ya seulement quelques rapports sur le contenu phénolique des espèces *Centaurea*. Ces valeurs sont comparable à ceux rapportées dans la littérature pour d'autre espèces *Centaurea* tels que *C.ammocyanus* (10,9 mg EAG/g) (Alali *et al.*, 2007) et *C.ensifomis* (16,01 mg EAG/g) (Ugur *et al.*, 2009).

les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

Les teneurs en flavonoïde sont exprimés en mg EQ/g d'extrait brut sec, les résultats du dosage quantitatif (figure 3.b) révèlent que l'extrait méthanolique contient 17.58 mg EQ/g d'extrait sec, alors que l'extrait aqueux contient 5.51 mg EQ/g d'extrait sec.

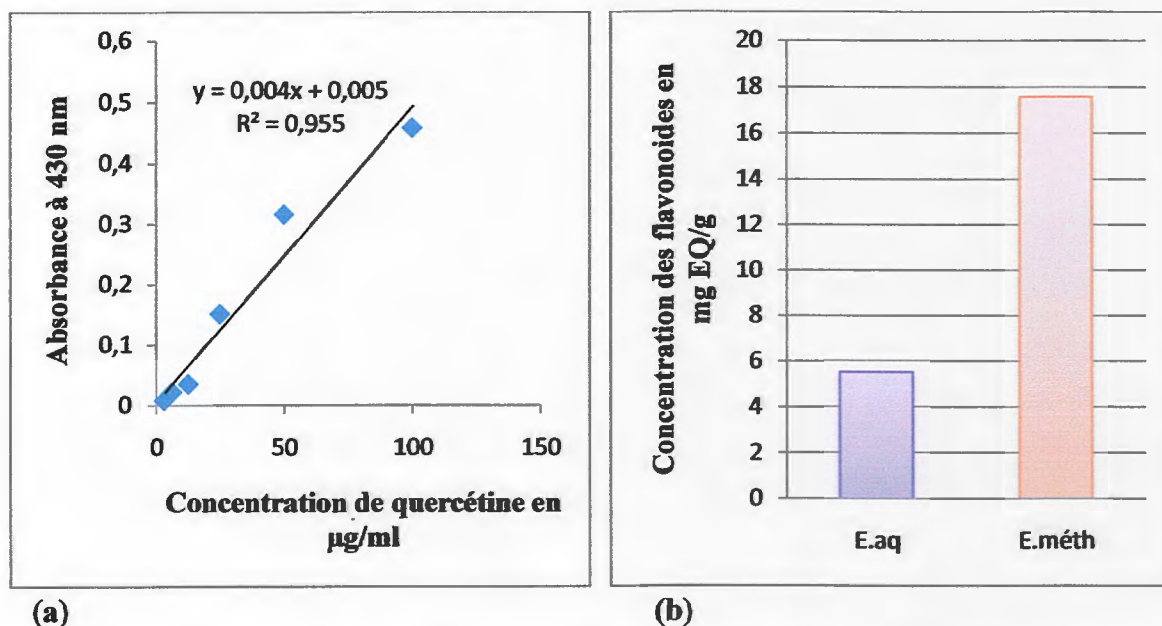
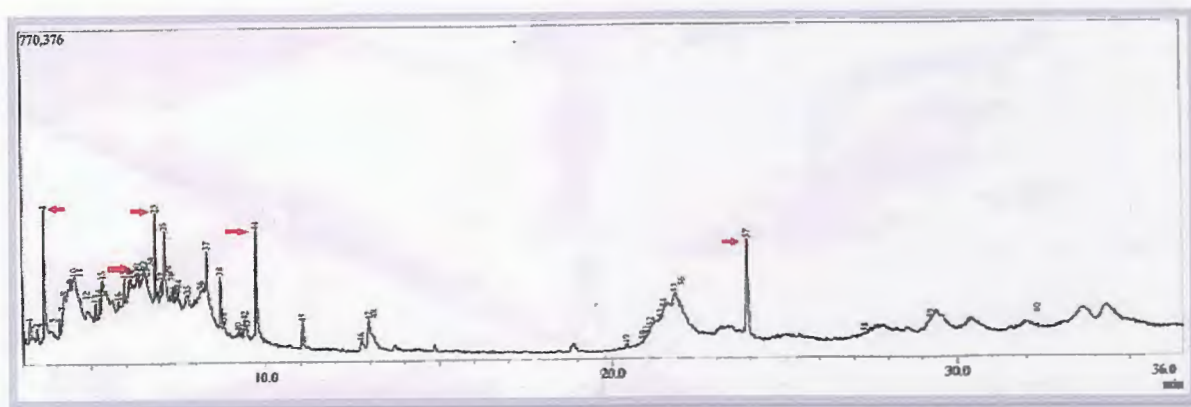


Figure 3. Estimation des concentrations en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanoliques de la plante *Centaurea fragilis*. (a) : courbe d'étalonnage pour la quantification des flavonoïdes. L'absorbance à 430 nm pour les différentes concentrations de quercétine a été mesurée. (b) : Teneur en flavonoïde en mg EQ/g des extraits aqueux et méthanolique de *Centaurea fragilis*. E.aq : extrait aqueux ; E. méth : extrait méthanolique ; EQ : équivalent de la quercétine.

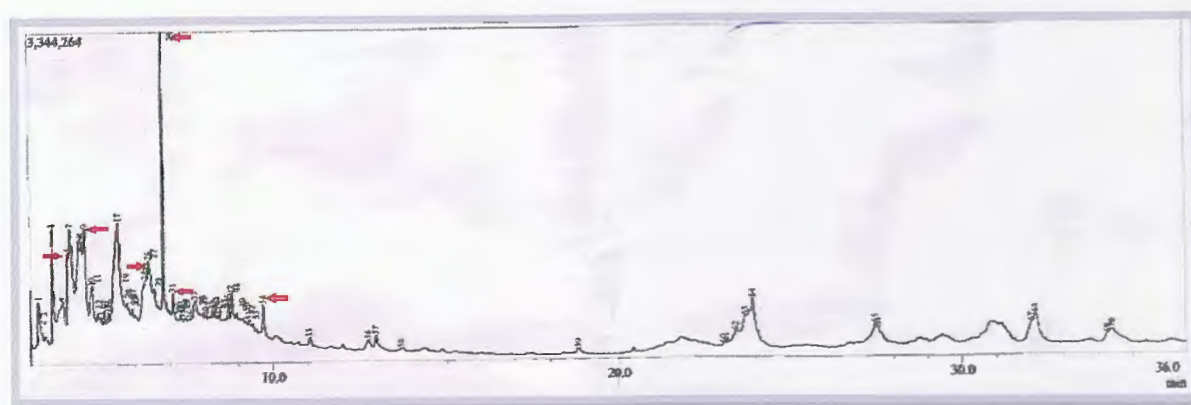
Les études phytochimiques effectuées sur les espèces de genre *Centaurea* ont révélées leurs richesse en composés phénoliques de type flavonoidique (Aktumsek *et al.*, 2011). Djeddi *et al.* (2008) ont isolés 19 métabolites secondaires à partir de *Centaurea grisebachii* dont 5 flavonoïdes et 2 lignanes. Par ailleurs, l'algerianin (un nouveau flavonoïde) et le 4-methoxygossypin ont été isolés par Seghiri (2009) à partir d'une plante existante en Algérie et la Tunisie qui est *Centaurea africana*, Saroglou *et al.* (2005) ont aussi isolés 9 flavonoïdes dont 2 sont nouveaux et ont été identifiés par Gülcemal *et al.* (2010).

Nous avons cherché à caractériser les extraits aqueux et méthanoliques de la plante *Centaurea fragilis* à travers l'analyse de leurs compositions chimiques fines, en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.





(a)



(b)

Figure 4. Analyse de la composition chimique de l'extrait aqueux et méthanolique de *Centaurea fragilis* par CG-MS. (a) : extrait aqueux, (b) : extrait méthanolique .1 μ l de l'extrait aqueux et méthanolique de *Centaurea fragilis* a été injecté dans l'appareil, avec un détecteur et un gaz vecteur de l'hélium, et soumis à une température progressive de 100 à 310 C° selon Bankova et al. (2007). Les pics obtenus sont identifiés en se référant à la bibliothèque NIST et les plus importants sont indiqués dans la figure par des flèches.

Comme le montre la figure 4, nous avons pu détecter plusieurs types de composés chimiques, qui apparaissent dans le chromatogramme selon leurs temps de rétention. L'analyse des pics du chromatogramme a montré que les deux extraits aqueux et méthanolique de *Centaurea fragilis* sont très riches en composés biochimiques avec 70 pics pour l'extrait méthanolique (figure 4.b) et 60 pics pour l'extrait aqueux (figure 4.a).

Tableau 4. Présentation des composés majoritaires dans l'extrait aqueux et méthanolique de *Centaurea fragilis* obtenus par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse.

Type d'extrait	Nom du Composé	N° de pic	Poids Moléculaire (g/mol)	Pourcentage
Extrait méthanolique	[9,12,15 octadecatrien-1-ol,(z-z-z)]	29	264.4461	11,32 %
	pentanoic acid,5-chloro-, ethyl ester	8	164,63	3,95 %
	2-Furancarboxaldehyde,5-(hydroxymethyl)	6	126,12	3,45 %
	1,2-octadecanediol	25	286.4931	2,63 %
	Cyclohexanamine,N-(3-methylbutyl)-	1	169.3070	1,28 %
	L-Ascorbic acid, 2,6-dihexadecanoate	54	652.94	1,25 %
Extrait Aqueux	4H-Pyran-4-one,2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	4	144.1253	8,41 %
	L-Ascorbic acid, 2,6-dihexadecanoate	44	652.94	6,74 %
	[9,12,15 octadecatrien-1-ol,(z-z)]	25	264.4461	6,19 %
	1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyl ester	57	390.62	5,78 %

Les composés majoritaires dans l'extrait méthanolique de cette plante (tableau 4) sont : l'alcool linoléique (9, 12, 15 octadecatrien -1-ol, (z-z-z)) qui occupe (11,31 %) ; le pentanoic acid, 5-chloro-,ethyl ester (3,95 %) ; 2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl) (3,45 %) ; 1,2-octadecanediol(2,63 %) ; le L-Ascorbic acid, 2,6-dihexadecanoate (1,25 %).

Les composés majoritaires dans l'extrait aqueux sont : le 4H-Pyran-4-one,2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-(8,41 %) ; le L-Ascorbic acid, 2,6-dihexadecanoate (6,74 %) ; l'alcool linoléique (9, 12, 15 octadecatrien -1-ol, (z-z-z)) qui occupe (6,19 %) ; le 1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyl ester (5,78 %) ; le 3-Isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5tris (trimethylsiloxy) tetrasiloxane (5,05 %).

On observe qu'il ya 05 composés communs entre l'extrait aqueux et méthanolique qui sont : Cyclohexanamine, N-(3-methylbutyl) ; (9,12,15 octadecatrien-1-ol,(z-z-z)) ; 3-Isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexaméthyl-3,5,5 tris (triméthylsiloxyle) tétrasiloxane ; 1,2-Benzenedicarboxylic acid diisooctyl ester ; L-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate qui a une activité antioxydante .

Dans la méthode de dosage des flavonoïdes, les résultats ont démontré que les deux extraits aqueux et méthanolique de *Centaurea fragilis* sont riches en ces composants biochimiques et lorsque nous avons fait l'analyse par une chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse, on a constaté leurs absences. Cette absence est due à l'utilisation de l'extrait brute directe on aurait peu avoir des résultats avec un extrait plus pure (après affrontement).

