

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -

Université Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel -

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



كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

## Mémoire de Master

**Filière:** Master Sciences Biologie

**Option :** Biologie Moléculaire et Cellulaire

### Thème

**Effet hépato-protecteur de l'extrait méthanolique de la  
plante *Centaurea fragilis* chez la souris intoxiquées par  
le paracétamol.**

#### Membres de Jury:

**Examinatrice:** Dr MEDJAHED Zineb

**Présidente:** Mme BENSAM Moufida

**Encadreur:** Pr RECHRECHE Hocine

#### Présenté par:

BOUSSELOUB Oussama

BOULAHIA Rima

*Année Universitaire 2018- 2019*

Numéro d'ordre:

## Remerciements

*Merci à Dieu le tout puissant d'avoir guidé chacun de nos pas, de nous avoir protégé et permis de réaliser ce modeste travail, et aux êtres les plus chers au monde "Nos Parents" pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris afin de nous voir réussir.*

*A notre promoteur **Pr RECHRECHE Hocine**  
Nous tenons à lui exprimer toute notre reconnaissance pour nous avoir fait bénéficier de son savoir ainsi que pour sa patience avec nous, son aide, ses conseils précieux et sa disponibilité toute au long de la période de l'expérimentation malgré ses obligations professionnelles.*

*Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury :*

- ***Mme BENSAM Moufida** pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury*
- ***Dr MEDJAHED Zeineb** d'avoir accepté de faire partie du jury et de donner de son temps pour examiner ce travail.*
- *Nous remercions spécialement l'enseignant **Mr SEBTI Mohammed** pour leur aide dans l'identification de la plante médicinale de l'espèce *Centaurea fragilis**

*Nous exprimons toute notre amitié à tous les membres du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, pour toutes les conditions de travail favorables que vous avez mis en notre disposition.*

*A tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire, vous avez toute notre reconnaissance.*

---

Remerciements .....	i
Liste des abréviations .....	iii
Introduction .....	01

### **Partie I. Revue bibliographique**

I.1. Paracétamol .....	02
I.1.1. Généralité sur le Paracétamol .....	02
I.1.2. Toxicité hépatique de paracétamol.....	02
I.2. Stress oxydatif.....	03
I.2.1. Introduction.....	03
I.2.2. Espèces réactives de l'oxygène.....	03
I.2.3. Production de radicaux libres .....	04
I.2.4. Les conséquences cellulaires .....	05
I.2.5. Systèmes antioxydants.....	06
I.2.6. Polyphénols.....	07
I.3. <i>Centaurea fragilis</i> .....	09
I.3.1. Intérêt thérapeutique et utilisation en médecine traditionnelle .....	10

### **Partie II. Matériel et Méthodes**

II.1. Matériel .....	12
II.2. Préparation des extraits bruts des racines de <i>Centaurea fragilis</i> .....	12
II.3. Détermination du rendement .....	12
II.4. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes .....	13
II.5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse .....	13
II.6. Mise en évidence de l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux et méthanolique par le test de DPPH.....	14

---

II.7. Préparation du modèle animal .....	14
II.8. Préparation de la fraction cytosolique .....	15
II.9. Dosage des protéines totales .....	15
II.10. Dosage de glutathion .....	16
II.11. Mesure de l'activité de la SOD .....	16
II.12. Mesure de l'activité de la CAT .....	16
II.13. Analyse statistique des résultats .....	17

### **Partie III. Résultats et Discussion**

III.1. Caractérisation des extraits aqueux et méthanoliques de <i>centaurea fragilis</i> .....	18
III.2. Effet protecteur de l'extrait méthanolique de <i>centaurea fragilis</i> contre la toxicité hépatique induite par le paracétamol .....	24
Partie IV. Conclusion .....	29
Partie V. Références bibliographiques .....	30

**4-HNE** : 4-hydroxynonanal

**AGE** : Advanced glycation end-product

**AGPI** : Acide gras polyinsaturés

**APAP** : paracétamol

**ASK-1** : Apoptosisregulating kinase -1

**CAT** : Catalase

**CYP<sub>450</sub>** : cytochromes P<sub>450</sub>

**DPPH** : 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyle.

**DTNB** : Acide 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoïque

**ERA** : Espèces réactives de l'azote

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**GC-MS** : Gas chromatography mass spectrometry

**GPX, GPX<sub>2</sub>** : Glutathione peroxidase

**GR** : Glutathione reductase

**GSH** : glutathione

**GSK-3** : Glycogen synthase kinase

**MDA** : malondialdéhyde

**MnSOD** : Manganese superoxide dismutase

**NADH** : Nicotinamide-Adenine Dinucleotide, Reduced Form

**NAPQI** : N-acetyl-p-benzoquinone imine

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**SOD** : Superoxyde dismutase

**TBARS** : Acide thiobarbiturique

# **INTRODUCTION**

### Introduction

Le paracétamol est le médicament antalgique le plus utilisé dans le monde par automédication. La consommation excessive du paracétamol conduit à plusieurs effets nocifs tels que la nécrose hépatique, la néphrotoxicité, voir même la mort (Walker et *al.*, 1983). Le produit final (N-acétyl-p-benzoquinone-imine) issu du métabolisme du paracétamol au niveau du foie attaque les différentes biomolécules conduisant à une nécrose hépatique (Corcoran et *al.*, 1985 ; Rogers et *al.*, 1997).

Les médicaments classiques utilisés dans le traitement symptomatique des pathologies hépatiques ont plusieurs effets secondaires qui peuvent induire l'apparition d'autres maladies comme l'insuffisance rénale.

L'exploitation des ressources naturelles pour obtenir de nouvelles molécules bioactives ayant peu ou pas d'effets secondaires et leur adoption comme une alternative thérapeutique est un objectif de grande importance pour la recherche scientifique.

En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine classique. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle. C'est dans ce but que s'inscrit notre travail qui consiste à évaluer l'activité antioxydante et l'activité anti-hépatotoxique des extraits de racines de *Centaurea fragilis* (*Cf*), connue en Algérie sous le nom de « Hchichat safaiier ». Cette espèce est répartie dans la région méditerranéenne et le genre de plante est utilisé en médecine traditionnelle pour traiter la fièvre, les troubles de l'estomac, l'hépatotoxicité, les palpitations, les douleurs abdominales et les maladies du foie et de l'intestin (Bellakhder, 1997 ; Erol et *al.*, 1999 ; Yesilada, 2002 ; Schauenberg et *al.*, 2006 ; Koukoulista et *al.*, 2008). Il existe peu de travaux concernant les activités biologiques de cette espèce. Ce présent travail est donc motivé par la curiosité scientifique de vérifier l'effet hépatoprotecteur de l'extrait méthanolique de la partie souterraine de *Cf*. Pour ce faire, nous avons analysé phytochimique les extraits brut méthanolique et aqueux de *Cf* ; nous avons évalué l'activité antioxydante des deux extraits obtenus ; Nous avons étudié l'effet protecteur de l'extrait méthanolique contre l'hépatotoxicité induite par le paracétamol chez les souris.

# **PARTIE I**

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I.1. Paracétamol**

### **I.1.1. Généralité sur le paracétamol**

Le paracétamol (N-acétyl-p-aminophénol ou APAP) aussi appelé acetaminophen par les anglo-saxons, est une molécule synthétisée pour la première fois par le chimiste américain Harmon Northrop Morse en 1878 (Morse, 1878). Il appartient à la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des antalgiques antipyrétiques non salicylés. Son mécanisme d'action complet reste inconnu (Couic-Marinier et *al.*, 2017 ; Nevers, 2017). La dose thérapeutique du paracétamol est de 4 g/jour avec une dose efficace 50 (DE50) de 45 mg/kg/24h, alors que sa dose toxique 50 (DT50) est de 150 mg/kg/24 h et sa dose létal 50 (DL50) de 2,4 g/kg (Reichl, 2004).

Le métabolisme du APAP a lieu essentiellement au niveau hépatique, par les Hépatocytes (Ennaifer et *al.*, 2015). Les deux voies métaboliques principales sont la glucuronoconjugaison (50-70%) et la sulfoconjugaison (25-35%). En effet, 90% d'une dose normale ingérée sont pris en charge par des enzymes de conjugaison, glucurotransferases et sulfotransferases, qui greffent un groupement glucuronide ou sulfate a la molécule mère pour la rendre plus hydrophile afin de faciliter l'élimination biliaire et urinaire du médicament. Une troisième voie métabolique est également sollicitée. En effet, environ 5% du APAP sont métabolisés par les cytochromes P450, en Nacetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), un métabolite hautement réactif. A dose thérapeutique, ce dernier est rapidement detoxifié par le glutathion (GSH) sous forme d'un conjugué 3'-Sglutathionyl-paracétamol inactif, puis éliminé dans la bile et les urines à la suite d'une réaction de conjugaison avec la cystéine et l'acide mercapturique (Zhao et Pickering, 2011 ; McGill et Jaeschke, 2013 ; Marzuillo et *al.*, 2014).

Finalement, une quatrième voie hépatique de biotransformation mineure aboutissant à la formation de 3-hydroxy-paracétamol et de 3-methoxy-paracétamol par les Cytochromes P doit être également considérée. Ces métabolites non toxiques sont rapidement éliminés par glucurono et sulfoconjugaison (Zhao et Pickering, 2011 ; McGill et Jaeschke, 2013 ; Marzuillo et *al.*, 2014).

### **I.1.2. Toxicité hépatique du paracétamol**

Le foie est le site principal du métabolisme et de l'élimination des médicaments. Par conséquent, en cas d'altération de la fonction hépatique, leur élimination est détériorée avec des conséquences cliniques importantes (Ennaifer et *al.*, 2015). Il existe de nombreuses causes à l'atteinte de l'hépatocyte, Le paracétamol est à l'origine de l'une des intoxications les plus fréquentes dans le monde, source persistante de décès (Mégarbane, 2017).

En cas de surdose, l'APAP est responsable d'une cytolyse et d'une nécrose hépatocytaire dose-dépendante, initiée par la formation en excès de NAPQI, en raison de la saturation des voies de conjugaison et de la déplétion rapide de glutathion intracellulaire. En dessous du seuil de 30 % de la réserve cellulaire normale, les capacités de neutralisation du NAPQI par le glutathion sont dépassées, et le NAPQI formé en excès se lie aux protéines cytosoliques, activant alors une cascade de kinases, à l'origine d'un stress oxydant et d'une fragmentation de l'ADN. Une dysfonction mitochondriale accélère aussi le processus de mort hépatocytaire (Mégarbane, 2017).

## **I.2. Stress oxydatif**

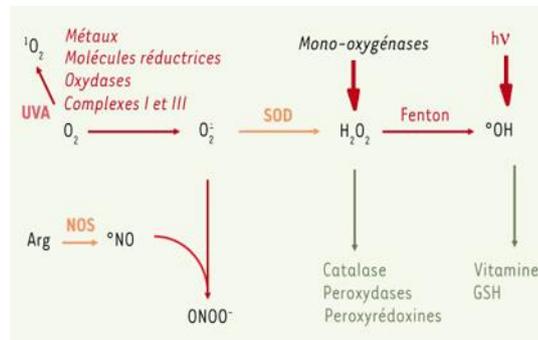
### **I.2.1. Introduction**

Le stress oxydatif est provoqué par un déséquilibre entre les espèces réactives et les pro-oxydants cellulaires (Luczaj et *al.*, 2017). Les pro-oxydants incluent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERA), qui sont des composés hautement réactifs dérivés de l'oxygène et de l'azote (Turrens, 2003). Malgré leur potentiel inducteur de dommages cellulaires, les ERO sont continuellement produits par le métabolisme cellulaire aérobique en conditions normales (Pham-Huy et *al.*, 2008), et sont essentiels à plusieurs processus comme la transduction de signaux, la mort cellulaire et la régulation du cycle cellulaire (Wojtala et *al.*, 2014). Dans une cellule saine, les défenses antioxydantes permettent de contrôler les niveaux d'ERO intracellulaires. Un stress oxydatif peut donc provenir d'un déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux (Pisoschi et Pop, 2015 ; Poprac et *al.*, 2017).