Les activités antiradicalaires des deux extraits aqueux et méthanolique de *Centaurea fragilis* et de la vitamine C ont été exprimées en pourcentages (figure 5).

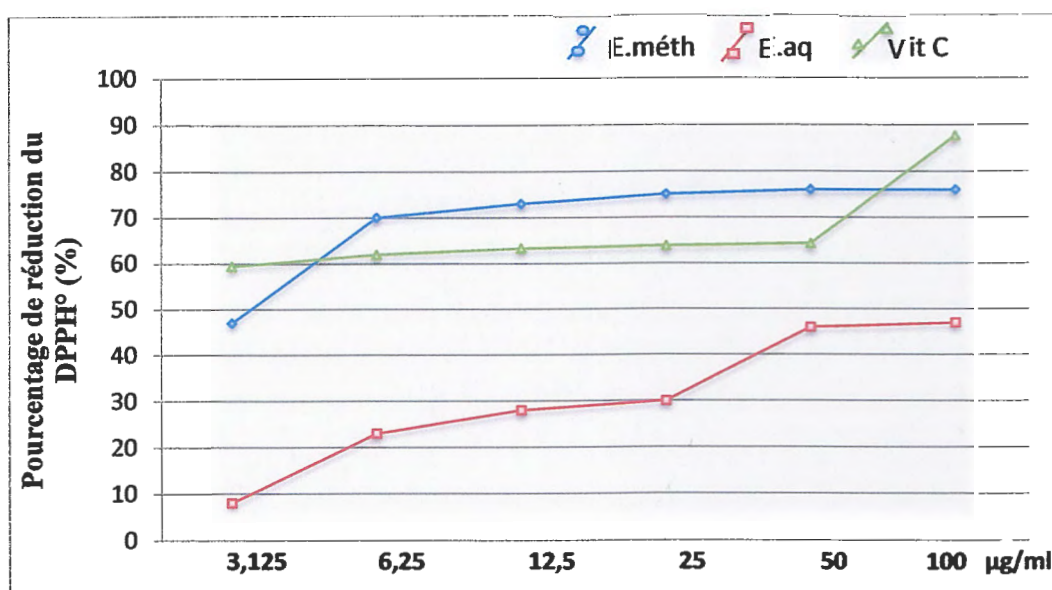


Figure 5. Les pourcentages de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques de *Centaurea fragilis* ainsi que la vitamine C vis-à-vis du radical libre DPPH. Les activités antiradicalaires en fonction des concentrations des deux extraits méthanoliques (E.méth) et aqueux (E.aq) de *Centaurea fragilis* ou de la vitamine C (vit C) ont été mesurées selon le protocole de (Markowicz Bastos et al., 2007) dans lequel le DPPH a été utilisé comme radical libre et la vitamine C comme témoin. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais.

Nos résultats reflètent un effet piègeur ou éboueur des radicaux libres très puissant pour les deux extraits aqueux et méthanolique vis-à-vis du DPPH, cet effet est concentration dépendante. Mais, c'est l'extrait méthanolique qui présente le pouvoir antioxydant le plus élevé avec 88 % à la concentration de 100 µg/ml comparé à celui de l'extrait aqueux avec 47 %. En effet, l'activité scavenger de l'extrait méthanolique est supérieur à celle observé avec la vitamine C 76 % à la même concentration.

De plus, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène, l'effet scavenger des flavonoïdes est attribué à leurs faibles potentiels redox qui les rend thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres (R°) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyles (Javanovic *et al.*, 1994).

Les résultats obtenus de la mesure de l'activité antiradicalaire indiquent l'existence d'une corrélation entre le pouvoir antiradicalaire des extraits de *Centaurea fragilis* et leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes. Comme l'on montré un grand nombres de travaux réalisés sur l'activité anti-radicalaire de certains espèces de *Centaurea* parmi elles *C.puchella*, *C.patula*, *C.tchihatcheffii* (Zengin *et al.*, 2010), *C.ensifformis* (Ugur *et al.*, 2009), *C.centaurium* (conforti *et al.*, 2008).

III.2. L'effet protecteur de l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol

L'évaluation de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait méthanolique contre la toxicité induite par le paracétamol a été effectuée on se basant sur des paramètres sériques et des paramètres du stress oxydant.

La mesure des taux sériques des biomarqueurs hépatiques (ALAT, ASAT, PAL et les protéines totales) a été réalisée et les résultats sont illustrés dans le tableau 5.

Tableau 5. Variation de la concentration sérique du TGO, TGP, PAL, PROT_t dans le sérum des rats traités ou non par le paracétamol (200 mg/kg) et l'extrait de la plante *Centaurea fragilis* (200 mg/kg). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype. Test de student, Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=4), (): désigne un effet très significatif, (*): désigne un effet significatif, E.méth: extrait méthanolique de *Centaurea fragilis*.**

Groupes/traitements	ALAT (UI/ml)	ASAT (UI/ml)	PAL (UI/ml)	PROT _t (g/l)
Témoin	51 \pm 8,86	163,25 \pm 32,78	354,25 \pm 89,63	64,5 \pm 1,29
Paracétamol seul	81,25 \pm 19,48*	301,75 \pm 41,94**	568,35 \pm 67,80*	56,5 \pm 6,24*
E.méth seul	50,5 \pm 13,37	155,5 \pm 35,02	342,5 \pm 71,30	63,5 \pm 2,88
Extrait paracétamol +	57,5 \pm 15,34	143,5 \pm 17,07	257,35 \pm 42,04	61 \pm 7,61
Paracétamol + extrait	44,25 \pm 27,06	151,25 \pm 40,99	366,5 \pm 64,77	68,5 \pm 2,88*

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules hépatiques, leur rôle est de transféré un groupe amines lors des nombreux processus chimique qui ce déroulent au niveau hépatique.

La lecture du tableau 5, montre que l'administration du paracétamol provoque une augmentation significatif ($P < 0,01$) des niveaux des ALAT ($81,25 \pm 19,48$ UI/ml), et une augmentation très significatif des ASAT ($301,75 \pm 41,94$ UI/ml) chez les rats traités avec le paracétamol à la dose de 200 mg/kg comparés au groupe témoin normale. Par ailleurs, le prétraitement des animaux par l'extrait de *Centaurea fragilis* avant et après l'induction de la toxicité par le paracétamol, a normalisé la teneur sérique de ces enzymes, par contre la comparaison avec les rats intoxiqués a démontré une diminution significative des taux des transaminases.

Concernant le groupe d'animaux recevant l'extrait méthanolique seul de *Centaurea fragilis*, aucune variation significative des enzymes ASAT et ALAT ($p \square 0,05$) n'a été observé leurs valeurs respective sont de ($50,5 \pm 13,37$ UI/ml) et ($155,5 \pm 35,0,2$ UI/ml) par rapport au groupe témoin normale ($51 \pm 8,86$ UI/ml).

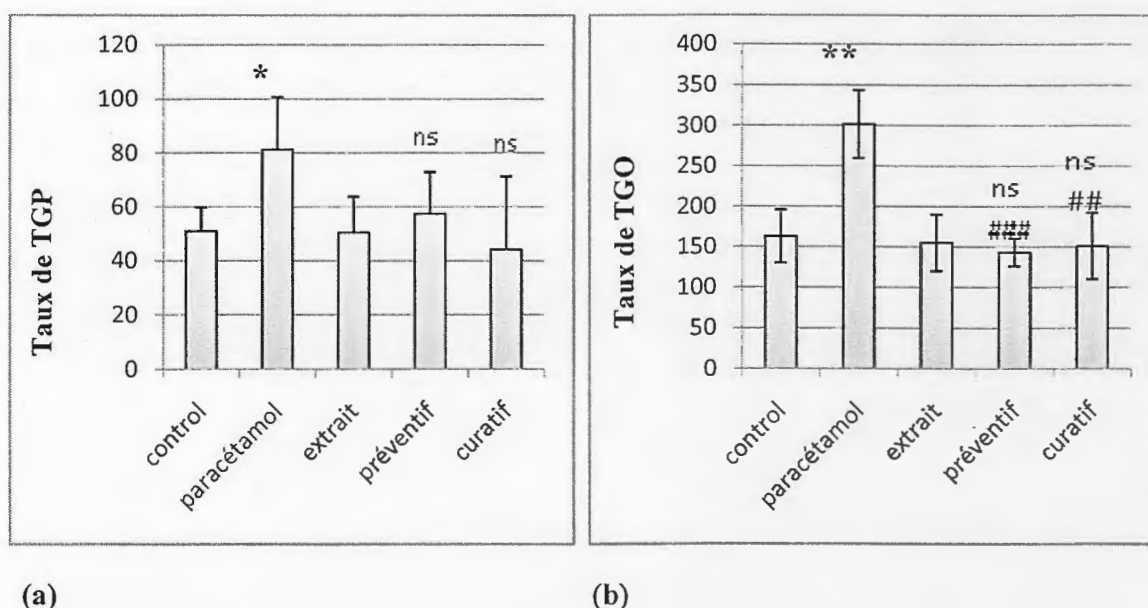


Figure 6. Variation des taux sériques de TGO et de TGP. La concentration des enzymes sériques (a) : TGO, (b) : TGP a été quantifiée à partir du sérum des rats traités ou non par le paracétamol et l'extrait de la plante *Centaurea fragilis* et ceci, selon le protocole de Reitman et al.(1957) et Murray, (1984). Témoin : animaux non traités, APAP : animaux intoxiqués par le paracétamol seul à 200 mg/kg par voie orale pendant trois jours, E.méth : animaux traités par l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* à 200 mg /kg par voie orale pendant sept jours, E.méth+APAP : animaux prétraités par l'extrait méthanolique suivie de paracétamol, APAP+E.méth : animaux traités par le paracétamol suivie de l'extrait méthanolique; Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=4$), (*) : résultat significatif. (**) : résultat très significatif. (ns) : résultat non significatif. (##) : résultat très significatif. (###) : résultat hautement significatif.

En ce qui concerne le dosage de la phosphatase alcaline nous avons observé une augmentation très significative ($p < 0,01$) du PAL sérique dans le lot d'animaux traité par le paracétamol seul 200 mg/kg ($568,35 \pm 67,80$ UI/ml), par rapport au groupe témoin ($354,25 \pm 89,63$ UI/ml), par contre, chez le groupe d'animaux traité par le paracétamol puis l'extrait (curatif) et ceux de l'extrait suivie de paracétamol (préventif) les valeurs restent proches a ceux du témoin normal, leurs valeurs sont respectivement ($366,5 \pm 64,77$ UI/ml)

et ($257,35 \pm 42,04$ UI/ml), alors que ces valeurs ont diminués de façon très significative par rapport aux rats intoxiqués.

Concernant le lot traité par l'extrait seul, aucune variation n'a été observée avec une valeur de ($342,5 \pm 71,30$ UI/ml) par rapport au témoin.