### **I.2.2. Espèces réactives de l'oxygène**

L'oxygène (O<sub>2</sub>) est un élément essentiel pour des processus de la vie en aérobiose. Cependant, environ 5 % ou plus de l'O<sub>2</sub> inhalé est converti en espèces réactives de l'oxygène. La famille des ERO et ERA inclut l'anion superoxyde et le radical hydroxyle, deux radicaux libres possédant un électron non-parié réactif (Boonstra et Post, 2004). Il comprend également le peroxyde (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le peroxydinitrite, même s'ils n'ont pas besoin d'électron libre, car ils vont simplement générer des radicaux libres (Pham-Huy et *al.*, 2008). Les ERO sont formés par réduction de l'oxygène en anion superoxyde (Turrens, 2003). En conditions physiologiques, cette réduction se fait via le cytochrome P450 dans le réticulum endoplasmique et par des oxydoréductases dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Wojtala et *al.*, 2014). Dans les cellules saines, l'anion superoxyde est détecté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est à son tour réduit en eau par l'enzyme catalase (CAT) quand il est en concentrations faibles, ou encore via la glutathion peroxydase (GPx) quand les concentrations augmentent (Poprac et *al.*, 2017).

Par contre, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  peut être partiellement réduit en radical hydroxyle, soit l'un des plus puissants ERO, par une réaction avec le fer (Ayala et *al.*, 2014). Cette réaction se nomme la réaction de Fenton et prend place quand les enzymes ne parviennent pas à détoxifier l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en excès (Pham-Huy et *al.*, 2008 ; Kalyanaraman, 2013). D'un autre côté, la réaction de l'anion superoxyde en excès avec l'oxyde nitrique produit du peroxynitrite, un ERA fortement oxydant (Turrens, 2003).



**Fig1.** Voie métabolique de l'oxygène et des ERO (espèces réactives de l'oxygène) (Barouki, 2006)

### I.2.3. Production de radicaux libres

Les ERO sont à l'origine de la génération d'un stress oxydant et peuvent provenir de sources endogènes ou exogènes. La production des ERO dans les cellules des mammifères découle de plusieurs sources possibles mais est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire (Orient et *al.*, 2007).

La synthèse de prostaglandines, catalysée par la lipooxygénase et la cyclo-oxygénase, implique aussi une production de radicaux libres. Au niveau de la membrane plasmique, la NADPH oxydase activée par le processus phagocytaire de la cellule est à l'origine d'une large production de radicaux superoxydes (Orient et *al.*, 2007). L'activation de la NADPH oxydase joue un rôle central dans la production de ERO à travers la fixation des AGE (Advanced glycation end-product) à leurs récepteurs RAGE (Wautier et *al.*, 2001), et joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Guzik, 2010 ; Touyz et *al.*, 2010).

Aussi, lors de la respiration mitochondriale, dans la chaîne de transport des électrons, l'oxygène moléculaire est converti en radicaux superoxyde (Inoue et *al.*, 2003). De plus, dans les mitochondries, l'oxydation de coenzymes, telles que les flavoprotéines réduites, s'accompagne d'une perte de protons et d'électrons qui, par l'intermédiaire de la chaîne de transport, sont ensuite transférés à l' $\text{O}_2$ . La chaîne de transport des électrons est composée de nombreuses espèces moléculaires et ioniques (les flavoprotéines, plusieurs cytochromes etc...) (Delattre et *al.*, 2005).

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme. Ces facteurs environnementaux telles que les polluants photochimiques, le tabac, les drogues et les radiations ionisantes, pénétrant dans l'organisme par la respiration, l'alimentation ou les muqueuses (Blache et *al.*, 1992 ; Kohen et Nyska, 2002). Certains métaux apportés de manière exogène, ou endogènes tels que le fer ou le cuivre, sont nécessaires à l'organisme mais peuvent à des taux élevés générer des ERO en participant à la réaction de Fenton (Halliwell et Gutteridge, 1990). En effet, ces métaux de transition peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de composé organique (RH) et générer des ROS selon la réaction suivante :  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$

Même si les ions (Fe<sup>2+</sup>) sont à des concentrations physiologiques plus importantes, les ions (Cu<sup>2+</sup>) réagissent plus rapidement (60 fois) avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour former des radicaux hydroxyle (OH) (Halliwell et Gutteridge, 1990).

#### I.2.4. Conséquences cellulaires

L'électron des radicaux libres est très instable et peut réagir avec l'ADN, les protéines et les lipides (Pham-Huy et *al.*, 2008 ; Agnez-Lima et *al.*, 2012), causant ce qu'on appelle des dommages oxydatifs (Kalyanaraman, 2013).

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Pamplona et *al.*, 2000 ; Hulbert, 2005). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong et *al.*, 2004). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), l'acide thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP (Uncoupling protein) et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ERO (Echtay et *al.*, 2003). Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production d'ERO. De plus, Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires. Les ERO sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, sur lesquels l'OH• s'additionne (Důračková, 2008 ; Rahal et *al.*, 2014).

L'oxydation par les ERO conduit à la formation des ponts disulfures, sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, en modifiant la conformation de la protéine. De nombreux enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Důračková, 2008 ; Rahal *et al.*, 2014).

Finalement, Les dommages oxydatifs à l'ADN les plus courantes mesurent l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques ainsi que le squelette glucidique qui inflige le clivage des brins et des mutations génétiques (Valko *et al.*, 2006). Une des altérations fréquentes de l'acide désoxyribonucléique est détectée dans le niveau d'oxydation de la guanine par le radical formant la 8-hydroxy-guanine (8-OHG), qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres. Ce produit de l'oxydation de l'acide désoxyribonucléique peut être simplement traité dans l'urine et est pris en compte un marqueur de carcinogénèse (Valko *et al.*, 2006). 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 carcinogénèse et le vieillissement (Lehucher-Michel *et al.*, 2001; Favier, 2003 ; Valko *et al.*, 2006).

En plus de causer des dommages oxydatifs pouvant mener à la mort cellulaire (Ayala *et al.*, 2014), une augmentation du taux ERO au niveau mitochondrial peut directement activer la voie intrinsèque de l'apoptose, en augmentant la perméabilité membranaire mitochondriale et en causant le relargage subséquent du cytochrome C (Turrens, 2003). L'apoptose agit comme dernière voie de défense contre le stress oxydatif, en éliminant de manière contrôlée les cellules dont les dommages sont trop grands pour être réparés. La nécrose peut aussi être induite par un stress oxydatif d'une très forte intensité (Boonstra et Post, 2004).

### **I.2.5. Systèmes antioxydants**

Les antioxydants sont des substances qui inhibent ou ralentissent l'oxydation d'un substrat (Favier, 2003). Ils sont présents sous de nombreuses formes et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres, aussi bien que pour participer à leur élimination (antioxydants primaires et secondaires). Le système de défense des cellules fait intervenir différents acteurs : les enzymes antioxydantes, les antioxydants non-enzymatiques et même les facteurs de transcription régulant la balance oxydative. Les enzymes antioxydantes participent à la détoxification des ERO/ERA. On y compte par exemple la SOD, est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Il existe trois isoformes de SOD chez les mammifères.

Une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc, une forme mitochondriale associée au manganèse et une forme extracellulaire. Pour cette raison, cette enzyme représente une partie importante du système de défense contre les radicaux libres (Valko et *al.*, 2007). La CAT, une deuxième enzyme qui agit dans la détoxification cellulaire, transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Gaté et coll., 1999 ; Powers et coll., 2003 ; Seifried, 2007 ; Starlin et *al.*, 2013). Enfin, le glutathion peroxydase agit pour transformer les peroxydes en eau. Un manque d'oligo-éléments comme le cuivre, le manganèse, le zinc, le sélénium ou de vitamines comme la riboflavine, conduit à l'inactivation de ces enzymes antioxydantes (Gaté et *al.*, 1999 ; Desport et Couratier, 2002 ).

Certains facteurs de transcription permettent l'expression de gènes de défense antioxydante. Par exemple, l'augmentation modérée des ERO intracellulaires active la voie de signalisation de Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)-Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), lors de laquelle Nrf2 transloque au noyau et lie les éléments de la réponse antioxydante (Antioxidant Response Elements) sur l'ADN, ce qui permet la transcription de gènes comme la SOD et la CAT (Luczaj et *al.*, 2017).

Les Antioxydants non enzymatiques sont des composés endogènes de faible poids moléculaire qui peuvent être soit des produits de synthèse (glutathion) ou issus du métabolisme cellulaire (acide urique) (Kohen et Nyska, 2002), telles que la ferritine, la transferrine, la céruléoplasmine, et l'albumine et certains peptides comme le glutathion (Ames, 1993 ; Papas, 1998 ; Wu et *al.*, 2004 ; Haleng et *al.*, 2007 ; Rahman, 2007 ; Defraigne et Pincemail, 2008 ; Uttara et *al.*, 2009). La ferritine, la ceruloplasmine et l'albumine contribuent à leur tour dans la défense antioxydante secondaire en chélatant les métaux de transition permettant ainsi de prévenir la formation du radical hydroxyle via la réaction de fenton (Martinez-Cayuela, 1995).

Ils pourraient également être d'une source externe (antioxydants exogènes) que sont davantage étudiés que les antioxydants endogènes en raison de leur disponibilité à partir de l'alimentation et de la prise de suppléments. La vitamine E, la vitamine C, les flavonoïdes, et les caroténoïdes sont parmi les antioxydants alimentaires les plus étudiés (Percival, 1996 ; Scalbert, 2005).

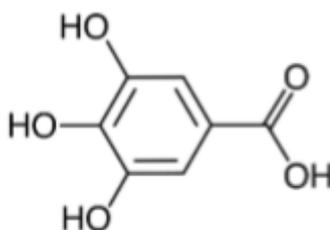
### **I.2.6. polyphénols**

Les polyphénols sont des molécules organiques hydrosolubles largement retrouvées dans le règne végétal. Ils sont issus du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont principalement synthétisés par la voie du shikimate. Cette voie métabolique est présente uniquement chez les bactéries, champignons et les plantes. C'est pourquoi l'alimentation apporte des acides aminés essentiels non synthétisés par le corps humain (Hoffmann L, 2003).

Les polyphénols naturels forment un ensemble de molécules comportant au moins un groupe phénolique dans leur structure et sont en général de haut poids moléculaire. On retrouve plusieurs sous-groupes caractérisés par la structure de leur squelette carboné. Les polyphénols sont capables de piéger des espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition comme le Fer et le Cuivre qui permettent de catalyser les oxydations. Ils sont cependant présents en faible concentration dans le plasma et sont principalement retrouvés sous forme conjuguée et donc n'ont probablement que des effets indirects *in vivo*. Il paraît néanmoins que les polyphénols interagissent avec des cibles protéiques (enzymes, signalisation intracellulaire, récepteurs nucléaires...) ce qui leur assure des effets antiathérogéniques, anti-inflammatoires, antithrombotiques, anti-cancérigènes (Stevenson D et Hurst R, 2007).

Les polyphénols sont classés en deux groupes : les composés flavonoïdes et les composés non flavonoïdes. Les composés flavonoïdes sont regroupés en diverses familles : flavonols, flavanols, flavones, isoflavones, flavanones et anthocyanes. Les non flavonoïdes sont divisés en acides phénols et dérivés, lignanes et stilbènes.

Les acides-phénoliques ce sont des composés simples formés par un seul noyau phénolique et au moins un groupement dont un parmi eux se termine par une fonction acide. Le nombre de carbones dans la chaîne renfermant la fonction acide définit le type d'acide phénolique : l'acide gallique, l'acide caféique par exemple (Hsu C et *al.*, 2006 ; Hsu C et Yen G, 2007).

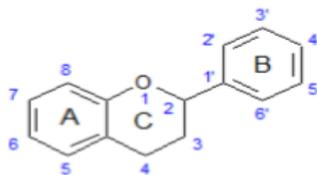


**Fig2.** Structure de l'acide gallique

L'acide gallique a pour effet *in vivo* chez le rat soumis à un régime riche en graisses et supplémenté en acide gallique de réduire significativement le poids du foie et du tissu adipeux par rapport aux rats non supplémentés. Aussi, on observe une diminution des taux sériques en triglycérides, phospholipides, cholestérol total, LDL-cholestérol, insuline et leptine. *In vitro*, l'acide gallique inhibe la prolifération des pré-adipocytes en augmentant le nombre de cellules apoptotiques (Hsu C et *al.*, 2006 ; Hsu C et Yen G, 2007).

Le nom flavonoïde est issu du latin « Flavus » qui signifie jaune. Ce sont des pigments qui sont responsables de la coloration des fruits et des fleurs. Les différentes couleurs dépendent de la structure mais également du pH du milieu. Ils peuvent avoir comme rôle d'attirer les insectes pollinisateurs (Kähkönen M et *al.*, 1999).

Les flavonoïdes sont constitués de deux cycles aromatiques liés par trois atomes de carbone qui peuvent se lier en formant un cycle oxygéné. Selon le degré d'oxydation, les flavonoïdes sont classés en six classes : anthocyane, flavonol, flavone, flavanone, isoflavone, flavanol (Kähkönen M et al., 1999).



**Fig3.** Structure chimique des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont retrouvés dans les fruits et légumes sous forme glycosylée, ce qui rend la molécule plus hydrosoluble. Les sucres couramment rattachés aux flavonoïdes sont le glucose, le galactose, le rhamnose, la xylose, l'arabinose et des dissaccharides comme la rutinose. Les hétérosides de flavonoïdes sont en général solubles dans l'eau et les alcools. Leur extraction est donc réalisée le plus souvent par le méthanol dilué ou non dans de l'eau. En conclusion les phénols réagissent rapidement avec les radicaux libres, notamment les peroxydes en donnant un radical phénoxy incapable de propager la réaction radicalaire. De plus, les polyphénols circulants sont majoritairement des formes conjuguées avec des sucres, ce qui laisse supposer que ce sont les métabolites conjugués des polyphénols qui sont biologiquement actifs (Kähkönen M et al., 1999)

### **I.3. *Centaurea fragilis***

Le genre *Centaurea* de la famille des astéracées est l'un des genres les plus répandus dans le monde, il est distribué aussi bien sur le territoire algérien qu'en Europe méridionale, dans le bassin méditerranéen, à l'ouest de l'Asie et sur le continent Américain, compte environ 700 espèces (Zater, 2017). En Algérie, il est représenté par 45 espèces dont 7 d'entre eux sont localisés au sud (Sahara) (Azzouzi et al., 2016).

Les espèces appartenant au genre *Centaurea* sont des herbacées annuelles, vivaces et arbrisseaux. Possédant des feuilles à épines faibles et peu piquantes. Les fleurs sont toutes tubulées, les externes souvent plus grandes stériles et étalées. Les aigrettes des fleurs centrales à soies lisses ou dents courtes. Les bractées involucreales terminées par une formation différenciée qui porte une épine pectinée (Medjroubi, 2016).

L'espèce *centaurea fragilis* est une plante rigide, de 30-40 cm de longueur. Les tiges sont anguleuses, grêles et rameuses. Les feuilles sont coriaces, non décurrentes sur la tige; les supérieures lancéolées entières. Les capitules sont petits de 10 cm de large sur 2-2,5 cm de long.

Akènes marbrés à aigrette nettement marquée (1/2 de l'akène). Appendice des bractées à 5 épines minuscules (2-3 mm env.) et de couleur à peine plus foncée que le corps de la bractée (Azzouzi, 2017).



**Fig.4.** Photographie de plante *centaurea fragilis*

Leur systématique est représentée dans le tableau 1.

**Tableau 1:** Systématique de la plante *Centaurea fragilis* (Quezel et Santa, 1963)

<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Ordre</b>	Astérales
<b>Famille</b>	Asteraceae
<b>Sous-famille</b>	Tubiflores
<b>Tribus</b>	Cynarées
<b>Genre</b>	<i>Centaurea</i>
<b>Espèces</b>	<i>Centaurea fragilis</i> Dur.

### I.3.1. Intérêt thérapeutique et utilisation en médecine traditionnelle

Le genre *Centaurea* présente une grande diversité structurale dans les principaux composés bioactifs, y compris les triterpènes, les composés phénoliques notamment les flavonoïdes, les lignanes et les lactones sesquiterpénique. Les études chimiques des espèces de ce genre ont montré également leur richesse en stéroïdes et alcaloïdes. Plusieurs espèces de ce genre ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités comme le traitement du cancer, des infections microbiennes et comme stimulant, tonique, antidiabétique, diurétique, antirhumatismale, analgésique, cytotoxique, antibactérien et antifongique (Zater, 2017).

Parmi les espèces les plus connues par leurs richesses en métabolites secondaires et leurs usages médicinales on trouve: *Centaurea calcitrapa* L., *Centaurea jacea* L., et *Centaurea sinaica* sont utilisées dans le traitement de la fièvre (Yesilada, 2002). *Centaurea behen* L ; est utilisé dans le traitement des troubles d'estomac (Erol et al., 1999). *Centaurea maroccana* ; a un effet protecteur contre l'hépatotoxicité (Schauenberg et al., 2006). *Centaurea chamaerhaponticum* Ball ; a un effet contre les palpitations, et elle est utilisée pour le traitement des maladies du foie, de l'estomac et de l'intestin (Bellakhder, 1997). *Centaurea pullata* L, et *centaurea grisebachii* (Nyman) ; ont un effet analgésique contre des douleurs abdominales induites par l'acide acétique. Car elles peuvent être thérapeutiquement utile pour atténuer la douleur inflammatoire (Koukoulista et al., 2008).

**Tableau. 2.** Propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Centaurea*

Propriétés thérapeutiques	Espèce	Réf
Antioxydante	<i>C. calcitrapa</i> subsp. <i>calcitrapa</i> <i>C. spicata</i> . <i>C. microcarpa</i>	Erol-Dayi et al., 2011 Erol-Dayi et al., 2011 Louaar, S et al., 2014
Anti-inflammatoire	<i>C. alexandrina</i> . <i>C. iberica</i> rev. ex Spreng. <i>C. ainetensis</i>	Kubacey et al., 2012 Koca et al., 2009 Talhoket al., 2008
Anticancéreux	<i>C. alexandrina</i>	Kubacey et al., 2012
Antimicrobienne	<i>C. stenolepis</i> . <i>C. spruneri</i> . <i>C. solstitialis</i> L. ssp. <i>solstitialis</i> .	Sen et al., 2014 Ćirić et al., 2011 Ozcelik et al., 2009
Antidiabétique	<i>C. alexandrina</i>	Kubacey et al., 2012
Antivirale	<i>C. solstitialis</i> L. ssp. <i>solstitialis</i>	Ozcelik et al., 2009
Anticholinestérasique	<i>C. pyrrhoblephara</i> . <i>C. antalyense</i>	Aktumsek et al., 2013
Cytotoxique	<i>C. scoparia</i> <i>C. calcitrapa</i> subsp. <i>calcitrapa</i> <i>C. ptochimopappa</i>	Ahmed et al., 2014 Erol-Dayi et al., 2011

## **PARTIE II**

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## II.1. Matériel

Les différents produits chimiques utilisés dans notre étude ont été fournis par le laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, sauf le méthanol qui a été fournis par la société moderne de la santé, et le DPPH qui a été offert par Dr ZABAYOU Nada (Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Mohammed Seddik Ben Yahia, Jijel).

L'étude est portée sur les racines d'une espèce de la famille des Asteraceae qui est *Cf*, récoltée au mois de mai 2019 dans la région d'Ouled Bounnar dans la wilaya de Jijel. L'identification botanique de cette espèce a été réalisée par Mr SEBTI Mohammed (Département des Sciences Environnementales et Sciences Agronomiques, Université Mohammed Seddik Ben Yahia, Jijel).

Pendant notre étude expérimentale *in vivo* (fin de mois de juin 2019), on a utilisé 24 souris Swiss Albinos ayant un poids variant entre 20 et 25 g, qui proviennent de l'institut pasteur d'Alger. Les souris sont mises en quarantaine pendant 5 jours. Ils sont placés dans des cages métalliques et en plastiques avec un accès libre d'eau et de nourriture standard, au sein de l'animalerie de sciences de la nature et de la vie de l'université de Jijel, à une température et humidité ambiantes et un cycle naturel de lumière et d'obscurité.

## II.2. Préparation des extraits bruts des racines de *Centaurea fragilis*

Après avoir bien nettoyé les plantes (enlever les tiges et les feuilles), les racines ont été séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière. La matière sèche a été ensuite réduite en poudre fine à l'aide d'un broyeur.

Les extraits aqueux ont été préparés par une macération de 40 g de poudre des racines de *Cf* dans 444 ml de l'eau distillée. Après 72 heures, les extraits sont filtrés, suivi par une concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45 °C et un séchage dans une étuve portée à 40 °C (Cheurfa, 2019).

Pour préparer les extraits méthanoliques, 40g de poudre des racines de *Cf* a été mélangé avec 444 ml d'une solution méthanolique (80%) pendant 72 heures. Après la filtration, les extraits sont concentrés en utilisant l'évaporateur rotatif (45 °C) puis séchés dans une étuve à 40 °C (Cheurfa, 2019).

## II.3. Détermination du rendement

Le rendement des différents extraits est défini comme étant le rapport de la quantité de la matière végétale extraite sur la quantité de matière végétale utilisée. Il est calculé selon L'équation suivante : Le rendement (%) = (M ext x 100) /M éch (M ext est le poids de l'extrait sec et M éch est le poids sec de matériel végétal).

#### II.4. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

La teneur en phénols a été déterminée par le spectrophotomètre selon la méthode de Folin Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965), le réactif de couleur jaune est constitué d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de cette coloration est directement proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés.

Un volume de 0,2 ml de chaque extrait a été mélangé avec 1,5 ml de Folin-Ciocalteu (10 %). Après 5 minutes. 1,5 ml d'une solution de carbonate de sodium (7,5 %). Le mélange a été incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 1:30 h et l'absorbance a été lue à 760 nm au spectrophotomètre. L'acide gallique est utilisé comme standard de référence. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec ( $\mu\text{g EAA/g ES}$ ).

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (Baharun et *al.*, 1996). Les flavonoïdes possèdent un groupement OH libre en position 5 susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion  $\text{AL}^{3+}$ , la coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait.

1 ml d'extrait (1 mg/ml dans le méthanol) ou de la solution standard de quercétine ont été mélangés avec 1 ml d' $\text{AlCl}_3$  (2 %) dans le méthanol. Après 40 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 430 nm. Les concentrations des flavonoïdes ont été déduites à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait ( $\text{mg EQ/g d'extrait}$ ) (Baharun et *al.*, 1996).

#### II.5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse des extraits méthanoliques a été faite par GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse), qui permet l'identification et la quantification des molécules. Cette technique couple les performances de la chromatographie en phase gazeuse avec celles de la spectrométrie de masse, dans le but de la séparation des composés d'un échantillon et la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. Elle permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités et même sous forme de trace (Menet et *al.*, 2010). L'appareil de chromatographie en phase gazeuse est équipé d'une colonne de type OV1701 (25 m). Le gaz utilisé est l'Hélium avec un débit de 1,2 ml/min. Les échantillons sont injectés en split mode, la température d'injection est de 250°C. Le volume injecté est de 1 $\mu\text{l}$ . La température initiale est égale à 70°C pendant 3 min.

La température de la colonne augmente de 70°C à 130°C à raison d'une montée de 5 °Cmin<sup>-1</sup> et de 130°C à 240°C à raison de 20 °Cmin<sup>-1</sup>. La température finale est maintenue pendant 2 min. L'appareil de spectrométrie de masse fonctionne sous les conditions suivantes: la fragmentation a été effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV. La température de la source d'ionisation est égale à 200°C (Fadil et *al.*, 2015).

## II.6. Mise en évidence de l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux et méthanolique par le test de DPPH

Ce test est basé sur la mesure de l'aptitude d'un antioxydant à exercer un effet scavenger sur le radical libre DPPH\* (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). Le radical DPPH\* est réduit en son hydrazine correspondant lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune, l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 517 nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité antiradicalaire (Milardovic et *al.*, 2006).

Brièvement, la solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol (0,024 g/l). 50 µl des solutions des extraits à différentes concentrations (25 - 500 µg/ml) ou des standards (acide ascorbique) ont été ajoutés à 1,95 ml de DPPH, les mélanges ont été incubés dans l'obscurité pendant 30 minutes et la décoloration comparée au contrôle négatif contenant seulement la solution de DPPH mesurée à 517 nanomètres en utilisant un spectrophotomètre UV/visible. L'activité anti-radicalaire des extraits est exprimée en pourcentage d'inhibition du DPPH° et calculée par la formule suivante :

$$\text{pourcentage d'inhibition du DPPH}^\circ \text{ I\%} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{contrôle(-)}}} \times 100 \text{ (Ghedadba et al., 2015).}$$

## II.7. Préparation du modèle animal

Pour reproduire le modèle de d'hépatotoxicité, nous avons utilisé le paracétamol selon le protocole de (Forouzandeh et *al.*, 2013), pour tester l'effet hépato-protecteur, *in vivo*, de l'extrait brut des racines de *Cf* à différentes doses et du APAP.