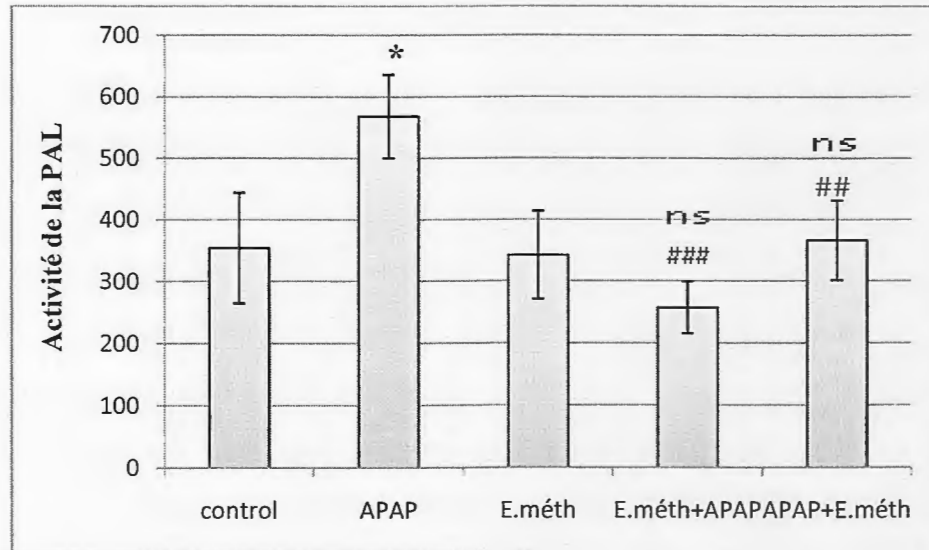


Figure 7. Variation des taux sériques de la phosphatase alcaline. La concentration sérique du PAL a été quantifiée à partir du sérum des rats traités ou non par le paracétamol et l'extrait de la plante *Centaurea fragilis* et ceci, selon le protocole de Haussamen et al. (1977). Témoin : animaux non traités, APAP : animaux intoxiqués par le paracétamol seul à 200 mg/kg par voie orale pendant trois jours, E.méth : animaux traités par l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* à 200 mg /kg par voie orale pendant sept jours, E.méth+APAP : animaux prétraités par l'extrait méthanolique suivie de paracétamol, APAP+E.méth : animaux traités par le paracétamol suivie de l'extrait méthanolique; Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=4$), (*): résultat significatif. (ns) : résultat non significatif. (##) : résultat très significatif. (###) : résultat hautement significatif.

Après le dosage des protéines totales on a remarqué une légère diminution significative ($p < 0,05$) des taux de protéines totales dans le lot recevant le paracétamol seul ($56,5 \pm 6,24$ g/l), par contre le taux de protéines totales chez le groupes traités avec l'extrait seul restent proche des valeurs normales ($63,5 \pm 2,88$ g/l), les taux des protéines totales chez le lot traité par le paracétamol puis l'extrait a significativement augmenté ($P < 0,05$) avec une valeur de ($68,5 \pm 2,88$ g/l) comparativement au groupe normale ($64,5 \pm 1,29$ g/l). Mais dans le cas de l'association de l'extrait avec le paracétamol (curatif) le taux des protéines totales reste proche des valeurs normales alors qu'il a significativement augmenté par rapport par rapport au lot intoxiqué.

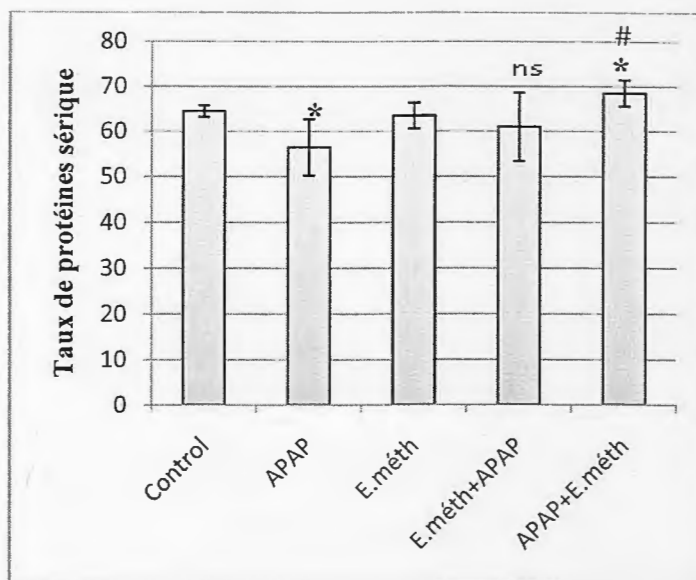


Figure 8. Variation des taux sériques des protéines totales. La concentration sérique des PROTt a été quantifiée à partir du sérum des rats traités ou non par le paracétamol et l'extrait de la plante *Centaurea fragilis* et ceci, selon le protocole de Gornall *et al.* (1949) et Tietz (1995). Témoin : animaux non traités, APAP : animaux intoxiqués par le paracétamol seul à 200 mg/kg par voie orale pendant trois jours, E.méth : animaux traités par l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* à 200mg /kg par voie orale pendant sept jours, E.méth+APAP : animaux prétraités par l'extrait méthanolique suivie de paracétamol, APAP+E.méth : animaux traités par le paracétamol suivie de l'extrait méthanolique; Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=4$) (*): résultat significatif. (ns) : résultat non significatif. (#) : résultat significatif.

La détermination des niveaux sériques des enzymes hépatique (TGO/ASAT, TGP/ALAT, PAL) sont les plus couramment déterminés dans l'évaluation des dommages hépatiques engendrés par le paracétamol (Jafri, 1999 ; Ghandforoush-Sattari, 2007; Yue-tao Liu *et al.*, 2010 ; Eesha *et al.*, 2011).

D'après les résultats, nous avons enregistré une élévation significative des transaminases sériques ALAT, ASAT, PAL et les protéines totales, après l'administration du paracétamol seul à la dose de 200 mg/kg. Cette élévation du taux sérique de ces enzymes est révélateur d'une nécrose hépatocytaire sévère (Ganzina, 1983 ; Dobbs *et al.*, 2003), celle ci est due au métabolite réactif N-acétyl-p-benzoquinone -imine qui se combine aux protéines et lipides membranaires provoquant la destruction des cellules hépatiques et la sortie de leurs contenus dans le sang. Nos résultats sont en accord avec ceux publiés sur la toxicité hépatique par les métabolites réactifs (Bloutelet, 1985).

Par contre l'administration préventive et curative de l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* à la dose de 200 mg/kg en association avec le paracétamol a atténué l'effet provoqué par le paracétamol seul et normalise leurs activités, ce qui indique que les principes actifs de *Centaurea fragilis* en pu ce lié avec les radicaux libres des métabolites réactifs et empêchent ainsi leurs combinaison avec les protéines et les lipides des hépatocytes.

L'effet antioxydant de *Centaurea fragilis* a été démontré en évaluant les paramètres antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques.

Les variations des concentrations en malonyldialdéhyde (MDA) cytosoliques hépatiques après traitement par le paracétamol à la dose de 200 mg/kg, et l'extrait de plante *Centaurea fragilis* à la dose de 200 mg/kg, par voie orale pendant 3 jours et 7 jours sont respectivement représentées dans la figure 9.

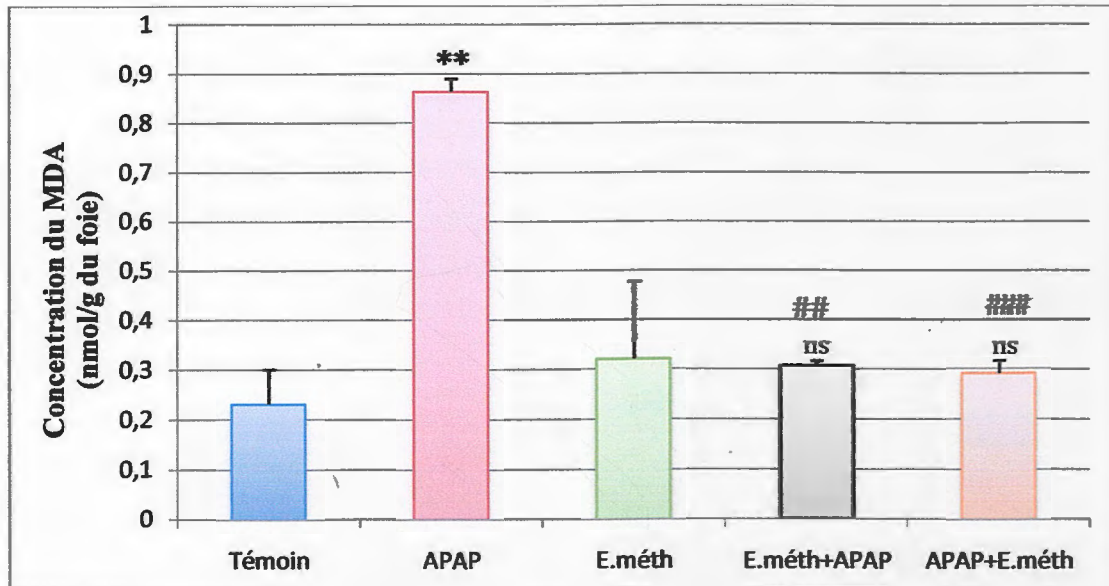


Figure 9. Evaluation des taux cytosoliques du MDA dans les tissus hépatiques des rats intoxiqués par le paracétamol et traités par l'extrait méthanolique de la plante *Centaurea fragilis*. Les taux du MDA ont été évalués à partir des tissus hépatiques provenant d'animaux traités ou non par le paracétamol et l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* et ceci, selon le protocole d'Ohkawa et al. (1979). Témoin : animaux non traités, APAP : animaux intoxiqués par le paracétamol seul à 200 mg/kg/j par voie orale pendant trois jours, E.méth : animaux traités par l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* à 200 mg/kg/j par voie orale pendant sept jours, E.méth+APAP : animaux prétraités par l'extrait méthanolique suivie de paracétamol, APAP+E.méth : animaux traités par le paracétamol suivie de l'extrait méthanolique; Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=4) (**): résultat très significatif. (ns): résultat non significatif. (##): résultat très significatif. (###): résultat hautement significatif.

Nous avons constaté une élévation très significative ($P < 0,01$) du MDA chez les rats recevant le paracétamol seul ($0,863 \pm 0,025$ nmol/g) par rapport au groupe témoin normal ($0,23 \pm 0,069$ nmol). Par ailleurs, aucune variation significative du MDA n'est constaté chez les rats prétraités par l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* et recevant également du paracétamol ($0,30 \pm 0,008$ nmol/g) ainsi que les rats recevant le paracétamol suivie de l'extrait méthanolique ($0,29 \pm 0,024$ nmol/g) par rapport au groupe témoin, le même profil de variation est constaté avec le groupe recevant l'extrait seul ($0,32 \pm 0,15$ nmol/g). Par contre le taux de MDA est diminué d'une façon hautement significative, et

très significative chez les lots curatif et préventif respectivement par rapport au lot intoxiqué.

La peroxydation lipidique est l'une des principales causes des dommages oxydatifs induits par les ROS durant l'exposition aux toxiques (Liu *et al.*, 1999). Les résultats de notre étude ont montré clairement une élévation très significative du MDA cytosolique chez les animaux traités par le paracétamol cela concorde avec ceux trouvés dans la littérature (Younes et Siegers, 1985; Katyare et Satav, 1991; Katikova, 2002; Lahouel *et al.*, 2006). Cette augmentation est un indicateur qui reflète le niveau de la peroxydation lipidique, cela résulte des dommages occasionnés au niveau cellulaire, tissulaire ou des organes.

En revanche, la diminution des taux de MDA dans les groupes d'animaux recevant l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* avant et après le traitement par le paracétamol, prouve l'effet préventif et curatif de la plante sur la toxicité hépatique. Cet effet hépatoprotecteur est peut être due à la captation des molécules du MDA par les principes actifs de *Centaurea fragilis* ou bien à l'inhibition des réactions en chaînes de la peroxydation lipidique au niveau cytosolique.