Les animaux ont été répartis en 6 lots de 4 animaux pour chacun :

- Le groupe **contrôle négatif** reçoit de l'eau distillée.
- Le groupe **contrôle positif** reçoit du APAP (500 mg/kg).
- Les deux groupes **contrôles** ont été traité avec l'extrait de *Cf* à une dose de 100 mg/kg, 200 mg /kg respectivement.
- Les deux groupes **Tests** ont reçu du APAP (500 mg/kg) après qu'ils ont été traités avec de l'extrait de *Cf* à une dose de 100 mg/kg pour l'un et 200 mg/kg pour l'autre.

L'administrant l'extrait brut des racines de *Cf* a été faite par voie intra-gastrique (5jours) (fig.5), selon leurs poids corporel, pendant 5 jours, le paracétamol a été administré (500 mg/kg) par voie intra-péritonéale (fig.5) après une heure de la dernière administration de l'extrait, après 24 heures les animaux ont été sacrifiés.



(a)



(b)

**Fig 5.** Traitement des souris. (a) Administration par voie intra-gastrique (b) Administration par voie intra-péritonéale.

## II.8. Préparation de la fraction cytosolique

Pour la préparation de la fraction cytosolique, 1 g du foie a été prélevé et directement plongé dans trois volumes de tampon phosphate (0,1 M à pH 7,4) contenant du KCl 1,17 %. Après découpe en morceaux fins et homogénéisation à l'aide du broyeur de DOUNCE, l'homogénat est centrifugé à 800 rpm pendant 15 minutes à 4 °C pour éliminer les débris nucléaires ; le surnageant est ensuite centrifugé à 9600 rpm pendant 45 minutes à 4 °C. Le surnageant final est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques (Belli et *al.*, 2010).

## II.9. Dosage des protéines totales

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH<sub>2</sub>) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines). Pour cela, 1ml de Bleu de Coomassie a été ajouté à 50 µl de l'échantillon dilués au 1/10<sup>ème</sup>. Ensuite le mélange est incubé à température ambiante pendant 20 min et la DO a été lue à 590 nm.

La concentration en protéines est déterminée à partir de la gamme d'étalonnage de l'albumine sérique bovine (BSA) de concentration (0-1 mg/ml).

## II.10. Dosage de glutathion

Le dosage du GSH est déterminé par la méthode colorimétrique d'Ellman (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 20 µl de la fraction cytosolique ont été prélevé et dilué dans 3 ml du tampon phosphate (0.01M, pH 8). Ensuite 20 µl de DTNB à 0.01 M est ajouté. Le mélange a été incubé pendant 5 minutes à 25° C et les densités sont ensuite mesurées à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions que le dosage, et les concentrations sont exprimés en milli moles de glutathion par mg de protéine.

## II.11. Mesure de l'activité de la SOD

La SOD est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>. Son dosage est réalisé avec le pyrogallol. L'auto-oxydation du pyrogallol est stable à pH acide mais elle est oxydée avec l'augmentation du pH, donc à pH=8 la SOD agit comme un inhibiteur puissant de l'oxydation spontanée de pyrogallol (Marklund et Marklund, 1974).

La mesure de l'activité de la SOD a été effectuée par spectrophotométrie à 25 ° C selon la méthode de Patel et Katyare (2006). De plus, les mesures ont été effectuées à pH est égale 8,2. Le milieu de dosage dans un volume total de 1,0 ml contenant: le tampon phosphate de potassium 100 mM (pH 8,2) et du pyrogallol 0,2 mM. L'autoxydation du pyrogallol a été contrôlée à 420 nm pendant 3 min en absence et en présence d'enzyme.

Une unité de SOD: c'est l'équivalent de la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber le ratio de l'auto-oxydation du pyrogallol par 50%. L'activité de SOD, exprimée en Unité/mg, a été calculée en utilisant l'équation suivante:

(DO/min) test : changement de l'absorbance de l'échantillon pendant une minute.

(DO/min) B: changement de l'absorbance du blanc pendant une minute.

$$\text{Activité de la SOD (units /g poids net)} = \frac{\% \text{inhibition}}{50\%} \times \text{Poids net}$$

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(\text{DO/min}) \text{ test} / (\text{DO/min}) \text{ B}] * 100$$

## II.12. Mesure de l'activité de la CAT

La méthode utilisée est basée sur la propriété de la catalase à dégrader le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. L'activité de cette enzyme est mesurée par analyse spectrophotométrique (240 nm) du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène en présence d'une source enzymatique (homogénat ou plasma). L'activité enzymatique est estimée en mesurant la différence d'absorbance par unité de temps (Aebi et al., 1984).

L'activité de la CAT est déterminée par le mode opératoire décrit par Claiborne, (1986). Un volume de 983,5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,091 M) préparé dans le tampon KHPO<sub>4</sub> (0.1 M, pH 7.2) a été ajouté à 16,5µL d'homogénat. Les mesures sont réalisées dans des cuves en quartz et l'échantillon est mesuré contre le blanc. L'absorbance est lue deux fois à 240 nm chaque 15 secondes à l'aide d'un spectrophotomètre. L'activité de la catalase a été exprimée en unité par mg de protéine du foie.

L'activité de la CAT a été mesurée selon la formule suivante :

$$\text{CAT} = 2.303/T \times \log (A1/A2)$$

Dont : T : Interval de temps en minute.

A1 : Absorbance à t0

A2 : Absorbance à t1

### II.13. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes ± l'écart-types. L'évaluation statistique est effectuée par le test de Student. La valeur trouvée par ce test peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur  $p$ . la différence est considéré statistiquement significative au seuil de 5% ( $p < 0,05$ ).

$P > 0.05$  : la différence n'est pas significative (ns).

$P < 0.05$  : la différence est significative (\*) ou (a).

$P < 0.01$  : la différence est hautement significative (\*\*) ou (b).

$P < 0.001$  : la différence est très hautement significative (\*\*\*) ou (d).

## **PARTIE III**

# **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### III. Résultats et discussion

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

Notre choix repose sur le fait que le genre *Centaurea* a montré d'une part qu'il est doué d'activités biologiques et d'autre part que c'est un excellent accumulateur de molécules de type lactone sesquiterpénique et flavonique, ces classes ont montré des activités biologiques notamment cytotoxique pour la première et antioxydante pour les secondes.

La méthode de macération utilisée pour la préparation de l'extrait méthanolique donne une pâte marron caramel avec un rendement de 8,5 %. Tandis que, l'extrait aqueux donne une pâte marron clair avec un rendement est égale (2,65 %).

**Tableau.3.** Rendement des deux extraits aqueux et méthanolique des racines de *Cf*.

Plante	Extrait	Aspect	Couleur	Rendement
<i>centaurea fragilis</i>	Aqueux	Poudre	Marron clair	2,65 %
	Méthanolique	Pâteux	Marron caramel	8,5 %

L'extraction est une étape très importante dans l'isolement, l'identification et l'utilisation de composés phénoliques et il n'existe pas de méthode d'extraction unique et standard. Extraction par solvant (Baydar et *al.*, 2004 ; Bucic et *al.*, 2007) et extraction avec un fluide supercritique (Fredj et François, 1990 ; Palma et Taylor, 1999 ; Nahar et Sarker, 2005 ; Bleve et *al.*, 2008) sont les techniques les plus couramment utilisées pour l'isolation de composés phénoliques.

Un grand nombre d'articles de la littérature traitent de l'extraction et de l'analyse de polyphénols à partir de matières dérivées de plantes, notamment des fruits, des légumes, du vin, du café, du thé, des herbes, des céréales et des légumineuses telles que les haricots (Balasundram et *al.*, 2006 ; Luthria et Pastor, 2006 ; Naczk et Shahidi, 2006).

Les composés phénoliques ont été extraits par broyage, séchage ou lyophilisation de fruits, de légumes et d'herbes aromatiques ou uniquement par trempage de plantes fraîches avec extraction ultérieure au solvant (Merken et Beecher, 2000). Ces méthodologies impliquent la co-extraction de substances non phénoliques, telles que les sucres, les acides organiques et les protéines, nécessitant des processus de purification ultérieurs (par exemple, l'extraction en phase solide) (Castañeda et *al.*,

2009). L'extraction par solvant, en fonction de l'état de la biomasse, peut-être une extraction liquideliquide ou une extraction solide-liquide.

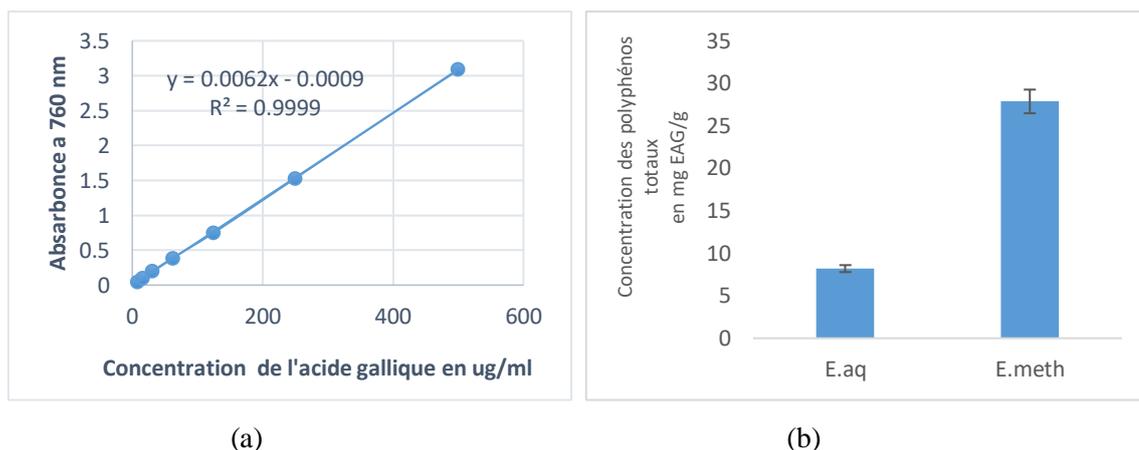
L'extraction solide-liquide ou la lixiviation peuvent être définies comme un phénomène de transport de masse dans lequel les solides contenus dans une matrice solide migrent dans un solvant mis en contact avec la matrice. Les phénomènes de transport de masse peuvent être amplifiés par les changements de gradients de concentration, de coefficients de diffusion ou de couche limite (Corrales, Fernández et *al.*, 2009). Il s'agit d'une opération unitaire très utilisée pour récupérer de nombreux composants alimentaires importants: le saccharose dans la canne à sucre ou la betterave, les lipides provenant des graines oléagineuses, les protéines dans les tourteaux de graines oléagineuses, composés phytochimiques de plantes, hydrocolloïdes fonctionnels d'algues et composés polyphénoliques de plantes, fruits, légumes, etc.

Les méthodes d'extraction des solvants les plus courantes sont celles qui utilisent du méthanol ou de l'éthanol acidifié comme agents d'extraction (Awika et *al.*, 2005 ; Lapornik et *al.*, 2005 ; Amr et Al-Tamimi, 2007 ; Caridi et *al.*, 2007). Parmi ces méthodes, l'extraction au méthanol est la plus efficace (Kapasakalidis et *al.*, 2006); en fait, il a été constaté que, lors de l'extraction d'anthocyanes de la pulpe de raisin, l'extraction au méthanol est 20% plus efficace que l'extraction à l'éthanol et 73% plus efficace que l'extraction à l'eau (Castañeda et *al.*, 2009). L'éthanol pour l'industrie alimentaire est préféré en raison de la toxicité du méthanol.

### **Polyphénols totaux et flavonoïdes**

Afin de caractériser les extraits du *Cf*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués. La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi., 1965). L'acide gallique a été utilisé comme standard.

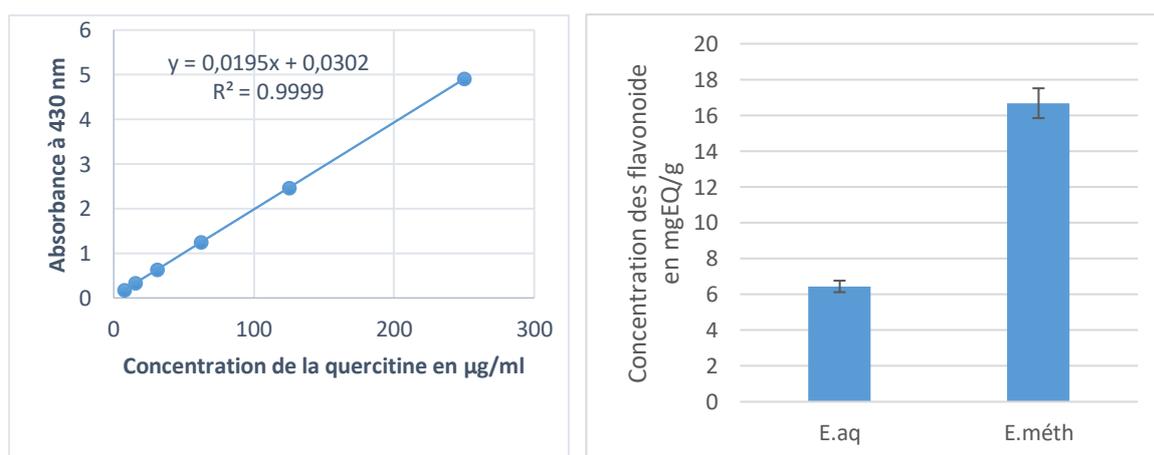
Les résultats présentés dans la fig.6 sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique, ayant l'équation:  $y = 0,0062x - 0,0009$  avec un coefficient de corrélation  $R^2=0.9999$ .



**Fig.6. Estimation des teneurs en polyphénols des extraits aqueux et méthanolique de la plante Cf.** (a) courbe d'étalonnage pour la quantification des polyphénols (b) teneurs en polyphénol en mg EQG/g des extraits aqueux et méthanolique de Cf. E.aq: extrait aqueux, E.méth : extrait méthanolique. EAG : équivalente d'acide gallique.

D'après les résultats, on constate que tous les extraits de la plante sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes, où l'extrait méthanolique ( $27,86 \pm 0,18$  mg EAG/g E) contient la teneur la plus élevée en polyphénols par rapport à l'extrait aqueux ( $8,19 \pm 0,16$  mg EAG/g E).

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium en utilisant comme standard la quercétine. Les résultats sont représentés dans la fig.7. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de MS). Les taux des flavonoïdes des extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage de quercétine, selon l'équation suivante:  $y = 0,0195x + 0,0302$  avec un coefficient de corrélation  $R^2=0.9999$ .



**Fig.7. Estimation des teneurs en flavonoïdes des extraits aqueux et méthanolique de la plante Cf** (a) courbe d'étalonnage pour la quantification des flavonoïdes (b) teneurs en flavonoïde en mg EQG/g des extraits aqueux (E.aq) et méthanolique (E.méth.). EQG : équivalente de quercitrine.

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait méthanolique est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de  $16,68 \pm 0,47$  mg EQ/mg d'extrait suivi par extrait aqueux ( $6,44 \pm 0,22$  mg EQ/mg d'extrait).

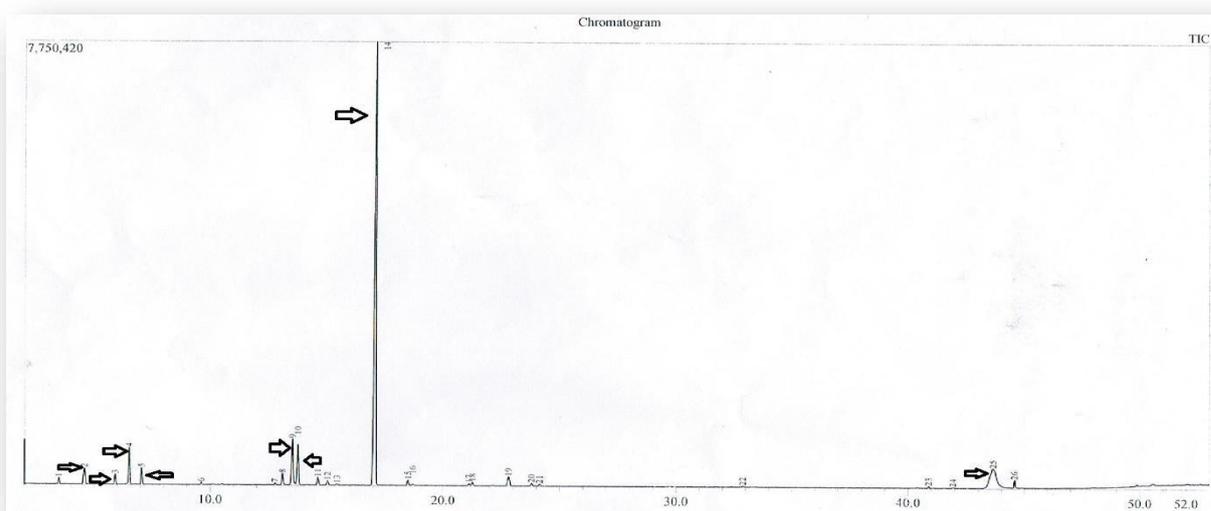
Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, la localisation géographique (Ryan *et al.*, 1999 ; Anusuya et Manian, 2013), les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (Perron et Brumaghim, 2009), la température et le solvant d'extraction (Sousa *et al.*, 2006 ; Conde *et al.*, 2009).

Peu de travaux concernant les teneurs en composés phénoliques de l'espèce étudiée ont été réalisés. Les teneurs en polyphénols totaux des extraits de *Cf* sont relativement identiques à ceux trouvés par Ugur et ses collaborateurs (2009) sur d'autre espèce du même genre obtenu en d'autres parties.

L'identification des différents constituants de l'extrait méthanolique de la plante *Cf* est réalisée par CPG/SM en comparaison avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée.

Les résultats de l'identification des constituants de l'extrait méthanolique, sont présentés dans le tableau. 4. Ces derniers regroupent les données expérimentales suivantes:

- Le nom de la molécule identifiée,
- Le temps de rétention,
- Les concentrations relatives des différentes molécules exprimées en %, □ Nombre de pic.



**Fig.8.** Analyse CPG/SM de l'extrait méthanolique de *Cf*. 1 $\mu$ l de l'extrait méthanolique a été injecté dans l'appareil, avec un détecteur à ionisation de flamme et un gaze vecteur d'hélium, et soumis à une température progressive de 70 à 240 °C selon (Fadil *et al.*, 2015). Les pics les plus importants sont indiqués dans la figure par des flèches.

L'analyse de l'extrait méthanolique de *Cf* a entraîné l'identification de 26 composés. Les résultats de cette identification sont regroupés dans le tableau 4. Le pulegone est le composé majoritaire avec un pourcentage de 62,96 %.

**Tableau.4.** Composés chimiques majoritaires de l'extrait méthanolique de *Cf*.

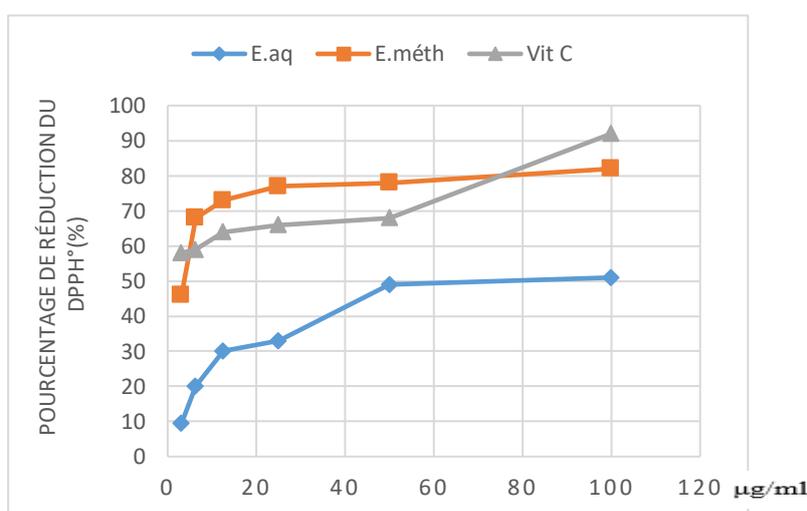
Temps de rétention	Pourcentage	N° de pic	Composés
4.57	2,22	2	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-
5.92	0,96	3	Limonene
6.53	3,73	4	Eucalyptol
7.06	1,55	5	3-Octanol
13.51	5,69	9	Cyclohexanol,5-methyl-2-(1-methylethyl) -, (1-methylethyl) -, (1.alpha.,2.beta.,5.beta.)-
13.74	4,84	10	Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, (2R-cis)-
17.08	62,96	14	Pulegone
43.64	9,82	25	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester

L'extrait méthanolique de *CF* est composée principalement de Bicyclo [3.1.0] hexane, 4 methylene-1-(1-methylethyl)-(2,22 %), de Limonene (0,96 %), de Eucalyptol (3,73% ), de 3 Octanol(1,55%), de cyclohexano1,5-methyl-2-(1-methylethyl),(1-methylethyl), (1.alpha.,2.beta,5 beta )-(5,69 %), de Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, (2R-cis)- (4,84 %), de Pulegone (62,96 %) et de 1, 2-Benzene dicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester (9,82 %).

Finalement, l'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse nous a permis d'identifier plusieurs composés chimiques tels que lessabinène (pic N°2), les hydrocarbure (pic N°3), les menthols (pic N°9), les menthone (pic N°10) etc., mais ne nous permettait pas de détecter les substances appartenant à la famille des flavonoïdes.

Nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits par le test du radical DPPH qui permet de mesurer la capacité de piégeage des radicaux libres. Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite avec une perte de la couleur violette. La décoloration est proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel à 517 nm. Elle permet d'évaluer le taux de réduction du DPPH et fournit donc un moyen pratique pour mesurer le pouvoir antioxydant des extraits étudiés.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique étudiée par le test de DPPH sont exprimés par le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits et sont représentés graphiquement (Fig.9).



**Fig.9. Les pourcentages de l'activité antioxydant des extraits aqueux et méthanolique de *Cf* ainsi que la vitamine C vis-à-vis du radical libre DPPH.**

Nous constatons que l'extrait méthanolique de la plante *Cf* présente un très bon pouvoir antioxydant. En effet, à la concentration de 100 µg/ml l'extrait testé réduit plus de 80% du radical DPPH ( $82,20 \pm 1,34$  %). Activité relativement moins à celle du témoin positif, la Vit C qui est inhibé avec  $92,73 \pm 1,44$  %. Tandis que pour l'extrait aqueux, nous avons trouvé une inhibition moins de 23% à celle de l'extrait méthanolique ( $50,31 \pm 0,57$  %).

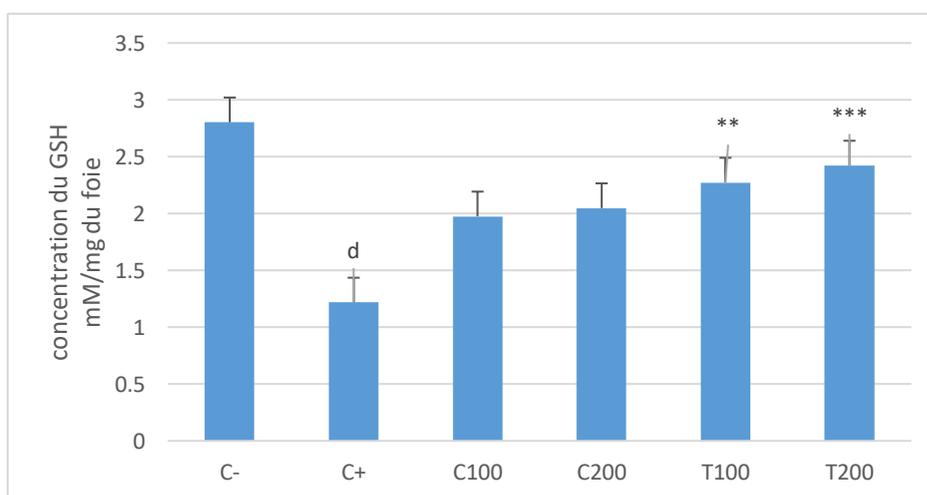
Ce pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique est expliqué par la présence des composés phénoliques notamment les flavonoïdes présents dans la plante étudiée, et qui sont connus comme substances antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène.

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

Dans le but d'évaluer les propriétés hépatoprotectrices de l'extrait méthanolique de CF, les souris reçoivent quotidiennement ces extraits par voie orale pendant 5 jours. Ensuite, l'hépatotoxicité est induite par l'injection intra-péritonéale du APAP.

La toxicité induite chez les souris par l'APAP, ainsi que l'effet hépatoprotecteur d'extrait de CF sont estimés via l'évaluation des paramètres antioxydants (L'effet de l'extrait méthanolique sur la catalase, la SOD et GSH est évalué au niveau du surnageant du foie des souris traités).