Concernant le groupe d'animaux recevant l'extrait seul où aucune variation significative du taux de MDA n'a été constatée par rapport au témoin, on peut suggérer que l'extrait de *Centaurea fragilis* n'a aucun effet sur la peroxydation lipidique.

Un autre paramètre du stress oxydatif, le GSH a été évalué. Les résultats de l'étude de l'influence du traitement médicamenteux, par le paracétamol à 200 mg/kg seul ou associé à l'extrait de plante ainsi que l'extrait de plante seul sur le taux tissulaires de Glutathion sont rassemblés dans la figure 10.

Le dosage de la forme réduite du glutathion tissulaire a montré qu'il a subi une baisse très significative ($p < 0,01$) chez les rats traités par le paracétamol seul ($0,058 \pm 0,02$ mmol) par rapport au groupe témoin normal ($0,371 \pm 0,12$ mmol), par contre aucune variation significative de GSH n'a été observée chez les rats recevant l'extrait de *Centaurea fragilis* avant et après le traitement par le paracétamol car leurs valeurs respectives ($0,346 \pm 0,02$ mmol) et ($0,345 \pm 0,04$ mmol) par rapport aux rats témoins, le même résultat est observé chez les rats recevant l'extrait seul avec une valeur ($0,302 \pm 0,08$ mmol). Alors que la comparaison des taux du GSH des lots curatif et préventif avec le lot intoxiqué a montré une augmentation hautement significative et très significative respectivement.

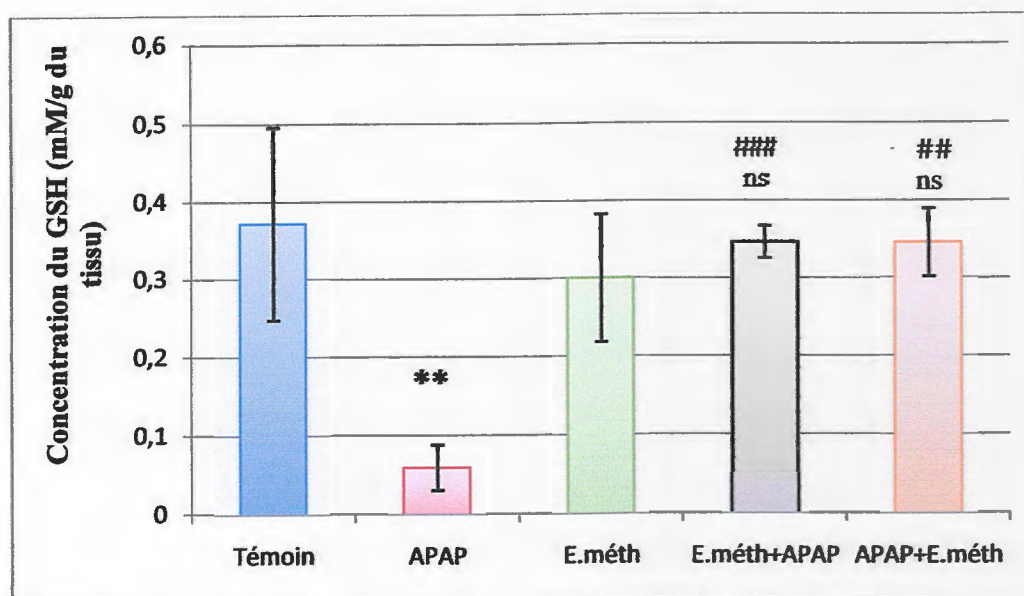


Figure 10. Evaluation de l'activité cytosolique de la GSH dans les tissus hépatiques des rats intoxiqués par le paracétamol et traités par l'extrait méthanolique de la plante *Centaurea fragilis*. L'activité de la GSH a été quantifiée dans la fraction cytosolique du tissu hépatique provenant d'animaux traités ou non par le paracétamol et l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* et ceci, selon le protocole d'Ellmen (1959). Témoin : animaux non traités, APAP : animaux intoxiqués par le paracétamol seul à 200 mg/kg par voie orale pendant trois jours, E.méth : animaux traités par l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* à 200 mg/kg par voie orale pendant sept jours, E.méth+APAP : animaux prétraités par l'extrait méthanolique suivie de paracétamol, APAP+E.méth : animaux traités par le paracétamol suivie de l'extrait méthanolique; Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=4$)(**): résultat significatif. (ns): résultat non significatif. (###): résultat hautement significatif. (##): résultat significatif.

Le glutathion réduit (GSH), un antioxydant non enzymatique essentiel dans la défense cellulaire en se liant par son pôle SH aux métabolites toxiques, la déplétion du GSH hépatique et souvent associée à l'hépatotoxicité médicamenteuse (Hewawasam *et al.*, 2003 ; Raja *et al.*, 2007), l'exemple le plus démonstratif étant l'intoxication au paracétamol (Lahouel *et al.*, 2004). La déplétion du glutathion chez les animaux recevant le paracétamol seul par rapport au témoin normal est due à la conjugaison du GSH avec le métabolite réactif du paracétamol (NAPQI) pour former l'acide mércapturique (Mitchell *et al.*, 1973). Par contre les animaux traités par l'extrait de la plante avant et après traitement par le paracétamol présentent des taux de GSH supérieurs à ceux obtenus chez les animaux recevant le paracétamol seul, cela montre l'effet préventif ainsi que curatif de l'extrait de *Centaurea fragilis* contre la déplétion du GSH induite par le paracétamol, cette augmentation des taux du GSH peut être due à l'induction de sa synthèse ou de sa régénération (Martin, 2003).

Concernant le groupe d'animaux recevant l'extrait seul, on a constaté une légère diminution du GSH comparativement au groupe témoin, on suggère que cette diminution est due à la biotransformation normale de l'extrait au niveau hépatique.

Un autre dosage des activités enzymatiques de CAT et GST a été réalisé. Tous d'abord, l'évaluation de l'activité de la CAT après traitement par le paracétamol à la dose de 200 mg/kg, et ou l'extrait de plante *Centaurea fragilis* à la dose de 200 mg/kg, par voie orale pendant 3 jours et 7 jours respectivement est représentée dans la figure 11.

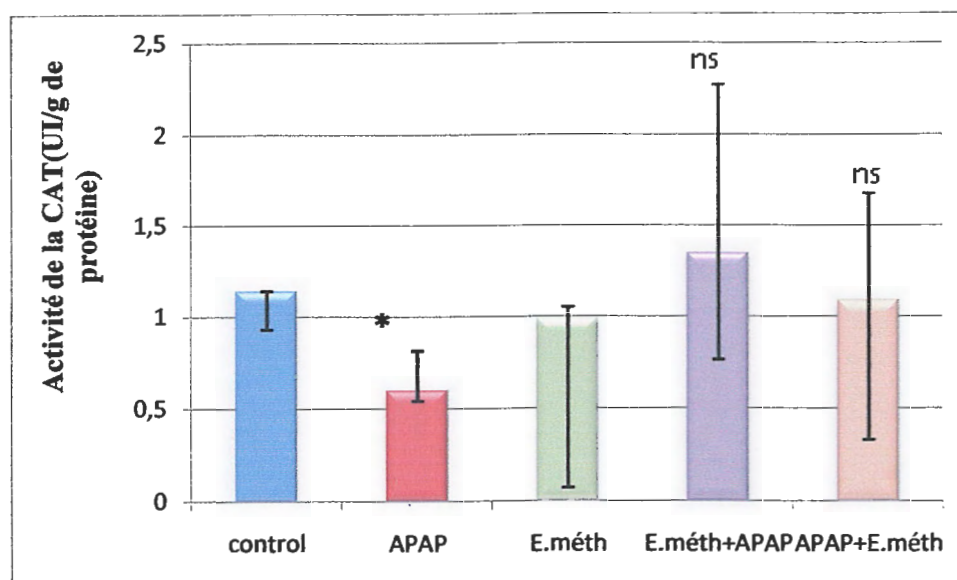


Figure 11. Evaluation de l'activité cytosolique de la CAT dans les tissus hépatiques des rats intoxiqués par le paracétamol et traités par l'extrait méthanolique de la plante *Centaurea fragilis*. L'activité de la CAT a été quantifiée dans la fraction cytosolique du tissu hépatique provenant d'animaux traités ou non par le paracétamol et l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* et ceci, selon le protocole de Clairbone et al., (1985). Témoin : animaux non traités, APAP : animaux intoxiqués par le paracétamol seul à 200 mg/kg par voie orale pendant trois jours, E.méth : animaux traités par l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* à 200 mg /kg par voie orale pendant sept jours, E.méth+APAP : animaux prétraités par l'extrait méthanolique suivie de paracétamol, APAP+E.méth : animaux traités par le paracétamol suivie de l'extrait méthanolique; (*) : résultats significatif. (ns) : résultat non significatif.

L'activité de la catalase cytosolique a significativement diminuée ($p < 0,05$) chez les rats recevant le paracétamol seul ($0,613 \pm 0,06$ UI) par rapport aux valeurs obtenus dans le groupe témoin normal ($1,145 \pm 0,21$ UI). L'activité enzymatique de la CAT est conservée à son niveau normal chez les rats traités par l'extrait avant et après le traitement par le paracétamol, ses valeurs respectives de ($1,355 \pm 0,58$ UI) et ($1,026 \pm 0,76$ UI) n'ont aucune différence significative par rapport à celles obtenus avec les rats témoins, de même que pour les résultats obtenus par le groupe d'animaux traités par l'extrait seul de *Centaurea fragilis* avec une valeur de ($0,992 \pm 0,92$ UI). L'activité de la catalase est exprimée par mg de protéines. Une courbe d'étalonnage des protéines est élaborée à cet effet.

Parmi les systèmes antioxydants, la catalase, l'enzyme spécialisée dans la détoxification de l'hydrogène peroxydase par sa transformation en oxygène et une molécule d'eau (Subat et al. 2007).

Nous avons enregistré une réduction de l'activité enzymatique de la CAT chez les animaux traités par le paracétamol seul, nos résultats sont similaires à ceux de la littérature (Mirochnitchenko *et al.*, 1999; Rajesh et Parames, 2006), cette réduction peut être due à la destruction de cet enzyme suite au stress cellulaire induit par le métabolite toxique du paracétamol (NAPQI) ou encore suite à son oxydation. Par contre le traitement des animaux par l'extrait de la plante avant et après le traitement par le paracétamol atténue complètement ces effets puisque les taux de la catalase reviennent à la normale, ce résultat explique la propriété antioxydante des principes actifs de l'extrait de *Centaurea fragilis*. Le maintien du niveau normal de l'activité enzymatique de la catalase chez les groupes recevant l'extrait seul explique que la plante n'a aucun effet sur cette activité.

Enfin, l'évaluation de l'activité enzymatique de la GST a été réalisée et les résultats sont représentés dans la figure 12.