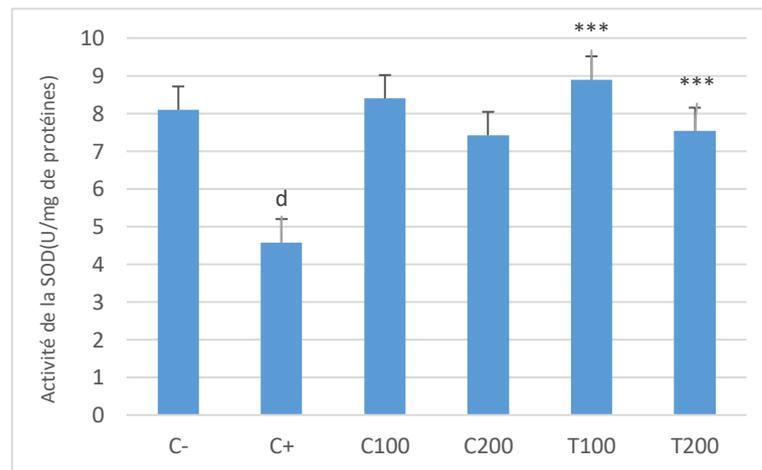
Le taux hépatique du GSH est présenté dans la figure 10. Chez les souris traitées par le paracétamol, nous avons constaté une diminution significative du taux du GSH hépatique par rapport à celui enregistré chez les témoins sains. Par contre, la déplétion du GSH hépatique causée par l'APAP a été restaurée par l'administration de l'extrait méthanolique de *Cf* pendant 5 jours à la dose quotidienne de 100 /200 mg/kg où nous avons constaté une augmentation du taux de GSH par rapport au lot de APAP. Nos résultats sont en accord avec ceux apportés par Fakurazi et *al.*, (2012) qui ont trouvés une diminution du taux hépatique en GSH après un traitement des souris par le paracétamol. Dans le cas du traitement hépato-préventif, le traitement avec 100/200 mg/Kg de l'extrait méthanolique a montré une diminution non significative du taux de GSH par rapport aux rats traités avec APAP.



**Fig.10. Evaluation de l'activité cytosolique de la GSH dans les tissus hépatiques des souris intoxiqués par l'APAP et traités par l'extrait méthanolique de la plante *Cf*.** l'activité de la GSH a été quantifiée dans la fraction cytosolique du tissu hépatique provenant d'animaux traité ou non par l'APAP et l'extrait méthanolique de *Cf* et ceci, selon le protocole (Ellman., 1959) ; C- : contrôle négatif (l'eau distillée) ; C+ : contrôle positif (APAP 500 mg/kg) ; contrôle 100 : (l'extrait à 100 mg/kg et l'eau distillée) ; contrôle 200 : (L'extrait à 200 mg/kg et l'eau distillée) ; Test 100 : (L'extrait 100 mg/kg et APAP à 500 mg/kg) ; Test 200 : (L'extrait à 200 mg/kg et APAP à 500 mg/kg) ; chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=4) ; \* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe des souris contrôle,  $p^a \leq 0.05$ ,  $p^b \leq 0.01$ ,  $p^d \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe des souris témoins. ns : une différence non significative.

Les cellules possèdent un système de défense antioxydant incluant des enzymes telles que la SOD. La production de superoxyde provient de différentes sources, telles que l'autooxydation des leucoflavines et les produits des mitochondries. Dans les maladies humaines, le superoxyde est produit par l'oxydation aérobie des purines par la xanthine oxydase (Aruoma, 1994). Le rôle de l'épuisement en superoxydedismutase dans la pathogenèse de l'intoxication par le paracétamol par diverses études réalisées dans différents modèles expérimentaux (Gill et *al.*, 2012, Patel et *al.*, 2012). Une diminution de la production de SOD peut être attribuée à une production accrue de superoxyde et à l'utilisation de cette enzyme au cours de la détoxification des métabolites réactifs.

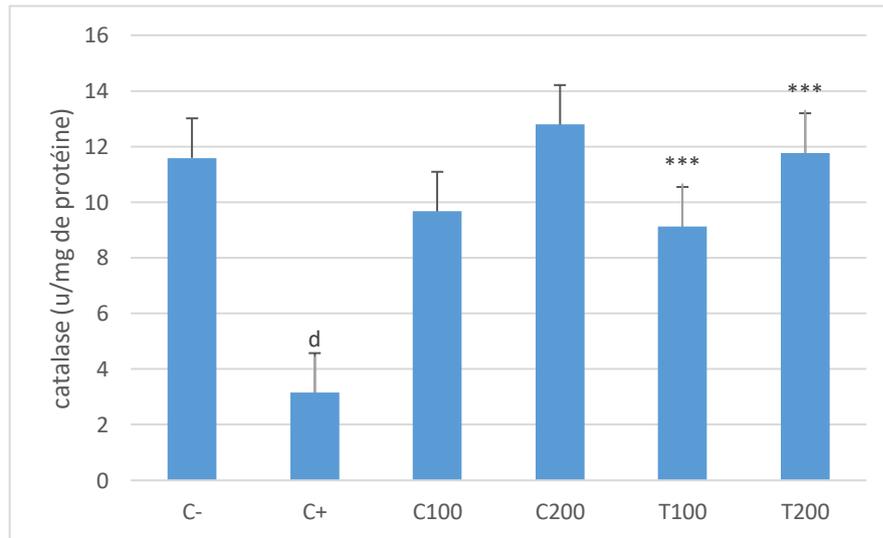
Nos résultats (Fig.11) montrent une diminution de l'activité enzymatique de la SOD hépatique avec une différence hautement significative chez le lot des souris traitées par l'APAP (500mg/kg) par rapport au lot des souris témoins. L'administration de l'extrait méthanolique de *Cf* induit une augmentation de l'activité enzymatique de la SOD hépatique avec une différence hautement significative (chez les lots du test 100 et le test 200, par rapport aux souris traitées par l'APAP seul (Fig. 11).



**Fig.11. Evaluation de l'activité cytosolique de la SOD dans les tissus hépatiques des souris intoxiqués par le paracétamol et traités par l'extrait méthanolique de la plante *Cf*.** l'activité de la SOD a été quantifiée dans la fraction cytosolique du tissu hépatique provenant d'animaux traité ou non par l'APAP et l'extrait méthanolique de *Cf* et ceci, selon le protocole Patel et Katyare (2006) C- : contrôle négatif (l'eau distillée) ; C+ : contrôle positif (APAP 500 mg/kg) ; contrôle 100 : (l'extrait à 100 mg/kg et l'eau distillée) ; contrôle 200 : (L'extrait à 200 mg/kg et l'eau distillée) ; Test 100 : (L'extrait 100 mg/kg et APAP à 500 mg/kg) ; Test 200 : (L'extrait à 200 mg/kg et APAP à 500 mg/kg) ; chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=4) ; \* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe des souris contrôle,  $p^a \leq 0.05$ ,  $p^b \leq 0.01$ ,  $p^d \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe des souris témoins. ns : une différence non significative.

Dans notre étude nous avons constaté une réduction significative de l'activité de la CAT au niveau du foie chez les souris témoins injectés par l'APAP par rapport aux souris saines (Fig. 12). D'autre part, on a constaté que l'administration de l'extrait méthanolique (200 mg/Kg) a permis une augmentation hautement significative de l'activité de la CAT réduite par l'administration du APAP.

Cette augmentation est de l'ordre de 75,35 %, qui est supérieure à celle des souris du contrôle négatif. L'augmentation de l'activité de la CAT peut être dû à la réactivité par des principes actifs présents dans l'extrait méthanolique de *Cf*, qui ont pu provoquer une augmentation de la capacité de détoxification par l'amélioration de la capture des radicaux libres. De nombreux travaux ont montré l'effet hépatoprotecteur des plantes médicinales (AL-Shabanah et al., 2000 ; Teocharis et al., 2001 ; Brai et al., 2014).



**Fig.12. Intoxiqués par l'APAP et traités par l'extrait méthanolique de la plante *Cf*.** l'activité de la CAT a été quantifiée dans la fraction cytosolique du tissu hépatique provenant d'animaux traité ou non par l'APAP et l'extrait méthanolique de *Cf* et ceci, selon le protocole Claiborne (1986). C- : contrôle négatif (l'eau physiologique) ; C+ : contrôle positif (APAP (500 mg/kg) ; contrôle 100 : (l'extrait à 100 mg/kg et l'eau distillée) ; contrôle 200 : (L'extrait à 200 mg/kg et l'eau distillée) ; Test 100 : (L'extrait 100 mg/kg et APAP à 500 mg/kg) ; Test 200 : (L'extrait à 200 mg/kg et APAP à 500 mg/kg) ; chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=4) ; \* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe des souris contrôle,  $p^a \leq 0.05$ ,  $p^b \leq 0.01$ ,  $p^d \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe des souris témoins ns : une différence non significative.

Les lésions du foie induites par différents agents hépatotoxiques sont reconnues comme un problème majeur toxicologique qui conduit à la mort. Les médicaments classiques qui stimulent la fonction hépatique et offrent une protection du foie sont rares et sont hépatotoxiques à une certaine dose. Le traitement naturel basé sur l'utilisation des plantes médicinales est considéré comme étant efficace et sans effets indésirables (Arem et al., 2014).

La présente étude a pour but d'évaluer l'activité hépatoprotectrice de l'extrait méthanolique de *Cf*, une plante médicinale largement utilisée pour un certain nombre de maladies, y compris le diabète, la malaria ainsi que les maladies de la peau et du foie. Pour l'étude de l'activité hépatoprotectrice de l'extrait de *Cf*, un modèle très utilisé (Mayuren et al., 2010) où l'hépatotoxicité est induite par l'APAP a été utilisé. A des doses élevées, l'APAP devient toxique et peut induire une nécrose hépatique fatale (Gujrati et al., 2007).

En effet, à forte doses il est oxydé par le cytochrome P450 en NAPQI nocif et hautement réactif (Ibrahim et *al.*, 2011). A l'état normal, ce produit est conjugué rapidement avec le GSH et excrété dans les urines (Mayuren et *al.*, 2010, Mazaleuskaya et *al.*, 2015). Lorsque le taux de NAPQI formé est supérieur au GSH disponible pour la conjugaison, le NAPQI non lié devient toxique en réagissant avec les macromolécules cellulaires (Shah et Deval., 2011). Ce produit toxique se lie de manière covalente à des protéines intracellulaires contenant des groupements sulfhydryle et par conséquent, il conduit à une nécrose hépatique centrolobulaire (Salminen et *al.*, 2012), une perturbation de l'homéostasie calcique, un dysfonctionnement mitochondrial, et un stress oxydant comme il peut conduire à des endommagements cellulaires aboutissant à la nécrose (Hinson et *al.*, 2010 ; Bhattacharyya et *al.*, 2013).

Notre étude suggère que la diminution marquée au niveau de l'activité des enzymes antioxydantes observée après administration d'une dose toxique unique du APAP est une manifestation claire d'inactivation ou d'échec des enzymes antioxydantes à éliminer la formation excessive de radicaux libres entraînant l'accumulation de radicaux libres et le déséquilibre rédox qui à son tour propage, le stress oxydatif et les lésions hépatiques. En corrélation avec nos résultats, il a été signalé que le surdosage en paracétamol pouvait provoquer une hépatotoxicité par des mécanismes déclenchant la formation d'espèces réactives de l'oxygène, telles que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $HO \cdot$ ), espèces Réactives de l'azote (RNS), telles que l'oxyde nitrique etperoxynitrite ( $ONOO \cdot$ ). Le niveau élevé de ERO présentait une cascade de dommages oxydatifs entraînant un stress oxydatif, lequel induit à son tour diverses actions délétères, notamment l'activation de la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines thiols, en particulier dans les mitochondries, la réponse inflammatoire et la fragmentation de l'ADN qui propagent la lésion hépatocellulaire et la nécrose centrolobulaire du foie. Par conséquent, le stress oxydatif constitue un mécanisme majeur sous-jacent à la pathogenèse des lésions hépatiques induites par l'APAP (FDA, 2009 ; Jaeschke et Bajt, 2010).

Le glutathion joue un rôle dans l'élimination des espèces de radicaux libres par le biais des activités GPx et GST et dans le maintien des thiols des protéines membranaires (Mandade, 2011).

La présente étude suggère que la diminution du GSH intracellulaire après administration d'une dose importante du APAP entraîne un mécanisme de détoxification inadéquat et une défaillance des mécanismes de défense anti-oxydants pour empêcher la formation d'une accumulation excessive de métabolites hautement toxiques (NAPQI) et de radicaux libres. Conformément à nos résultats, Parmar et ses collaborateurs., (2010) et Mandade (2011) ont montré que l'épuisement du GSH dans les mitochondries hépatiques est considéré comme le mécanisme le plus important de l'hépatotoxicité induite par l'APAP.