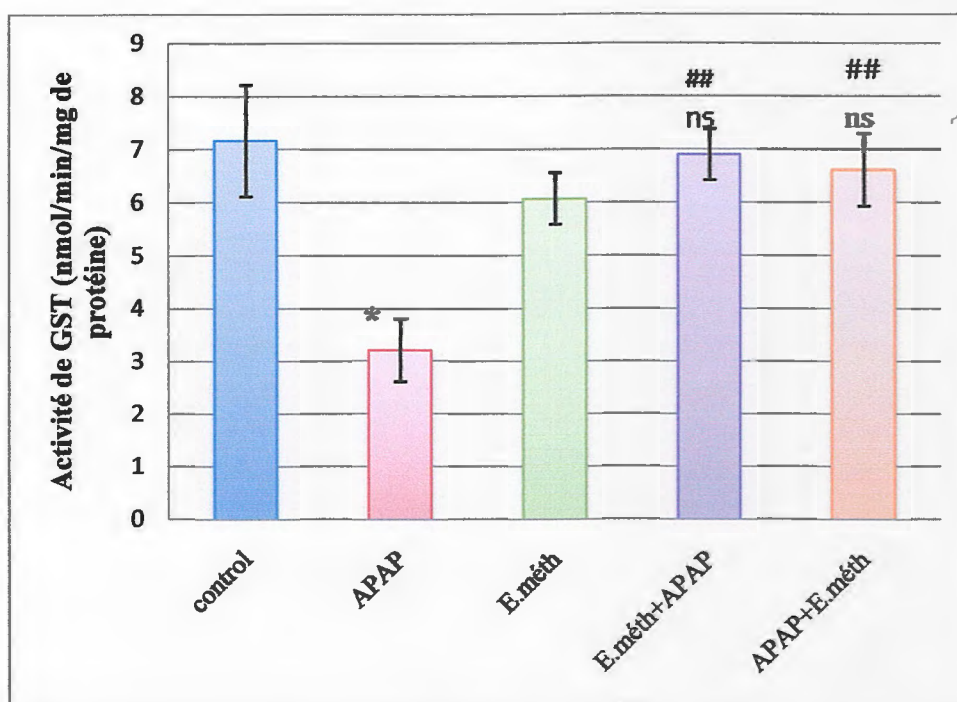


Figure 12. Evaluation de l'activité cytosolique de la GST dans les tissus hépatiques des rats intoxiqués par le paracétamol et traités par l'extrait méthanolique de la plante *Centaurea fragilis*. L'activité de la GST a été quantifiée dans la fraction cytosolique du tissu hépatique provenant d'animaux traités ou non par le paracétamol et l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* et ceci, selon le protocole de Habig *et al.* (1974). Témoin : animaux non traités, APAP : animaux intoxiqués par le paracétamol seul à 200 mg/kg par voie orale pendant trois jours, E.méth : animaux traités par l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* à 200 mg/kg par voie orale pendant sept jours, E.méth+APAP : animaux prétraités par l'extrait méthanolique suivie de paracétamol, APAP+E.méth : animaux traités par le paracétamol suivie de l'extrait méthanolique; Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=4$), (*) : résultats significatifs. (ns) : résultat non significatif. (##) : résultat très significatif.

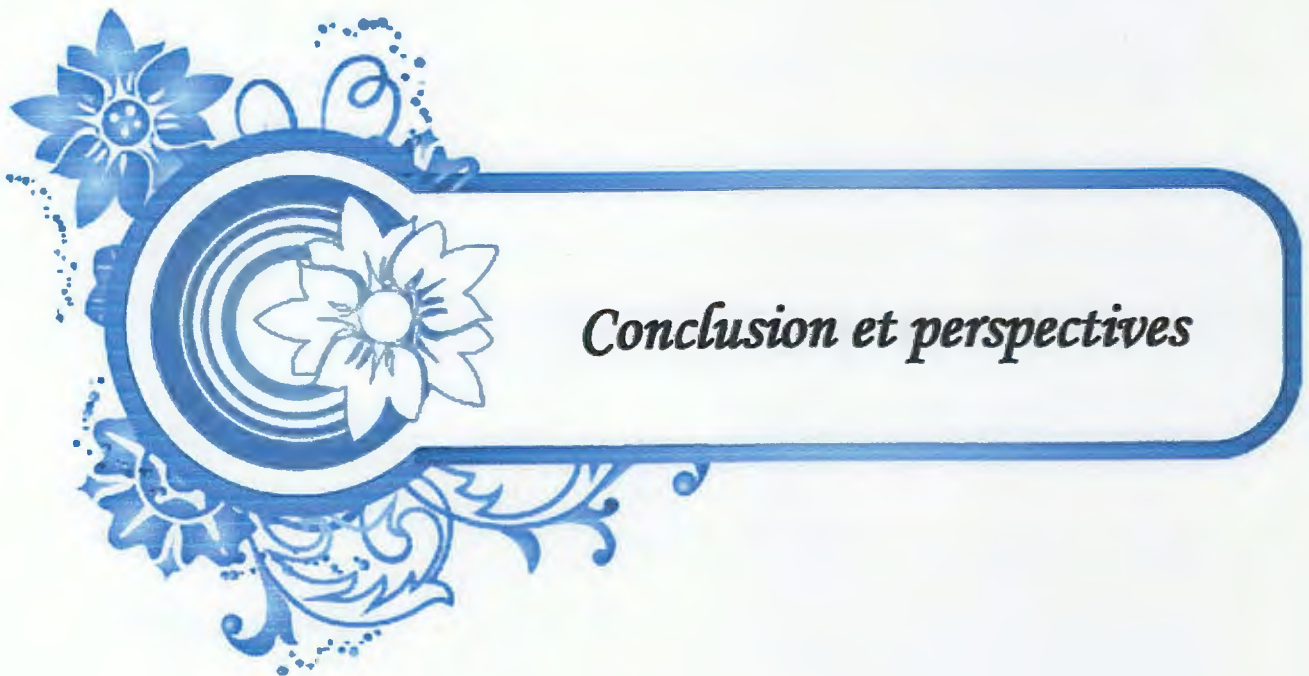
L'étude cinétique de l'activité GST en réponse aux différents traitements a montré des variations relativement faibles entre les lots traités par l'extrait de plante puis le

paracétamol (à titre préventif) ($7,16 \pm 0,07$ nmol/min/mg), le paracétamol puis l'extrait de plante (à titre curatif) ($3,2 \pm 0,60$ nmol/min/mg) et le lot témoin. Alors que ces variations sont très significatives par rapport au lot intoxiqué. L'effet de l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* sur l'activité GST n'a montré aucune différence significative ($6,07 \pm 0,48$ nmol/min/mg) par comparaison aux témoins. Quant à l'effet du paracétamol seul, le suivi de l'activité GST en fonction du temps a révélé une inhibition significative de cette activité avec une valeur de ($6,9 \pm 0,48$ nmol/min/mg) contre une valeur témoin.

La glutathion-S-transférases constitue une famille d'isoenzymes principalement cytosoliques (Bouraoui *et al.* 2009). Ce système est très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Gattás *et al.* 2004; Zhihua *et al.*, 2004).

Par conséquent, on déduit que la production des radicaux libres provoqués par l'administration du paracétamol est la cause de la diminution de l'activité de la GST chez les rats traités avec le paracétamol seul comparé aux rats témoins. Le traitement des rats par l'extrait de plante que sa soit a titre préventif ou curatif, provoque une amélioration de l'activité du GST par rapport aux valeurs obtenus par le lot ayant reçue le paracétamol seul.

D'après les résultats du dosage sérique des biomarqueurs hépatiques ainsi que le dosage tissulaire des paramètres du stress oxydatif au niveau du foie on conclut que *Centaurea fragilis* possède un effet protecteur contre l'inflammation hépatique induite par le paracétamol, et qu'elle n'a pas d'effet toxique.



Conclusion et perspectives

Etant donné la toxicité et /ou les effets indésirables des molécules de synthèse, la recherche de nouveaux composés bioactifs se dirige vers l'identification et la caractérisation de molécules d'origine naturelle.

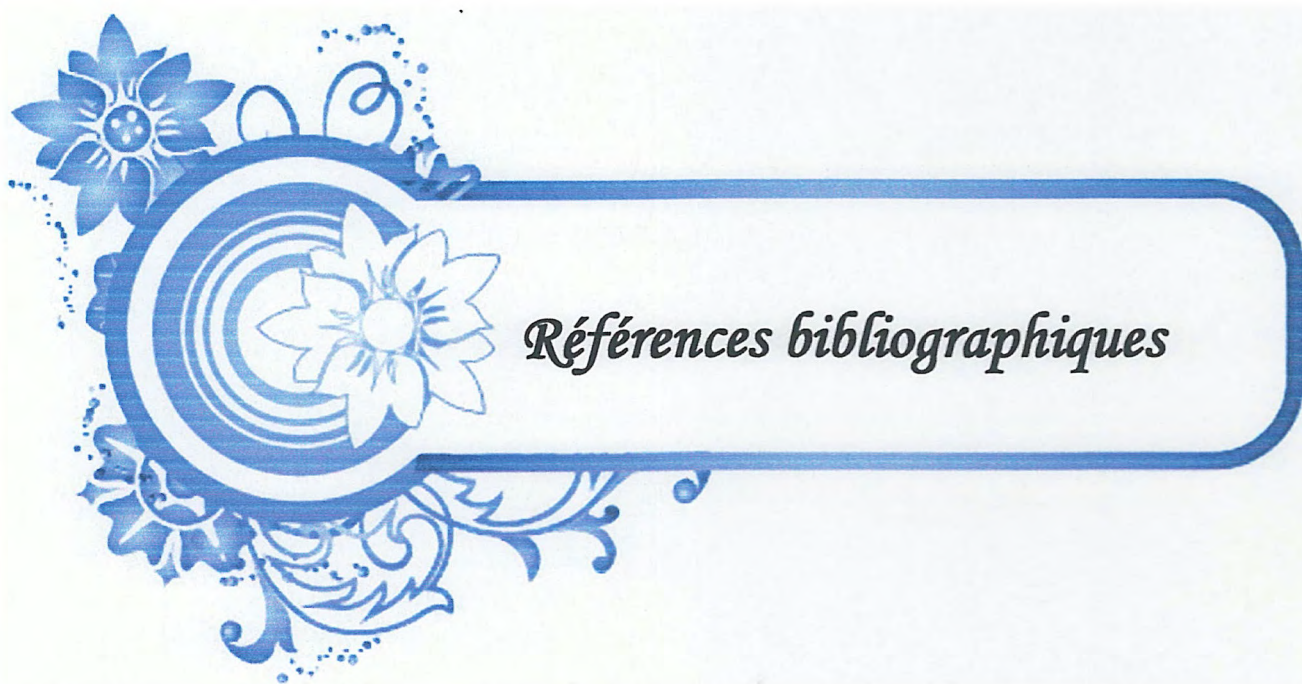
Ce travail avait pour objectif d'évaluer l'activité pharmacologique et antioxydante de l'extrait brut de *Centaurea fragilis* contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol chez le rat.

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux et des flavonoïdes a révélé que les extraits bruts méthanoliques et aqueux de *Centaurea fragilis* sont riches en composés phénoliques, par contre l'analyse qualitative des deux extraits par la chromatographie en phase gazeuse révèle l'absence de ces composés phénoliques. Les résultats du test au DPPH ont montré que les deux extraits méthanolique et aqueux de *Centaurea fragilis* ont présenté des activités antiradicalaires très puissantes.

L'évaluation de l'effet hépatoprotecteur de la plante *Centaurea fragilis* contre la toxicité induite par le paracétamol, montre que le paracétamol est hautement hépatotoxique conduisant au dysfonctionnement hépatique sévère, caractérisé par l'augmentation des enzymes sériques; les transaminases, la phosphatase alcaline et un stress oxydant exprimé par un déficit dans le système antioxydant enzymatiques et non enzymatiques avec augmentation de la peroxydation lipidique.