Par conséquent, les suppléments naturels susceptibles de servir de source ou d'améliorer la synthèse du GSH et d'activer le système de défense anti-oxydant sont particulièrement importants pour réduire les dommages oxydatifs cumulatifs et contrecarrer la toxicité du paracétamol.

Dans la présente étude, les groupes intoxiqués par le par l'APAP traité préalablement avec des extraits de racines testés pendant 5 jours ont été capables d'empêcher la diminution des activités des enzymes antioxydantes hépatiques et du GSH; par conséquent, ils empêchent l'accumulation excessive de radicaux libres et protègent le foie de l'intoxication par l'APAP. Ces mêmes hypothèses sont avancées dans les travaux de Chandan et ses collaborateurs., (2007) et Raja et ses collaborateurs., (2007) obtenus avec les espèces *Aloebarbadensis* et *Cytisusscorparius*.

**PARTIE IV**

**CONCLUSION**

L'objectif de ce travail était d'adopter des bases scientifiques pour l'évaluation de certaines études biologiques attribuées à la plante médicinale «*Centaurea fragilis* », choisie sur la base de son usage traditionnel. Dans cette étude, les extraits de cette plante semblent présenter un intérêt réel dans la protection contre les effets du stress oxydatif.

Le méthanol s'est avéré le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques, grâce à sa capacité d'extraire les molécules polaires et apolaires ce qui s'est traduit par le bon rendement obtenu avec ce solvant.

Après le dosage des principes actifs, nous nous sommes intéressés sur les vertus biologiques de cette plante, et plus précisément, l'activité antioxydante. L'activité antioxydante a été évaluée avec le test de DPPH, qui montre que les polyphénols de *Cf* ont un pouvoir antioxydant concentration-dépendante important.

Dans le cas de l'effet préventif, les résultats montrent une amélioration considérable dans le statut des marqueurs du stress oxydant (SOD, CAT et GSH) au niveau tissulaire. Ceci dû à la richesse de la plante en composés phénoliques, ce qui peut certifier l'effet protecteur du *Cf*.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont intéressants, cependant des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets. Ces études doivent être aussi orientées vers la détermination des composés actifs dans les extraits de *Cf* et l'évaluation de leurs effets sur les signalisations impliquée dans les processus de la toxicité hépatique ainsi que les enzymes impliquées dans la production des espèces oxygénées réactives.

## **PARTIE V**

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adams R P. Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectrometry. *Carol Stream (IL): Allured Publishing Corporation.* (2001).
- Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Antioxidant potential and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species. *Food and Chemical Toxicology.* (2013). 55: 290-296.
- Alam K, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM. Protective effect of amino guanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Life Sciences.* (2000). 66: 265-270.
- AL-Shabanah OA, Alam K, Nagi MN, Alrikabi AC, Al-Bekairi AM. Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbontetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Life Science.* (2000). 66(3): 265-270.
- Ames B, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* (1993). 90(17): 7915-7922.
- Amr, Al-Tamimi E. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *International journal of food science & technology.* (2007). 42(8): 985-991.
- Anusuya N, Manian S. Antioxidant and free radical scavenging potential of different solvent extracts of *indigofera tinctoria L* leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences.* (2013). 5(1):142-147.
- Arem A, Ghrairi F, Lahouar L, Thouri A, Saafi EB, Ayed A, Achour L. Hepatoprotective activity of date fruit extracts against dichloroacetic acid-induced liver damage in rats. *journal of functional foods.* (2014). 9: 119-130.
- Aruoma OI. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology.* (1994). 32(7): 671-683.
- Awika JM, Rooney LW, Waniska RD. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry.* (2005). 90(1-2): 293-301.

Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*. (2014). 2014:1-30

Azzouzi D, Mekkiou R, Demirtas I, Gül, F, Seghiri R, Boumaza O, Benayache F. Qualitative and Quantitative Analysis of Polar Extract from *Centaurea fragilis* Dur. Using HPLC-TOF/MS. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. (2016). 8(9): 1526-1528.

Azzouzi D. Investigation phytochimique et recherche d'activité biologique de deux espèces du genre *Centaurea* (Asteraceae). (Doctoral dissertation. *Université frères mentouri constantine*). (2017).

Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dine T, Luyckx M, Pinkas M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from haw thorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*. (1996). 46(11): 1086-1089.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. (2006). 99(1): 191-203.

Barouki, R. Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences*. (2006). 22 (3): 266-272.

Baydar NG, Özkan G, Sağdıç O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*. (2004). 15(5): 335-339.

Belli N, Mesbah L, Chebab S, Tekouk M, Leghouchi E. Stress oxydant induit par la coexposition au plomb et au cadmium: deux contaminants des eaux souterraines de Oued Nil (Jijel-Algérie). *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*. (2010). 23(3): 289-301.

Bhattacharyya S, Pence L, Beger R, Chaudhuri S, McCullough S, Yan K, James L. Acylcarnitine profiles in acetaminophen toxicity in the mouse: comparison to toxicity, metabolism and hepatocyte regeneration. *Metabolites*. (2013). 3(3):606-622.

Blache D, Bouthillier D, Davignon J. Acute influence of smoking on platelet behaviour, endothelium and plasma lipids and normalization by aspirin. *Atherosclerosis*. (1992). 93 (3):179-188.

Bleve M, Ciurlia L, Erroi E, Lionetto G, Longoc L, Rescioa L, et al. An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*. (2008). 64(2): 192–197.

Boonstra J, Post J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. (2004). 337: 1-13.

Bradford MM . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* . (1976). 72(1-2): 248-254.

Brai BI, Adisa RA, Odetola AA. Hepatoprotective properties of aqueous leaf extract of *Persea Americana*, Mill (Lauraceae) ‘Avocado’ against CCl<sub>4</sub>-induced damage in rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. (2014). 11(2): 237-244.

Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Bilić M, Velić D. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*. (2007). 81(1):236-242.

Buładak Ł, Łabuzek K, Buładak R J, Kozłowski M, Machnik G, Liber S, Okopień B. Metformin affects macrophages’ phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacological Reports*. (2014). 66(3): 418-429.

Caridi D, Trenerry VC, Rochfort S, Duong S, Laughher D, Jones R. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. (2007). 105(2): 691-699.

- Castañeda-Ovando A, Lourdes Pacheco-Hernández, Ma, Elena, Ma, PáezHernández, JA, RodríguezGalán-Vidal JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. (2009). 113: 859-871.
- Chandan, BK, Saxena, AK, Shukla, S, Sharma, N, Gupta, DK, Suri, KA, Singh B. Hepatoprotective potential of *Aloe barbadensis* Mill. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*. (2007). 111(3): 560-566.
- Cheurfa M, Allem R, Zabel K, Aichouni W, MedjkaneM. Étude des effets des extraits des racines de *Glycyrrhiza glabra* L. et *Zizyphus lotus* L. sur quelques bactéries pathogènes de l'Homme. *Phytothérapie*. (2019). 17(1): 15-21.
- Ćirić A, Karioti A, Glamočlija J, Soković M. Skaltsa H. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. Heldr. *Journal oh the Serbian Chemical Society*. (2011).76(1): 27-34.
- Claiborne AL. Catalase activity. *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. (1986). 16(1): 19-25.
- Conde E, Cara C, Moure A, Ruiz E, Castro E, Domínguez H. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*. (2009). 114(3): 806-812.
- Corcoran GB, Racz WJ, SmithCV, MitchellJR. Effects of N-acetylcysteine on acetaminophen covalent binding and hepatic necrosis in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (1985). 232(3): 864-872.
- Corrales M, García AF, Butz P, Tauscher B. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* (2009). 90(4): 415-421.
- Couic-Marinier F, Pillon F. Une angine à streptocoque  $\beta$ -hémolytique du groupe A. *Actualités Pharmaceutiques*. (2017). 56(565): 13-15.
- Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*. (2013). 62:170-185.

Defraigne J, Pincemail J. Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*. (2008). 63:10-19.

Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant , Aspects biologiques et pathologiques. *Éditions Médicales Internationales: France*. (2005). 1 : 87-108.

Desport J, Couratier P. Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition clinique et métabolisme*. (2002). 16(4): 253-259.

Ďuračková Z, Gvozdjaková A. Oxidants, antioxidants and oxidative stress. *In: Mitochondrial medicine. Springer, Dordrecht*. (2008). 19-54.

Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ and Brand MD. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *The EMBO journal* (2003). 22(16):4103-4110.

El Arem A, Ghrairi F, Lahouar L, Thouri A, Saafi EB, Ayed A, Achour L. Hepatoprotective activity of date fruit extracts against dichloroacetic acid-induced liver damage in rats. *journal of functional foods*. (2014). 9: 119-130.

Ellman GL. Plasma antioxidants. *Arch Biochemistry & Biophysics*. (1959). 82: 70–77

Ennaifer R, Cheikh M, Romdhane H, Nejma HB, Bougassas W, Hadj NB. Prise en charge de la douleur chez le cirrhotique: un dilemme?. *Journal Africain d'Hépatogastroentérologie*. (2015). 9(2) : 68-72.

Erol-Dayi Ö, Pekmez M, Bona M, Aras-Perk A, Arda N. Total phenolic contents, antioxidant activities cytotoxicity of Three Centaurea Species: *C calcitrapa subsp. Calcitrapa C. ptosimopappa C. spicata*. *Free Radicals and Antioxidants*. (2011). 1(2) : 31-36.

Fadil M, Farah, A, Ihssane B, Haloui T, Rachiq S. Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. by response surface methodology. *Journal of Materials and Environmental Science* . (2015). 6(8) : 2346-2357.

Favier A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. (2003). *11*(12):108-115.

FDA. Food and Drug Administration, HHS. Organ-specific warnings; internal analgesic, antipyretic, and antirheumatic drug products for over-the-counter human use; final monograph. Final rule. *Federal register*. (2009). *74*(81): 19385.

Forouzandeh H, Azemi ME, Rashidi I, Goudarzi, M. et Kalantari H. Study of the protective effect of *Teucrium polium*l. extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. (2013). *12*(1): 123-129.

Fredj D, Francois D. Purification of colored substances, especially anthocyanosides, from berries. *Patent No. FR 2641283*. (1990). *23*(2): 149-150.

Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. (1999). *53*(4): 169-180.

Ghedadba N, Hambaba L, Ayachi A, Aberkane MC, Bousselfela H, Oueld-Mokhtar, SM. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*. (2015). *13*(2) : 118-129

Gujrati V, Patel N, Rao VN, Nandakumar K, Gouda T S, Shalam MD, Kumar SS. Hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of leaves of *Tylophora indica* (Linn.) in rats. *Indian journal of pharmacology*. (2007). *39*(1): 43-47.

Guzik, TJ. Functional studies of NADPH oxidases in human vasculature. In: *Studies on Cardiovascular Disorders*. Humana Press, Totowa, NJ. (2010). 149-167.

Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*. (2007). *62*(10): 628-638.

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

Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. In *Adverse drug reactions*. Springer, Berlin, Heidelberg. (2010). 19:369-405.

Hoffmann, L. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). (2003). (*Doctoral dissertation, Université Louis Pasteur-Strasbourg I*).

Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB, Rhee SJ. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica Chimica Acta*. (2004). 340 (1-2): 107-115.

Hsu CL, Huang SL, Yen GC. Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. (2006). 54(12): 4191-4197.

Hsu CL, Yen GC. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*. (2007). 98(4): 727-735.

Hulbert AJ. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of Theoretical Biology*. (2005). 234(2): 277-288.

Ibrahim M, Khaja ZU, Narasu ML. Hepatoprotective activity of *Boswellia serrata* extracts: in vitro and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutical Applications*. (2011). 2(1): 89-98.

Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*. (2003). 10(23): 2495-2505.

Kabel AM. Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*. (2014). 2(3): 35-38.

- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*. (1999). 47(10): 3954-3962.
- Kapasakalidis PG, Rastall R A, Gordon MH. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of agricultural and food chemistry*. (2006). 54(11): 4016-4021.
- Koca U, Süntar IP, Keles H, Yesilada E, Akkol EK. In vivo anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. *Journal of ethnopharmacology*. (2009). 126(3): 551-556.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. (2002). 30(6):620-650.
- Kondjoyan N, Berdagué JL. A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds. *Ed. du Laboratoire Flaveur*. (1996). 33-88
- Koukoulista H, Skaltsa S, Djeddi A, Karioti M, Sokovic C . A nouvel sesquiterpene lactone from *centaureapullata* : structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (2008). 16(7): 3725-3731.
- Kubacey TM, Haggag EG, El-Toumy SA, Ahmed AA, El-Ashmawy IM, Youns MM. Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. *Journal of Pharmacy Research*. (2012). 5(6): 3352-3361.
- Lapornik B, Prošek M, Wondra AG. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*. (2005). 71(2): 214-222.
- Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. Stress oxydant et pathologies humaines: Bilan et perspectives préventives. *La Presse médicale*. (2001). 30(21): 1076-1081.