Le traitement des rats par l'extrait méthanolique de *Centaurea fragilis* limite les effets délétères du paracétamol et protège les fonctions hépatiques par le maintien des paramètres sériques (ASAT, ALAT, PAL et les protéines totales) à des niveaux cellulaires normaux et maintient aussi l'équilibre de la balance antioxydant-prooxydant par le renforcement des systèmes antioxydant enzymatiques et non enzymatiques présenté par l'augmentation des taux de GSH, de l'activité enzymatique de la CAT et GST et l'inhibition de la peroxydation lipidique

Partant de ces résultats, l'activité hépatoprotéctrice de « *Centaurea fragilis* » est très considérable, raison pour la quelle nous recommandons d'approfondir l'étude phytochimique par l'isolement et purification des constituants actifs, ainsi que l'utilisation de techniques plus performantes (HPLC, RMN...) pour une analyse fiable. Etablir des tests plus avancés pour comprendre les mécanisme moléculaire de l'activité hépatoprotéctrice de la plante.



Références bibliographiques

- Abdel-Hameed A, Khoder MI, Yusora S, Osman M and Ghanem S.** Diurnal distribution of airborne bacteria and fungi in the atmosphere of Helwan area, Egypt . (2009). *Sci Total Environ*, 407(24) : 6217-22.
- Ahmed ZF, Rimpler H, Hamouda FM, Rizk A M and Ismail SI.** Phytochemical Studies of Certain Centaurea-D Species Lipids. (1971). *Planta Med*, 19-3, 264-269.
- Akkal S, Benayache F, Benayache S and Jay M.** Flavonoids from Centaurea incana. (1997). *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 361.
- Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS and Duran A.** Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five Centaurea L. (2011). Species from Turkey flora, *Food and Chemical Toxicology* 49. 2914–2920.
- Alali FQ, Tawaha K, El-Elimat T, Syouf M, El-Fayad M, Abulalia K, Nielsen SJ, Wheaton, WD, Falkinham JO and Oberlies NH .** Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. (2007). *Natural Product Research* 21 (12), 1121–1131.
- André P, Enserink B, Connor D et Croal P.** Toward guidelines for public participation best practice principles. (2004) IAIA, Proceeding (CD-ROM), 24th Annual Meeting, 24-30.
- Anisio Francisco SOARS .** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponectine et prostaglandines.(2005). thèse doctorat.
- Aronof DM, Oates JA and Boutaud O.** New insights into the mechanism of action of acetaminophen: Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H2 synthases. 2006. *Clin Pharmacol Ther*. 79(1):9-19.
- Asadipour A , Mehrabani M et Larinajafi M.** Volatile oil composition of *Centaurea aucheri*. (2005). *DARU*. 13 : 160-164 .
- Babar, M., A.A. Khan, A. Arif, Y. Zafar and M. Arif.** Path analysis of some leaf and panicle traits affecting grain yield in doubled haploid lines of rice. (2007). (*Oryza sativa* L.). *J. Agric. Res.*, 45: 245-252.
- Bahorun T, Gressier B, Trofin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, Gazin M.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and p inophen: Its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H2 synthases. (1996) . *Clin Pharmacol Ther* (2006). 79 (1), pp. 9-19.

Bancheva S et Greilhuber J. Genome size in bulgarian *Centaurea S.l.* (Asteraceae).-*Plant Syst. Evol.*,257: 95-117.

Bankova L, Brummet ME, Bochner BS, Grigoryev DN, Barnes KC, Beck LA. GM-CSF pathway defects may account for reduced neutrophil chemotaxis in atopic dermatitis. (2007). *J Allergy Clin Immunol.* 119: 238.

Bartosz G. Generation of reactive oxygenspecies in biological systems. (2003). *Comments on Toxicology.* 9: 5-21.

Beckman KB, Ames BN . The free radical theory of aging matures. (1998). *Physiological reviews.* 78: 547-581.

Berger MM. Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence. (2006) . *Nutrition Clinique et metabolism.* 20(1): 48-53.

Bizovi KE and Smilkstein MJ. Acetaminophen In *Toxicologic Emergencies.* (2002). 7th edition. New York: Mc Graw Hill. p: 480–501.

Bjornsson E and Olsson R. Suspected drug induced liver fatalities reported to the WHO database. (2006). *Digestive & Liver Disease.* 38: 33-38.

Blazka ME, Elwell MR and Holladay SD. Histopathology of acetaminophen-induced liver changes: role of interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha. (1996). *Toxicol. Pathol.* Mar Apr,24(2):181-9.

Bohlmann, F.; Burkhardt, H.; Zdero, C. *Naturally Occurring Acetylenes.* 1973, Academic Press, New York.

Bonnefont-Rousselot D, thérond P, beaudeau JL, Legrand A and Delattre J. Aging and oxidative stress. Which potential markers ?. (2001) .*Ann. Biol. Clin. (Paris)* .. 59(4): 453-9.

Boutabet K . Etude pharmacochimique de l'extrait de propolis au cours d'unstress oxydatif rénal induit par la doxorubicine. (2007).Thèse de Magistère de l'université de Jijel.

Boutelets I. Les glutathion S-transphérases. (1985). *DEA de biologie cellulaire et molaiculaire.* (ROUEN, France).

Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. (2009). 4e Ed. Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris.

Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL and Sauvaigo S . Recent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases.(2002). *Biol.chem.*,87(10): 93-840-4.

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JL and sauvaigo S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. (1999). *Mutat.Res.* 424:9-2 .

Cadet J, Douki T, Frelon S, Ssauvaigo S, pouget JP and Ravanat JL. Assessment of oxydative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. (2002). *Free Radic. Biol. Med.* 33:441-449 .

Castanedo- Ovando A, De Lourdes Pacheco-Hernandez M et Paez-Hernandez E. Chemical studies of anthocyanins. (2009). *Areview.Food chemistry.*113:859-871.

Chiarugi P and Fiaschi T. Redox signalling in anchorage dependent cell growth. (2007) .*Cellular Signalling.* 19: 672-682.

Chritensen E, and Lassen K, length of the solar cycle: An indicator of solar activity closely associated with climate. (1991). *Science*, 254, 698-700.

Claiborne A. Catalase activity. In *CRC, Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.*(1985). (Ed. RA Greenwald) *CRC Press, Boca Raton, FL*, pp: 283-284.

Conforti F, Ioele G, Statti G, Marrelli M, Rango G, Menichini F. (2008). Anti-proliferative activity against human tumour cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food and chemical toxicology.* 46: 3325-3332.

Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. (2001) .*Current topics in medicinal chemistry.*1: 569-590

Dargan PI and Jones AL. Acetaminophen poisoning: an update for the intensivist. (2002). *Crit Care.* 2: 108-110.

Davern TJ, Hépatotoxicity of immunomodulating agents and the transplant situation. In *Drug-induced liver disease.* (2007). 2nd edition.Kaplowitz N and DeLeve L, eds.Informa Heathcare, New York. 662-81

Dellale M. Le Métabolisme Des Médicaments. (2006) . Institut d'optique Raymon Thibaut IORT. Bruxelles/Belgique.

Djeddi S, Argyropoulou C, et Skaltsa H. Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp. *Grisebachii*. (2008). *Biochemical Systematic and Ecology*; 36:336-339.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plant extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97: 654-660.

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

Dobbs NA, Twelves CJ, Gregory W, Cruikshanka C, Richards MA, Rubens RD. Epirubicin in patients with liver dysfunction: development and evaluation of a novel dose modification scheme. (2003). *European Journal of Cancer* 39, 580-586.

Dong H, Haining RL, Thummel KE. Involvement of human cytochrome P450 in the bioactivation of acetaminophen. (2000). *Drug Metab. Dispos.* Dec;28(12):1397-400.

Duraffourd C, Lapraz JC, Chemli R. La plante médicinale de la tradition à la science. (1997). 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222

Eesha BR, Mohanbabu Amberkar V, Meena Kumari K, Sarath babu, Vijay M, Lalit M and Rajput R. Hepatoprotective activity of *Terminalia paniculata* against paracetamol induced hepatocellular damage in Wistar albino rats. (2011). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 466-469

Ellman GL. Plasma antioxidant. (1959) . *Arch biochemistry and biophysics*; 82:70-77.16.

El-Rhaffari L, Zaid A. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. 2004. *Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes*, 293-318.

El-Sohemy A, Baylin A, Spiegelmen D, Ascherio A and Campos H. Dietary and adipose tissue gamma -tocopherol and risk of myocardial infraction epidemiology .(2002) .13, p.216-223).

Erel, Isil, Rose C. Liao and Michael S. Weisbach. 2011. Determinants of cross-border mergers and acquisitions, *Journal of Finance*, forthcoming.

Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdely C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. (2008) . organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* 331: 372-379.

Favier A. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. (2003). *L'actualité Chimique.* 108-115.

Ferhat M. Recherche de substances bio actives de *centaurea microcarpa coss et dur*. (2009). Université de M'sila - Diplôme étude supérieur de biochimie.

Flamini G, Pardini M and Moreilli I. A flavonoid sulphate and other compounds from the roots of *Centaurea bracteata*. *Phytochemistry*. (2001). 58: 1229-1233.

Fleurentin J and Pelt JM. *Les plantes médicinales*. (1990) . *La Recherche* 21, 222, 810-818.

Frank C LU. Toxicologie. Donné générale procédures d'évaluations, Organes cibles, évaluation du risque. (1992). MASSON Paris Ed, P175, 180 .

Frei B et Higdon JV. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. (2003). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43:89-143

Jacques Frexinos, Louis Buscail. Hépatogastro-entérologie clinique. (2004). Elsevier Masson, 5 Ed. P: 736.

Fromenty B. Drug-induced mitochondrial and metabolic toxicity: Mechanisms and deleterious consequences for the liver. 2010. *Réanimation* 19, 552-567

Fuorucci S. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. (2006). Thèse de doctorat de l'université de Nice Sophia Antipolis.

Gang Liang , Anzhou Tang , Xiaozhen Lin, LILI SZH, Haihua T and Quentin L. Green tea catechins augment the antitumor activity of doxorubicin in an in vivo mouse model for chemoresistant liver cancer. (2010). *International journal of oncology* vol. 37, n°1, pp. 111-123 [13 page(s) (article)] .

Ganzina F. 4-Epi-doxorubicin, a new analogue of doxorubicin: a preliminary overview of preclinical and clinical data. (1983). *Cancer Treat Rev* 10: 1-22.

Gattas GJ, Kato M, Soares, Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MA and Bydlowski SP. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. . (2004) . *Braz J Med Biol Res*. Vol 337:451-458.

Gayon R. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod éd., Paris, 254 p.

Georgé S, Brat P, Alter P and Amiot MJ. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived product. (2005). *J.Agric.Food Chem*, 53: 1370-1373.

Girotti chanu C. Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du dermesous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea debilis*. (2006). Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Lyon.

- Geubel AP.** LA TOXICITÉ HÉPATIQUE DES MÉDICAMENTS. (2002). Louvain med. 121: S186-S191.
- Ghandforoush-Sattari M and Siminozar Mashayekhi.** (2007). Plasma taurine concentration as a biomarker of liver damage in paracetamol poisoning. *Toxicology Letters, Volume 172, Supplement 1, Page S132*
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A.** (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220- 1234.
- Gonzalez FJ and Bernard B.** Brodie award lecture. Cyp2e1. *Drug Metab Dispos* .(2007). 35(1): 1–8.
- Goren, M. P. and Li, J. T. L.** (1986), The Coomassie brilliant blue method underestimates drug-induced tubular proteinuria. *Clin. Chem.*, **32**, 386-388
- Gottlieb O R, Mors W B.** Potential utilization of brazilian wood extractives. *J Agric Food Chem.* 1980;28:196–215
- Graham GG and Scott KF.** "Mechanism of action of paracetamol". (2005) .*American journal of therapeutics.* 12 (1), pp. 46–55
- Guignard JL et Dupont F .** Botanique : Systématique moléculaire. (2004) . 13^eéd. Masson (Ed), Paris ; 246-256 .
- Gölcemal D, Alanku, Çalikan O, Karaalp C, Ors AU, Ballar P e and Bedir E.** (2010). Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. *Subsp. Urvillei* . *Carbohydrat Research.*345(17) : 2529-2533.
- Habig WH, Pabst M J and Jakoby W B.** Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. (1974). *J Biol Chem.*Vol 249:7130-7139.
- Hadi M.** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques. (2004). Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur.
- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW and Richel TL.** High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. (1998). *J. Agric. Food Chem.* 46: 1887-92.

- Halliwell B and Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cellculture : how should you do it and what do the results mean?. (2004) . British journal of pharmacology. 142:31-2.
- Hammond PM, Scawen MD and Paice CP.** Enzyme based paracetamol estimation. (1981). Lancet. 8216, pp. 391-392.
- Haslam E.** Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. (1994). Nat. Prod. 11: 41-66.
- Haussamen TU., et al. .,**(1977).Clin .Chim.Acta ; 35 :271-273.
- Henri K M .**Evaluation de la fonction hepaticque des patients soumis au traitement par les tuberculostatiques. (2007) . Institut Supérieur des Techniques Médicales.
- Herz W and Sudarsanam V.** *Phytochemistry.* (1970). 9(4): 895-896
- Herz W, Bhat SV and Sudarsanam.** *Phytochemistry.* (1972).11(5) : 1829-1831
- Herz W, Bhat SV, Crawford H, Wagner H, Maurer G and Farkas L.** *Phytochemistry.* (1972). 11(1): 371-375
- Hewawasam RP, Jayatilaka KAPW, Pathirana C, Mudduwa LKB .** (2004). Hepatoprotective effect of *Epaltes divaricata* extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. Indian J. Med. Res. 120: 30-34.
- Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB and Rhee SJ.** Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. (2004).*Clin Chim Acta* 340, 107-115.
- Hopkins WG .**Physiologie végétale. Université des sciences et technologie de Lille.(2003).
Edition de boeck.p99-120
- Iglesia F, sturgess JM and feuer G.** New approaches for assessment of hepatotoxicity by means of quantitative functional-morfological interrelationship. In: Toxicologiy of the liver. (1982) . Eds G L. Plaa and W R. Hewitt. New york : Raven Preqss
- Iqbal M., Sharma S. D., Okazaki Y., Fujisawa M., Okada S.** (2003). Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 33–38.
- Isrin P.** Larouse des plantes médicinales. (2001). Librairie Larousse (Ed). Paris.

Jacques B. Nécrose hépatique massive et fièvre jaune.(2006). Original Research Article. *Annales de Pathologie*, Volume 26, Issue 4, Pages 302-303

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

Jovanovic S, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic M. (1994): Flavonoids as anti-oxydants. *J Am Chem Soc* 116: 609. 4846-4851.

Jung T, Bader N and Grune T. Oxidized proteins : intracellular distribution and recognition by the proteasome. (2007). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 462: 231-237.

Kadriya S, El Deeb RAA, Jaber S, Mossa and Abdel-Monem A.(2003). *Saudi Pharmaceutical Journal*, 11(4): 184-191.

Kamanzi K, Raynaud J and Voirin B. *Plantes Medicinales et phytothérapie*. (1982). 16, 30

Karamenderes C, Bedir E, Pawar R, Baykan S and Khan I A. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. (2007) . *Phytochemistry*; 68: 609-615.

Katikova OIu, Kostin IaV, Tishkin VS. Hepatoprotective effect of plant preparations. (2002). *Eksp Klin Farmakol*; 65(1):41-3.

Katrine F, Christine RL, Hugo K and Alessandro C. Intoxication aiguë au paracétamol. (2010). 10(38):647–651

Katyare SS. and Satav JG. (1991). Effect of thyroidectomy and subsequent treatment with triiodothyronine on kidney mitochondrial oxidative phosphorylation in the rat. *J. Biosci.* 16, 81-89.

Kebieche M. Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine.(2009) .thèse Doctorat Université Mentouri Constantine.

Knight TR, Fariss MW, Farhood A and Jaeschke H. Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. (2003). *Toxicol Sci*,76(1), pp. 229-236.

Koechlin-Ramonatxo C. Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. (2006) .*Nutrition clinique et métabolique*. 20:165-177.

- Kohen R and Nyska A.** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification .(2002). *Toxicologic Pathology*. 30: 620-650.
- Kumaran A., et karunakaran R.J.** Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. (2005). *Food chemistry*., 97: 109-114
- Kupchan MS and Bauerschmidt E.** *Phytochemistry* .(1971). 10(3) : 664-666
- Kusano G, Beisler and Kurmaz BV.** (1962). *Farmatry, Zh.* 17(2), 40-44.
- Kusano G, Beisler J and Sato Y.** (1973). Steroidal constituents of *Solanum xanthocarpum*, *Phytochemistry* 12 (2): 397-401
- Lahlah FZ.** Extraction des flavonoïdes par le butanol, chloroforme à partir de *Silybum marianum*, et étude de leurs activités antibactériennes. (2008). Thèse de magistère de l'université de Constantine.
- Lahoual M.** (2004). Interaction flavonoïdes mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat d'état de l'université de Constantine.
- Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, Fillastre JP.** (2006). 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. *Pathologie Biologie* 52 : 314-322.
- Larrey D.** Hépatotoxicité des médicaments immunosuppresseurs. Conduite diagnostique. (2008) *Gastroenterol Clin Biol.* 32:S194-S204.
- Lee WM.** Drug-induced hepatotoxicity . (2003). *N Engl J Med.* 349(5):474- 85.
- Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P and Prost M.** Stresse oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale.* (2001). 30: 1076-1081.
- Levine RL.** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. (2002) *.Free Radic. Biol. Med.* 32: 790-796.
- Lhuillier A.** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). (2007) .Thèse de doctorat. Toulouse.

- Liu J, Yang CF, Wasser Shen H M , Tan C E and Ong CN.** Protection of salvia miltiorrhiza against aflatoxin-induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats dual mechanisms involved .(2001). *Life Sci*, 69 : 309-326.
- Maarouf A.** (2000). Dictionnaire botanique Pp 129.
- Maataoui B S, Hmyene A, and Hilali S.** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*). (2006). *Lebanese Science Journal*. 7: 3-8.
- Madi A.** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. (2010). Thèse de Magistère de l'université de constantine.
- Maisuthisakul P, Pasuk S and Ritthiruangdej P.** Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. (2008). *J Food Composition and Analysis*. 21: 229-240.
- Markowicz B DH, Saldanha L A, Catharino R R, Sawaya A CH F, Cunha I B S, Carvalho PO and Eberlin M N.** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts . (2007). *Molecules*. 12: 423-432.
- Martin S, Andriantsitohaina R.** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. (2002). *Ann. Cardiol. Angeiol.*, 51(6): 304-315.
- Martin F.** Vannin-1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. (2003). *Thèse de Doctorat de l'Université de la Méditerranée, centre de l'immunologie de Marseille- Luminy NCERM U 136-CNRS MR6102*, pp.17-19.
- Martínez-Cayuela M .** Oxygen free radicals and human disease. (1995). *Biochimie*. 77: 147-161.
- Mates J M and Perez-Gomez C.** Nunez de Castro I Antioxidant enzymes and human diseases. (1999). *Clin. Biochem*. 32 : 595-603 .
- Mégarbane B, Deye N and Baud F.** Toxic hepatitis: Mechanisms of toxicity and specific pharmacological agents. (2007). *Reanimation* 16 : 632- 642.
- Mercan Dany.** Le Stress Oxydatif ., mars 2010. *A.R.L.*, Lausanne.
- Meziti A .** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L'étude *in vitro* et *in vivo*. (2009). *Thèse de Magister de l'Université de Batna*, pp. 70-71.

- Mirochnitchenko O, Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Chen L, Yang C, and Inouye M.** Acetaminophen toxicity: Opposite effects of two forms of glutathione peroxidase. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 10349–10355.
- Mitaine-Offer A C, Tapondjou L A, Djoukeng J D, Bouda H and Lacaille-Dubois M A.** (2003). *Biochemical Systematics and Ecology.* 31: 227-228.
- Mitchell J R, Jollow D J, Potter W Z, Gillette J R and Brodie B B.** (1973). *J Pharmacol Exp Ther.*(187). 211- 217.
- Moumen R, Nouvelot A, Duval D, Lechevalier B and Viader F.** Plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.(1997). *J Neurol Sci.* . vol 151(1), p.35-39.
- Murray R.** Aspartase aminotransferase. (1984) Kaplan A et al .*Clin Chem the C.V . Mosby Co .St Louis . Toronto. Princeton* 11:112-116 .
- Myara I, Alamowitch C, Michel O, Heudes D, Bariety J, Guy-Grand B, et al.** Lipoprotein oxidation and plasma vitamin E in nondiabetic normotensive obese patients. (2002-2003). *Obes Res*;11(1):112—20.
- Nagendran B, Kalyana S, et Samir S.** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. (2006). *Food chemistry.*, **99** : 191–203.
- Neuzil et Stocker.** Bilirubine attenuates radical-mediated damage to serum albumin. (1993). *FEBS Lett*; 331(3): 281-284.
- Okado-Matsumoto A and Fridovich I .** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. (2001). *J Biol Chem* **276**, 38388-38393.
- Okhawa H, Ohishi N and Yagi K .** Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction (1979) .*Analytical Biochemistry*, **95**:351-358.
- Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E and Swiader K.** Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. (2007). *Food Chem.* **100** (2) : 579-83.
- Othman A , Ismail A, Ghani NA and Adenan I.** Antioxydant capacity and phenolic content of cocoa beans .(2007).*Food Chem.***100**, 1523-1530.
- Özçelîc B, Gürbüz I, karaoglu T et Yeilada E.** Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis L. ssp. Solstitialis* . (2009). *Microbiological Research.* **164** : 545-552 .

Ozsoy N, Candoken E, and Akev N. Implications for degenerative disorders :antioxidative activity; total phenols, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in Aloe vera. (2009). *Oxid Med Cell Long.* 2(2) : 99-106.

Packer L, Tritschler H J and Wesse I K . Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. (1997). *Free Radic Biol Med* 22 : 359-378.

Perez LM; Polanco R; Rios JC; Montealegre J; Valderrama L; Herrera R and Besoain X. The increase in endochitinases and β -1,3-glucanases in the mutant Th650-NG7 of the *Trichoderma harzianum* Th650, improves the biocontrol activity on *Rhizoctonia solani* infecting tomato. (2007). *IOBC/WPRS Bulletin*, vol. 30, no. 6, p. 135-138.

Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* . (2000). 63: 1035-1042.

Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K and Defraigne J O. Physiological action of antioxidant defences. (2002). *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 16 : 233-239.

Podsdek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables. (2007). A review. *LWT.* 40:1-11.