Louaar S, Zellagui A, Gherraf N, Medjroubi K, Derbre S, Seguin E, Laouer H, Akkal, S. Antiradical Activity of Flavonoids from the Algerian Native Plant: *Centaurea microcarpa* Coss. et Dur. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. (2014). 4(3): 249-253.

Luczaj W, Gegotek A, Skrzydlewska E . Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*. (2017). 111: 87-101.

Luthria DL, Pastor-Corrales MA. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L) varieties. *Journal of food composition and analysis*. (2006). 19(2-3): 205-211.

Mandade RJ. Hepatoprotective Activity of Ethanolic Extract of *Caesalpinia bonduc* (L.) in paracetamol Intoxicated Albino Rats. *International Journal of PharmTech Research*. (2011). 3(1): 430- 437.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. (1999). 424 (1-2), 83-95.

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

Marzuillo P, Guarino S, Barbi E. Paracetamol: a focus for the general pediatrician. *European Journal of Pediatrics*. (2014). 173(4): 415–425.

Mayuren C, Reddy VV, Priya SV, Devi VA. Protective effect of Livactine against CCl<sub>4</sub> and paracetamol induced hepatotoxicity in adult Wistar rats. *North American journal of medical sciences*. (2010). 2(10): 491.

Mazaleuskaya LL, Sangkuhl K, Thorn CF, FitzGerald GA, Altman RB, Klein TE. (2015). Pharm GKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenetics and genomics*. (2015). 25(8):416.

McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*. (2013). 30(9) : 2174–2187.

Medjroubi K. Etude phytochimique et biologique de *Bituminariabituminosa* (L.) CH Stirton (Fabaceae) et *Centaureadimorpha* Viv. (Asteraceae). (Doctoral dissertation, Université frères mentouri Constantine). (2016).

Mégarbane B. Intoxication par le paracétamol: quoi de neuf. *Médecine Intensive Réanimation*. (2017). 26(5): 383-395.

Menet MC, Fonsart J, Hervé F, Fompeydie D, Galliot-Guilley M, Noble F, Scherrmann JM. Determination of 3, 4-methylenedioxyamphetamine and its five main metabolites in rat urine by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with on line mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. (2010). B, 878(28): 2905-2910.

Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. (2000). 48(3): 577-599.

Merksamer PI, Liu Y, He W, Hirschev MD, Chen D, Verdin E. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging (Albany NY)*. (2013). 5(3): 144.

Miladovic S, Ivekovic D, Bozidar SG. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*. (2006). 68(2): 175-180.

Morse HN. Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. (1878). 11: 232-233.

Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. (2006). 41(5): 1523-1542.

Nahar L, Sarker SD. Supercritical fluid extraction. *Natural Products Isolation*. (2005). 20: 47-76.

Nevers P. Sémiologie des altérations de l'état de santé. 1ère éd. Paris: De Boeck Supérieur. (2017). 7-19

Orient A, Donko A, Szabo A, Leto TL, Geiszt M. Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrology Dialysis Transplantation*. (2007). 22(5):1281-1288.

Ozcelik B, Gurbuz I, Karaoglu T, Yeşilada E. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L.ssp. *solstitialis*. *Microbiological Research*. (2009). 164(5): 545-552.

Palma M, Taylor LT. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*. (1999). 849(1): 117-124.

Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G. Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2000). 112(3): 169-183.

Papas A. Diet and antioxidant status. In: Papas A, ed. Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. *Boca Raton, FL: CRC Press*. (1998). 89-94.

Patel SJ, Milwid JM, King KR, Bohr S, Iracheta-Vellve A, Li M, Yarmush ML. Gap junction inhibition prevents drug-induced liver toxicity and fulminant hepatic failure. *Nature biotechnology*. (2012). 30(2): 179.

Patel SP, Katyare SS. Differential pH sensitivity of tissue superoxide dismutases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. (2006).21(2): 129-133.

Percival M. Antioxidants. Clinical nutrition insights. *New York: Advanced Nutrition Publications Inc Revised*. (1996). 1-4.

Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell biochemistry and biophysics*. (2009). 53(2): 75-100.

Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. (2015). 97: 55-74.

Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Longstreth WT, Jr, Swanson PD, Checkoway H. Parkinson'disease risks associated with dietary iron, manganese, and other nutrient intakes. *Neurology*. (2003). 60(11):1761-1766.

Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales 2. *Tome I et II. Edition du centre nationale de la recherche scientifique*. (1963). 29-19.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S. Dhama K. Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*. (2014). 2014 : 1-14.

Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*. (2007). 2(2): 219-236.

Raja S, Nazeer Ahamed H, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A, Kumar Mukherjee P. Exploring the effect of *Cytisus scoparius* on markers of oxidative stress in rats. *Iranian journal of pharmacology and Therapeutics*. (2007). 6(1): 15-0.

Reichl FX. Médicaments In:Guide pratique de toxicology. *1ère éd. Paris: De boeck.P*. (2004). 74-75.

Rogers LK, Moorthy B, Smith CV. Acetaminophen binds to mouse hepatic and renal DNA at human therapeutic doses. *Chemical research in toxicology*. (1997). 10(4): 470-476.

Ryan MT, Müller H, Pfanner N. Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*. (1999). 274(29): 20619-20627.

Salminen WF, Yang X, Shi Q, Greenhaw J, Davis K, Ali AA. Green tea extract can potentiate acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food and chemical toxicology*. (2012). 50(5):1439-1446.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*. (2005). 81(1): 215-217.

Schauenberg et paris. *Centaurea maroccana* ball . *Phytochemistry* . (2006). 55(8): 903-908.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry*. (2007). 18(9):567-579.

Sen A, Gurbuz B, Gurer US, Bulut G, BitisL. Flavonoids and Biological Activities of *Centaurea stenolepis*. *Chemistry of Natural Compounds*. (2014). 50 (1): 128-129.

Shah VN, Deval K. Hepatoprotective activity of leaves of *Parkinsonia aculeata* Linn against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. (2011). 1(2): 59-66.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. (1965). 16(3): 144-158.

Sousa R, Dias S, Antunes JC. Spatial subtidal macrobenthic distribution in relation to abiotic conditions in the Lima estuary, NW of Portugal. *Hydrobiologia*. (2006). 559(1): 135-148.

Starlin T, Gopalakrishnan VK. enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *tylophora pauciflora* wight and ARN:an in vitro study/*Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* . (2013). 6(4): 68-71.

Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more?. *Cellular and Molecular Life Sciences*. (2007). 64(22): 2900-2916.

Talhouk RS, El-Jouni W, Baalbaki R, Gali-Muhtasib H, Kogan J. Tolhouk SN. Anti-inflammatory bio-activities in water extract of *Centaurea ainetensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*. (2008). 2(2): 024-033.

Theocharis SE, Margeli AP, Skaltsas SD, Spiliopoulou CA, Koutselinis AS. Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study. *Toxicology*. (2001). 161(1-2): 129-138.

- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*. (2003). 552(2): 335-344.
- Ugur A, Duru ME, Ceylan O, Sarac N, Varol O, Kivrak I. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Centaurea ensiformis* Hub.-Mor. (Asteraceae), a species endemic to Mugla (Turkey). *Natural Product Research*. (2009). 23(2):149-167.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*. (2009). 7(1): 65-74.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. (2007). 39(1): 44-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. (2006). 160(1): 1-40.
- Walker RM, Racz WJ, McElligott TF. Scanning electron microscopic examination of acetaminophen-induced hepatotoxicity and congestion in mice. *The American journal of pathology*. (1983). 113(3): 321.
- Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. (2001). 280 (5): E685-694.
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of agricultural and food chemistry*. (2004). 52(12): 4026-4037.
- Yesilada E. Biodiversity in Turkish Folk Medicine. In: *Biodiversity*. Springer, Boston, MA. (2002). 119-135.
- Zater H, Benayache F. Constituants chimiques, propriétés cytotoxiques, antifongiques et antibactériennes de l'extrait chloroforme de *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis*

(Coss. & Dur.) Maire (*Doctoral dissertation, Université frères mentouri Constantine*). (2017).

Zhao L, Pickering G. Paracetamol metabolism and related genetic differences. *Drug Metabolism Reviews*. (2011). 43(1): 41–52.

<b>Réalisé par:</b> BOUSSELOUB Oussama BOULAHIA Rima	<b>Encadreur:</b> Pr. RECHRECHE Hocine
<u><b>Thème</b></u> <b>Effet hépato-protecteur de l'extrait méthanolique de la plante <i>Centaurea fragilis</i> chez la souris intoxiquées par le paracétamol</b>	
<b>Résumé</b> <p>Le present travail a pour objectif d'évaluer les activités antioxydantes et antihépatotoxiques des extraits bruts de <i>Centaurea fragilis</i>. Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes révèle leur existence dans tous les extraits (Extrait aqueux et méthanolique), et l'extrait méthanolique est le plus riche en composés phénoliques avec un taux de <math>27,86 \pm 0,18 \mu\text{g EAG/mg}</math>. Les résultats obtenus <i>in vitro</i> montrent que les extraits sont dotés d'un pouvoir antioxydant important ; l'extrait méthanolique est le plus actif. <i>In vivo</i>, afin d'évaluer un pouvoir hépato-protecteur (préventif) chez les souris, l'hépatotoxicité a été induite par le paracétamol après le traitement des souris pendant 5 jours. L'extrait brut à 200 mg/Kg a montré un effet hépato-protecteur important avec une amélioration des taux des marqueurs du stress oxydant (GSH, CAT et SOD).</p> <p>En conclusion, cette étude soutient l'utilisation traditionnelle de cette plante pour traiter certains désordres liés au stress oxydant.</p> <p><b>Mots-clés :</b> <i>Centaurea fragilis</i>, antioxydant, hépato-toxicité, GSH, SOD, CAT , paracétamol.</p>	
<b>Abstract</b> <p>The present work aims to evaluate the antioxidant and anti-hepatotoxic activities of the crude extracts of <i>Centaurea fragilis</i>. The determination of polyphenols and flavonoids reveals their existence in all extracts (aqueous and methanolic extract), and the methanolic extract is the richest in phenolic compounds with a rate of <math>27.86 \pm 0.18 \mu\text{g EAG} / \text{mg}</math>. The results obtained <i>in vitro</i> show that the extracts have an important antioxidant power; the methanolic extract is the most active. <i>In vivo</i>, in order to evaluate a hepatoprotective (preventive) potency in mice, hepatotoxicity was induced by paracetamol after treatment of mice for 5 days. The crude extract at 200 mg / kg showed a significant hepatoprotective effect with an improvement in the status of markers of oxidative stress (GSH, CAT and SOD).</p> <p>In conclusion, this study supports the traditional use of this plant to treat certain disorders related to oxidative stress.</p> <p><b>Keywords:</b> <i>Centaurea fragilis</i>, antioxidant, hepatotoxicity, GSH, SOD, CAT , paracetamol.</p>	
<p style="text-align: right;"><b>المخلص</b></p> <p>يهدف هذا العمل إلى إجراء تقييم للأنشطة البيولوجية لنباتة <i>Centaurea fragilis</i> المضادة للأكسدة والواقية للكبد . يكشف التقدير الكمي لعديدات الفينول والفلافونويدات وجودها في جميع المستخلصات ( مستخلص الميثانول والمستخلص المائي) حيث سجل المستخلص الميثانولي أعلى كمية والتي تقدر ب <math>27.86 \pm 0.18</math> ميكروغرام كارسيني/مغ من المستخلص. أظهرت النتائج أن المستخلصات تملك قدرة مضادة للأكسدة والمستخلص الميثانولي هو الأكثر نشاطا . لتقييم الفعالية الواقية (وقائية) في الفئران تم تحريض السمية الكبدية بواسطة البراسيتامول بعد معالجة الفئران لمدة 5 أيام بالمستخلص اظهر المستخلص الميثانولي عند 200 مغ/ كغ تأثيرا وقائيا كبديا مع تحسن في حالة علامات الإجهاد التاكسدي (SOD, CAT, GSH) في الختام تدعم هذه الدراسة الاستخدام التقليدي لهذا النبات لعلاج بعض الاضطرابات المرتبطة بالأكسدة.</p> <p style="text-align: right;"><b>الكلمات المفتاحية :</b> مضاد الأكسدة, سمية كبدية GSH, SOD, CAT, براسيتامول.</p>	