Poletti V. Les intoxications médicamenteuses aiguës chez les carnivores domestiques : présentation des données épidémiologiques du CNITV d'Alfort et analyse des intoxications les plus fréquentes. (1996). *Th : Vet : ENVA* . 045. 129 p.

Polonovski M. Biochimie Médicale - T 3. (1971). Masson & Cie, Paris : 1 vol. (923 p.)

Poupon A. Voronoi and Voronoi-related tessellations in studies of protein structure and interaction. (2004). *Curr. Op. Struc. Bio.* 14:233-241.

Powers S K and Lennon S L . Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. (1999). *Proc Nutr Soc* .58: 1025-1033.

Prescott L F, Park J et Ballantyne A. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet.* (1977). Aug 27, 2(8035):432-4.

Quézel P and santa S . Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales . (1963). *A .C.N.R.S* (Ed). Paris ;Tome 1 : 565

Quezel P and Santa S. Nouvelle Flore De L'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales (Tome 2). (1963) . *Du centre national de la recherche scientifique* 15, quai anatole-France-paris7 Ed, (p :1016) .

Raja, S., K.F. Ahamed, V. Kumar, K. Mukherjee, A. Bandyopadhyay and P.K. Mukherjee. Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. (2007). *J. Ethnopharmacol.*, 109: 41-47

- Rajbhandari A and Roberts F M.** The flavonoids of *Stevia rebaudiana*. (1983). *J Nat. Prod.*(1983). 46(2): 194-195.
- Rajesh B, Parames CS.** The protein fraction of *Phyllanthus niruri* plays a protective role against acetaminophen induced hepatic disorder via its antioxidant properties. (2006). *Phytother Res* 120:595–601.
- Reichel P.** Guide pratique de toxicologie.(2004). volum 317, p 74.
- Rein D, Lotito S, Fraga CG, Schmitz HH, & Keen CL.** Cocoa consumption increases plasma epicatechin and antioxidant capacity in humans. (2000). *J. Nutr.* 130: 2109S-2114S.
- Reitman S and Frankel SJ .**(1957). *Clin Path*; 28-56.Repair; 3(8-9): 1109-1115
- Roberta M M and Schaffer PS .**(1953). *Archives of Biochemistry and Biophysics.*47(2): 419-423
- Sanchez-Moreno C .**Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. (2002). *International Journal of Food Science and Technology.* 8: 121-137.
- Sarmi MP, et Cheymer V.** Les polyphénols en agroalimentaire. (2006). Ed Lavoisier. P 2 -10.
- Sarni-Manchado P et Cheynier V.** Les polyphénols en agroalimentaire (2006) Ed. Lavoisier (Tec & Doc). Paris. 300-398.
- Saroglou V, Karioti A, Demetzos C, Dimas K and Skaltsa H.** Sesquiterpene lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities.(2005). *J Nat Prod.* 68(9):14047.
- Seghiri R.** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis* . (2007) . Constantine : Université Mentouri .
- Servais S .** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire enréponse à l’ozone : effets de l’âge et d’une supplimentation en Oméga-3.(2002). Thèse dedoctorat de l’université de Claude Bernard.
- Shine V J, Latha P G, Shyamal S, Suja S R et Anuja G I, Sini S.** Pradeep S and Rajasekharan S. Gastric antisecretory and antiulcer activities of *Cyclea peltata*(Lam.) Hook. F. & Thoms . in rats. (2009) . *Journal of Ethnopharmacology* ; 125 : 350-355
- Sorg O.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. (2004). *Comptes Rendus Biologie.* 327: 649-662.
- Stadtman E R.** Oxidation of free amino acid residues in proteins by radiolysis and by metalcatalyzed reactions.(1993). *Annu. Rev. Biochem.* 62: 797-821.

- Sturtz L A, Diekert K, Jensen L T, Lill R and Culotta VC.** A fraction of yeast Cu₂Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage.(2001). *J Biol Chem* 276, 38084-38089.
- Subat T, Qun L, Faye L et Lopez JR.** Catalase alleviates cardiomyocyte dysfunction in diabetes: role of Akt, Forkhead transcriptional factor and silent information regulator 2. (2007). *Life Sciences* 81: 895– 905.
- Tesevic V.** Quantitative analysis of sesquiterpene lactone cnicin in seven *Centaurea* species wild-growing in Serbia and Montenegro using 1H-NMR spectroscopy . Serb . (2007). *Chem . Soc*, 72 : 1275-1280.
- Tietz NW.** Text book of clinical chemistry. (1995) ,3 Ed. C.A.Curtis , E.R.Silverman L.M., Christensen R.H .p.523-542
- Tiwari R D and Singh J.** (1977) . *Phytochemistry*, 16(7): 1107-1108.
- Trease GE and Evans W C.** (1983). *Pharmacognosy*, 225, 514, 12th Edition Baillière,
- Turkmen N, Velioglu Y S, Sari F and Polat G.** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea.(2007). *Molecules*. 12: 484-496.
- Ugur A, Duru M E, Ceylan O, Sarac N, Varol O and Kivrak I.**(2009) . Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Centaurea ensiformis* Hub.-Mor. (Asteraceae), a species endemic to Mugla (Turkey). (2009). *Natural Product Research* 23 (2), 149– Dr Méd. Dany Mercan Unilabs, A.R.L.,Lausanne, mars 2010.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT D, Mazur M and Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.(2007) *Biocell*. 39: 44-84.
- Vuorela S , Salminen H, Mäkelä M, Karonen M, Kivikari R and Heinonen M.** Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. (2005). *J Agric Food Chem* . 53(22): 8492-510.
- Wagenitz G, Hellwig FH.** Evolution of characters and phylogeny of the Centaureinae. 1996. In: Hind DJN, Beentje HG, eds. *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994. Kew: Royal Botanic Gardens*, 491–510

- Yamanaka, Y. and Tajika, E.** The role of the vertical fluxes of particulate organic matter and calcite in the oceanic carbon cycle: Studies using an ocean biogeochemical general circulation model. (1996). *Global Biogeochemical Cycles* 10(2): doi: 10.1029/96GB00634. issn: 0886-6236.
- Yayli N, Baltaci C, Gök Y, Aydın E et Üçünö O.** Sesquiterpene lactones from *Centaurea helenioides* Boiss . (2004) . *Turk J. Chem* . 30: 229-233
- Yesilada E, Gurbuz I , Bedir E, Tateli I and Khan IA.** Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpenes lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp . *Solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. (2004). *Journal of ethnopharmacology*. 95 : 213-219 .
- Yoshikawa T, Yamamoto Y, Naito Y and Toyokuni S.** Free radical in chemistry, biology and medicine. Ed. (2000). *Oica International*, London, p p: 31-42.
- Younes M. and Siegers CP.** Effect of malotilate on paracetamol-induced hepatotoxicity. (1985). *Toxicol. Lett.* 25, 143-1 46.
- Yue-tao L, Bi-nan L and Jin-yong P.** Hepatoprotective activity of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit in mice treated by paracetamol. (2010). *Food Chemistry* 125: 719–725.
- Yves M.** Petit Larousse de la médecine. 2002. Paris
- Zelko I N, Marian T J and Folz R J.** Superoxide dismutase multigene family : a comparison of theCuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, andexpression. (2002). *Free radical biology & medicine*. 33: 337-349.
- Zengin G, Aktumsek A, Guler GO, Cakmak YS and Yildiztugay E.** Antioxidant Properties of Methanolic Extract and Fatty Acid Composition of *Centaurea urvillei* DC. subsp. *hayekiana* Wagenitz. (2010). *Rec. Nat. Prod.* 5: 123-132.
- Zhihua J, Elias SJA, Ying M, Linda J, Jinming S, Siqi Z, Shujun L, Ruiying W, Tianzhu Z, GanglinY, Junqiu L, Jiacong S, and Guimin L.** Expression of selenocysteine-containing glutathione S-transferase in *Escherichia coli*.(2004). *Biochem and Bioph Res Commun*.Vol 321:94–101
- Zied B, Jihene G, Jamel J, Mohamed B, Cristelle C, Jean-François N et Hamadi B.** Etude de l'effet du cadmium et du benzo(A) pyrène sur des enzymes de phase I et phase II de biotransformation chez le polychète nereis diversicolor. (2001). *Revue des Sciences de l'Eau* 22(3) : 451-459.

Evaluation de l'effet protecteur et antioxydant de l'extrait méthanolique de la plante *Centaurea fragilis* contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol chez le rat

Résumé : L'activité hépatoprotéctrice de l'extrait méthanolique des racines de la plante *Centaurea fragilis* a été évaluée en utilisant le paracétamol comme modèle pour l'induction de l'hépatotoxicité chez le rat. Cet extrait a subi une investigation phytochimique pour la quantification des polyphénols et des flavonoïdes avec réalisation d'une chromatographie en phase gazeuse, ainsi qu'une détermination de son pouvoir antioxydant. L'hépatotoxicité induite par le paracétamol à la dose de 200 mg/kg a été estimée par une augmentation des enzymes sériques ASAT, ALAT, PAL, ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique et une déplétion en glutathion réduit (GSH), en catalase et en glutathion-S-transférase (GST) dans le tissu hépatique. Les résultats ont montré que l'administration de l'extrait méthanolique de *Centaurea de fragilis* à la dose de 200 mg/kg a un effet protecteur contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol.

Mots clés : *Centaurea fragilis* ; activité hépatoprotéctrice ; toxicité hépatique ; antioxydant ; extrait méthanolique ; paracétamol.

Abstract: The hepatoprotective activity of the methanol extract of the roots of the plant *Centaurea fragilis* was evaluated using as a model for paracetamol induced hepatotoxicity in rat. This extract was subjected a phytochemical investigation for the quantification of polyphenols and flavonoids with realization of a gas chromatography and also the determination of its antioxidant power. Hepatotoxicity induced by paracetamol at a dose of 200 mg/kg was estimated by an increase in serum enzymes ASAT, ALAT, PAL and total protein, as well as an increase in lipid peroxidation and depletion of reduced glutathione (GSH), catalase and glutathione-S-transferase (GST) in the liver tissue, the results showed that after administration of *Centaurea fragilis* at a dose of 200mg/kg a protective effect against liver toxicity induced by paracetamol

Keywords: *Centaurea fragilis* , hepatoprotective activity, liver toxicity , antioxydant, methanolic extract, paracetamol.

ملخص : تم تقييم النشاط المضاد لالتهاب الكبد للمستخلص الميثانولي لجذور *Centaurea fragilis* باستخدام الباراسيتامول كنموذج لإحداث التسمم الكبدي عند الفئران. هذا المستخلص أجريت عليه تجارب كيميائية ونباتية للكشف عن كمية البوليفينولات والفلافونيدات وأيضا تحديد الفعل المضاد للأكسدة ، وقد تم تقدير التسمم الكبدي الناتج عن الباراسيتامول بجرعة 200 ملغ / كلغ زيادة في إنزيمات TGP, TGO, PAL والبروتينات الكلية وكذلك زيادة في الدهن البروكسيديوسي ونقص في الجلوتاثيون المراجعة والكتالاز-S- ترانسفيراز في أنسجة الكبد ، أظهرت النتائج بعد المعالجة بجرعة 200 ملغ / كلغ تأثيرا وقائيا ضد التهاب الكبد الناتج عن الباراسيتامول.

الكلمات المفتاحية : *Centaurea fragilis* , مضاد للالتهاب , مضاد الأكسدة, التهاب الكبد, المستخلص الميثانولي